

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Sanja V. Đekić

**Razvoj i primena HILIC MS/MS metode za
određivanje akrilamida u odabranim uzorcima
hrane sa procenom rizika po ljudsko zdravlje**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Sanja V. Đekić

**Development and application of HILIC MS/MS
method for determination of acrylamide in
selected food samples with human health risk
assessment**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Mentor:

dr Rada Baošić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Dubravka Relić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Vele Tešević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Mila Ilić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za hemiju, tehnologiju i
metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja za RS

dr Ivana Sredović Ignjatović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

U Beogradu, _____ 2025.

ZAHVALNICA

Ova disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Rade Baošić, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta. Ovom prilikom joj upućujem najiskreniju zahvalnost na izuzetnom stručnom vođstvu tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam svim članovima komisije, kao i dr Aleksandru Loliću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, koji su svojim konstruktivnim komentarima, sugestijama i profesionalnim pristupom na neprocenjiv način doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

Posebnu i najdublju zahvalnost dugujem koleginicama iz laboratorije ABiotech u Sremskoj Kamenici na izuzetnoj podršci koja je bila ključna za realizaciju ovog rada. Njihova stručnost, posvećenost i timski duh stvorili su idealno okruženje za istraživački rad. Svaka od njih doprinela je na svoj način uspešnosti ovog projekta. Naročito želim da istaknem Isidoru Kecojević, koja je bila moj najbliži saradnik tokom celog eksperimentalnog procesa. Njena nesebična pomoć, dragoceni saveti i ohrabrenje u kritičnim trenucima bili su od presudnog značaja za uspešno sprovođenje istraživanja. Takođe, duboku zahvalnost dugujem Ivani Vasiljević, Biljani Bajić i Ani Joksimović na njihovoj stalnoj podršci, prijateljskim savetima i kolegijalnosti koja je činila svaki dan rada prijatnijim i produktivnijim. Isidorina predanost i spremnost da bude uz mene u svim izazovima, kao i podrška celog ABiotech tima, učinili su da ova disertacija postane stvarnost. Sa sigurnošću mogu reći da bez ovog izuzetnog ženskog kolektiva ovaj rad ne bi bio moguć.

Direktoru firme Analysis d.o.o. Nenadu Andrejiću dugujem posebnu zahvalnost na velikoj podršci. Njegovo nesebično ulaganje u sve nas i konstantna podrška stručnom usavršavanju zaposlenih stvorili su uslove koji su mi omogućili da postignem ovaj cilj. Analysis je za mene mnogo više od radnog mesta - to je moja druga porodica koja me je oblikovala i učinila onom što jesam danas. U ovom okruženju sam rasla profesionalno i lično, okružena kolegama koji su postali pravi prijatelji.

Dr Maji Natić, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, iskreno se zahvaljujem na prijateljskoj podršci, stručnim savetima i pomoći koje mi je tokom godina nesebično pružala. Njeno znanje i iskustvo učinili su ovu saradnju neprocenjivom i od izuzetnog značaja za moj profesionalni razvoj i uspešan završetak ove disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezuslovnoj ljubavi, podršci i razumevanju tokom svih izazova koji su pratili izradu ove disertacije. Oni su moja snaga.

RAZVOJ I PRIMENA HILIC MS/MS METODE ZA ODREĐIVANJE AKRILAMIDA U ODABRANIM UZORCIMA HRANE SA PROCENOM RIZIKA PO LJUDSKO ZDRAVLJE

SAŽETAK

Naučni cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj i primena HILIC-MS/MS metode za određivanje akrilamida u odabranim uzorcima hrane sa procenom rizika po zdravlje ljudi usled izloženosti akrilamidu, pri čemu su razmatrani nekarcinogeni, karcinogeni i mutageni rizici. Razvijena je i validirana brza, jednostavna, osetljiva i robustna metoda za određivanje akrilamida u različitim prehrambenim proizvodima primenom tačne hromatografije zasnovane na hidrofilnim interakcijama spregnute sa tandemnom masenom spektrometrijom. Za pouzdanu validaciju metode pripremljen je kontrolni uzorak hleba sa dodatkom enzima asparaginaze, čime je prevaziđen nedostatak matriksa bez akrilamida. Validirani postupak pokazao je dobre analitičke performanse sa niskim granicama detekcije i kvantifikacije uz zadovoljavajući rikaveri i preciznost metode. Metoda je primenjena za određivanje sadržaja akrilamida u uzorcima sa srpskog tržišta: različitim vrstama hleba, odabranim finim pekarskim proizvodima, čipsevima i dečijoj hrani na bazi cerealija. U dečijoj hrani na bazi cerealija sadržaj akrilamida je bio ispod granice detekcije. Utvrđeno je da većina ispitanih uzoraka hleba ima koncentracije akrilamida ispod regulatornih graničnih vrednosti. Najviše koncentracije akrilamida detektovane su u integralnom pšeničnom hlebu sa semenkama, a najniže u ražanom hlebu. Ispitivanje distribucije akrilamida u hlebu pokazalo je značajno veće koncentracije u kori nego u sredini hleba. Eksperimentalno je potvrđena direktna zavisnost sadržaja akrilamida od vremena tostiranja, pri čemu je utvrđeno da tostiranje duže od 5 minuta rezultira značajnim povećanjem mutagenog rizika. U čipsu su izmerene najviše koncentracije akrilamida među svim ispitanim proizvodima. Procena rizika po ljudsko zdravlje pokazala je da ne postoji nekarcinogeni rizik, ali je utvrđen potencijalni mutageni rizik za sve ispitane uzorke, sa posebno visokim vrednostima za čips i tostirani hleb. Sa aspekta karcinogenog rizika, samo određene vrste hleba, neki uzorci biskvita i grisina pokazali su zadovoljavajući nivo bezbednosti. Ovo istraživanje predstavlja prvu procenu rizika po zdravlje stanovnika Srbije usled izloženosti akrilamidu putem hrane i pruža značajnu naučnu osnovu za razvoj strategija za smanjenje izloženosti ovom kontaminantu.

Ključne reči: Akrilamid, QuEChERS, HILIC-MS/MS, asparaginaza, tostiranje hleba, kora i sredina hleba, dečija hrana, fini pekarski proizvodi, čips, procena rizika

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF HILIC MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN SELECTED FOOD SAMPLES WITH HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT

ABSTRACT

The scientific objective of this doctoral dissertation was to develop and apply a HILIC-MS/MS method for the determination of acrylamide in selected food samples, along with an assessment of human health risks associated with acrylamide exposure, considering non-carcinogenic, carcinogenic, and mutagenic risks. A rapid, simple, sensitive, and robust method was developed and validated for the quantification of acrylamide in various food products using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. To enable reliable method validation, a control bread sample was prepared using the asparaginase enzyme, thereby overcoming the lack of an acrylamide-free matrix. The validated method demonstrated good analytical performance, with low limits of detection and quantification, and satisfactory recovery and precision. The method was applied to determine acrylamide content in samples from the Serbian market, including various types of bread, selected fine bakery products, potato chips, and cereal-based baby food. In cereal-based baby food, acrylamide was found to be below the detection limit. Most analyzed bread samples contained acrylamide concentrations below regulatory threshold values. The highest acrylamide levels were detected in wholegrain wheat bread with seeds, while the lowest were found in rye bread. Distribution analysis revealed significantly higher acrylamide concentrations in bread crust compared to crumb. A direct relationship between toasting time and acrylamide formation was experimentally confirmed, with toasting longer than 5 minutes resulting in a substantial increase in mutagenic risk. Potato chips had the highest acrylamide concentrations among all tested products. The human health risk assessment indicated no non-carcinogenic risk but identified a potential mutagenic risk for all analyzed samples, with particularly high values for chips and extensively toasted bread. From the perspective of carcinogenic risk, only certain types of bread, as well as some biscuit and snacks samples, demonstrated an acceptable level of safety. This study presents the first health risk assessment for the Serbian population related to dietary acrylamide exposure and provides a valuable scientific basis for the development of strategies aimed at reducing exposure to this contaminant.

Keywords: Acrylamide, QuEChERS, HILIC-MS/MS, Asparaginase, Toasting Bread, Bread Crust and Crumb, Baby Food, Fine Bakery Products, Chips, Risk Assessment

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1. Evolucija saznanja o akrilamidu	3
2.2. Fizičko-hemijske karakteristike akrilamida	4
2.3. Hemijski mehanizmi nastanka akrilamida u hrani	5
2.4. Faktori koji utiču na formiranje akrilamida u hrani	8
2.4.2. Sastav hrane	9
2.4.3. pH vrednost	10
2.4.4. Sadržaj vlage	11
2.4.5. Ostali faktori	11
2.5. Zastupljenost akrilamida u hrani	12
2.5.1. Zastupljenost akrilamida u hrani na bazi krompira	13
2.5.2. Zastupljenost akrilamida u hrani na bazi žitarica	14
2.5.2.1. Fini pekarski proizvodi	15
2.5.2.2. Hleb kao izvor akrilamida	15
2.5.4. Ostali proizvodi u kojima je detektovano prisustvo akrilamida	17
2.6. Metabolizam i toksični efekti akrilamida	18
2.6.1. Neurotoksičnost	18
2.6.2. Karcinogenost i genotoksičnost	19
2.6.3. Toksično delovanje akrilamida na reproduktivni sistem	19
2.7. Kvantifikacija akrilamida u hrani	20
2.7.1. Metode ekstrakcije	21
2.7.1.1. Načini ekstrakcije	21
2.7.1.2. Izbor ekstrakcionog sredstva	21
2.7.1.3. Metode prečišćavanja ekstrakta	22
2.7.1.4. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)	22
2.7.1.5. QuEChERS metodologija pripreme uzoraka	23
2.7.2. Analitičke metode za analizu akrilamida u hrani	26
2.7.2.1. Tečna hromatografija i masena spektrometrija (LC-MS)	26
2.7.2.2. Gasna hromatografija i masena spektrometrija (GC-MS)	30
2.7.2.3. Ostale metode	31
2.8. Procena rizika po ljudsko zdravlje usled izloženosti akrilamidu u hrani	32
2.8.1. Metodologija procene rizika po zdravlje ljudi	33
2.8.1.1. Karakterizacija opasnosti	33

2.8.1.2.	Procena izloženosti	34
2.8.1.3.	Karakterizacija rizika	34
2.9.	Mere i strategije za smanjenje unosa akrilamida u ishrani	35
2.9.1.	Tehnološke strategije zasnovane na fizičkom pristupu.....	36
2.9.2.	Tehnološke strategije zasnovane na hemijskom pristupu	36
2.9.3.	Tehnološke strategije zasnovane na biotehnološkom pristupu	38
2.9.4.	Regulatorni nadzor akrilamida u hrani.....	40
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	43
3.1.	Standardi, hemikalije i rastvarači.....	43
3.1.1.	Standardi korišćeni za kvantifikaciju akrilamida u odabranim uzorcima.....	43
3.1.2.	Rastvarači i hemikalije korišćeni za pripremu uzorka	44
3.1.3.	Rastvarači i hemikalije korišćeni za pripremu mobilne faze	44
3.2.	Uzimanje, priprema i klasifikacija uzoraka	44
3.2.1.	Uzorci sa tržišta Srbije za analizu sadržaja akrilamida.....	44
3.2.2.	Uzorci za razvoj i validaciju analitičke metode	46
3.2.3.	Priprema uzorka hleba bez prisustva akrilamida	46
3.2.4.	Priprema uzoraka hleba u cilju ispitivanja uticaja dužine izloženosti visokoj temperaturi na formiranje akrilamida (tostiranje hleba)	46
3.2.5.	Priprema uzoraka za analizu distribucije akrilamida u korici i sredini hleba	46
3.3.	Ekstrakcija uzoraka i priprema za HILIC-MS/MS analizu.....	47
3.4.	Kvantifikacija akrilamida primenom HILIC-MS/MS metode.....	49
3.5.	Validacija HILIC-MS/MS analitičkog postupka	50
3.5.1.	Procena linearnosti	52
3.5.2.	Procena matriks efekta	52
3.5.4.	Rikaveri i preciznost	53
3.5.5.	Specifičnost.....	54
3.5.6.	Robustnost.....	54
3.5.7.	Identifikacija	54
3.6.	Procena zdravstvenih rizika usled izloženosti akrilamidu putem ishrane.....	55
3.7.	Statistička obrada rezultata	59
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	60
4.1.	Razvoj i optimizacija analitičke metode za određivanje sadržaja akrilamida u hrani	60
4.1.1.	Optimizacija uslova tečne hromatografije	60
4.1.2.	Optimizacija parametara masene spektrometrije	65
4.1.3.	Optimizacija postupka pripreme uzoraka za HILIC-MS/MS analizu.....	66
4.1.4.	Rezultati validacije analitičkog postupka	68

4.2.	Analiza realnih uzoraka	71
4.2.1.	Sadržaj akrilamida u uzorcima hleba	71
4.2.2.	Sadržaj akrilamida u kori i sredini hleba	72
4.2.3.	Uticaj vremena tostiranja na formiranje akrilamida u hlebu.....	74
4.2.4.	Sadržaj akrilamida u finim pekarskim proizvodima, čipsu i dečijoj hrani	74
4.3.	Procena rizika po zdravlje stanovništva srbije usled izloženosti akrilamidu u hrani.....	76
4.3.1.	Procena rizika za uzorke hleba.....	76
4.3.2.	Procena rizika za koru i sredinu hleba	78
4.3.3.	Procena rizika za tostirani hleb	79
4.3.4.	Procena rizika za fine pekarske proizvode, čips i dečiju hranu	80
4.3.5.	Sveukupna procena rizika i implikacije za javno zdravlje.....	82
5.	ZAKLJUČAK	83
6.	LITERATURA.....	85
7.	PRILOG.....	102

1. UVOD

Akrilamid je hemijsko jedinjenje koje je tokom poslednje dve decenije privuklo veliku pažnju naučne javnosti, regulatornih tela i prehrambene industrije, prvenstveno zbog njegove široke zastupljenosti u termički obrađenim namirnicama i dokazanih toksičnih efekata na ljudsko zdravlje. Prekretnica je bilo istraživanje švedske nacionalne agencije za hranu, koja je u aprilu 2002. godine objavila zabrinjavajuće podatke o povišenim koncentracijama akrilamida u namirnicama, termički obrađenim na temperaturama iznad 120 °C. Posebno visoke vrednosti zabeležene su u proizvodima od krompira i pečenim proizvodima bogatim ugljenim hidratima (Tareke *i sar.* 2002). Ovo otkriće je značajno, naročito imajući u vidu da je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) još 1994. godine klasifikovala akrilamid kao neurotoksin i karcinogen grupe 2A (IARC 1994). Dodatnu zabrinutost je izazvala činjenica da termička obrada predstavlja nezaobilazan proces u savremenoj preradi hrane. U poslednje dve decenije, brojne naučne studije fokusirane su na različite aspekte istraživanja akrilamida u hrani, kao što su: razvoj analitičkih metoda za njegovo određivanje u hrani, ispitivanje mehanizama nastajanja, proučavanje načina za sprečavanje njegovog formiranja, istraživanje njegove toksičnosti, kao i procenu rizika po zdravlje ljudi (Fan *i sar.* 2023).

Sa analitičke tačke gledišta, kvantifikacija akrilamida u hrani predstavlja značajan izazov zbog njegovih specifičnih fizičko-hemijskih karakteristika: male molekulske mase, visoke polarnosti i rastvorljivosti u vodi, visoke reaktivnosti i niske isparljivosti (Oracz *i sar.* 2011).

Dodatni izazov predstavlja složenost matriksa termički obrađene hrane bogate ugljenim hidratima. Stoga postoji stalna potreba za razvojem pouzdane i jednostavne metode za rutinsku analizu akrilamida, koja bi omogućila brzo i selektivno praćenje uz minimalnu potrošnju rastvarača i bez komplikovanih koraka pripreme uzorka. U naučnoj literaturi objavljeni su brojni analitički postupci zasnovani na hromatografskim metodama i masenoj spektrometriji. Ovi postupci uključuju tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC), gasnu hromatografiju (GC), tečnu hromatografiju sa tandemnom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), gasnu hromatografiju-masenu spektrometriju (GC-MS), gasnu hromatografiju sa tandemnom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS). Sve navedene metode mogu se koristiti za pouzdanu detekciju akrilamida (Fan *i sar.* 2023). Međutim, u okviru pomenutih istraživanja, tečna hromatografija zasnovana na hidrofilnim interakcijama spregnuta sa tandemnom masenom spektrometrijom (HILIC- MS/MS) za određivanje akrilamida u hrani javlja se u svega nekoliko studija, od kojih su autori u samo dve studije objavili kompletne podatke validacije analitičkog postupka (Tolgyesi *i sar.* 2020; Desmarchelier *i sar.* 2022). Primenom tačne hromatografije zasnovane na hidrofilnim interakcijama spregnute sa tandemnom masenom spektrometrijom (HILIC-MS/MS) može se razviti pouzdana, robustna i selektivna metoda za kvantifikaciju akrilamida u različitim vrstama namirnica. Pretpostavka je zasnovana na činjenici da HILIC hromatografija obezbeđuje bolju retenciju polarnih analita u poređenju sa konvencionalnom reverzno-faznom hromatografijom (Bernal *i sar.* 2011). Takođe, upotreba mobilnih faza sa niskim sadržajem vode i visokim sadržajem polarnih organskih rastvarača, tipičnih za HILIC razdvajanje, veoma pogoduje detekciji u uslovima elektrosprej jonizacije (ESI) i u mnogim slučajevima rezultira povećanom osetljivošću. Kada je reč o pripremi uzoraka, modifikacijom konvencionalne QuEChERS metode za pripremu uzoraka moguće je postići brzu i efikasnu ekstrakciju akrilamida iz složenih matriksa hrane uz minimalnu upotrebu rastvarača.

Tradicionalno, različite vrste hleba, uglavnom pšeničnog, ali i ražanog i kukuruznog zauzimaju centralno mesto u srpskoj kuhinji i prehrambenim navikama našeg naroda. Pored kulturološkog značaja, hleb ima i nutritivna svojstva, i predstavlja osnovnu namirnicu koju svakodnevno konzumira većina stanovništva, sa prosečnim dnevnim unosom od 0,17 kg/dan prema podacima Republičkog zavoda za statistiku za 2023. godinu. Nažalost, hleb i ostale namirnice koje obiluju skrobom, nakon obrade takođe postaju i izvor akrilamida, što je dokazano brojnim studijama

(Mollakhalili *i sar.* 2021). Kako Srbija ima bogatu istoriju pravljenja hleba, ovako široka potrošnja zahteva pažljivo razmatranje aspekta bezbednosti hrane, posebno u pogledu kontaminanata poput akrilamida.

Naime, tradicionalno pravljenje hleba najčešće uključuje pečenje na visokim temperaturama, i preferenciju ka tamnijoj kori, što može doprineti povišenim nivoima akrilamida u ovim proizvodima. Raznovrsnost vrsta hleba koje se konzumiraju u Srbiji, od tradicionalnog belog hleba do integralnih varijanti, predstavlja složen scenario za procenu izloženosti akrilamidu. Do danas je istraživanje sadržaja akrilamida u srpskim prehrambenim proizvodima ograničeno na samo dve objavljene studije koje su ispitivale nivoe akrilamida u namirnicama dostupnim na srpskom tržištu (Korićanac *i sar.* 2021; Žilić *i sar.* 2024). Iako ove studije pružaju vredne početne uvide, sveobuhvatni podaci o sadržaju akrilamida u komercijalnim prehrambenim proizvodima na tržištu u Srbiji su oskudni, te postoji potreba za opsežnijim praćenjem i određivanjem sadržaja akrilamida.

Zbog svega navedenog, od značaja je razumevanje rasprostranjenosti akrilamida u hlebu kao osnovnoj namirnici, procena potencijalnih zdravstvenih rizika, kao i informisanje potrošača i proizvođača o bezbednoj potrošnji.

U okviru ove doktorske disertacije sprovedena su sledeća ispitivanja:

- Razvoj i validacija HILIC-MS/MS metode za određivanje akrilamida u hrani. U cilju optimizacije parametara metode izvršena je optimizacija hromatografskih uslova i parametara masene spektrometrije. Pored toga, optimizovana je i metoda pripreme ekstrakcije uzoraka, nakon čega je usledila validacija celokupnog analitičkog postupka. Validacija razvijene metode sprovedena je pomoću sertifikovanih referentnih materijala.
- Razvoj postupka za dobijanje hleba sa sadržajem akrilamida koji je niži od limita detekcije (eng. *Limit of Detection*, LOD), i koji je služio kao osnova za pripremu kontrolnih uzoraka sa standardnim dodatkom. U tu svrhu korišćen je enzim asparaginaza i optimizovan je postupak pripreme hleba, tako da je nastanak akrilamida bio redukovano. Enzim je imao namenu da smanji sadržaj asparagina kao jednog od prekursora u procesu formiranja akrilamida.
- Uzimanje uzoraka različitih vrsta hleba, odabranih finih pekarskih proizvoda, čipseva i dečije hrane na bazi cerealija, koji se konzumiraju u Srbiji, u cilju određivanja sadržaja akrilamida u reprezentativnim uzorcima. Nakon uzorkovanja urađena je ekstrakcija i HILIC-MS/MS analiza primenom validovane metode.
- Ispitivanje uticaja dužine izloženosti uzoraka hleba visokoj temperaturi na formiranje akrilamida.
- Statistička obrada dobijenih rezultata u cilju dobijanja uvida o sadržaju akrilamida u odabranim uzorcima hrane na tržištu Srbije.
- Procena izloženosti različitih populacionih grupa akrilamidu koji je bio prisutan u ispitivanim uzorcima, a koja je omogućila procenu rizika po ljudsko zdravlje stanovništva u Srbiji.

2. OPŠTI DEO

2.1. Evolucija saznanja o akrilamidu

Akrilamid je prvi put sintetisao hemičar Šarl Mure (*Charles Moureu*) krajem 19. veka, tačnije 1893. godine (IARC 1986). Inicijalna istraživanja tokom 1940-ih i 1950-ih godina bila su fokusirana na polimerizacijske karakteristike akrilamida, koji je brzo pronašao primenu u industriji kao monomer za sintezu poliakrilamida, polimera veoma raznovrsnih fizičkih i hemijskih karakteristika. Poliakrilamidi su našli veoma široku primenu u različitim granama industrije, od prerade vode kao flokulanti za prečišćavanje otpadnih voda do proizvodnje papira i kozmetičkih proizvoda kao aditivi (IARC 1986; Smith *i sar.* 1991). U tom periodu akrilamid je bio prepoznat samo kao neurotoksin, bez dovoljno naučnih dokaza o njegovoj potencijalnoj karcinogenosti (IARC 1986). Prekretnica u razumevanju akrilamida dogodila se devedesetih godina prošlog veka. Toksikološka istraživanja otkrila su da ovo hemijsko jedinjenje, pored neurotoksičnih efekata, može izazvati i genetske mutacije. Kao rezultat ovih saznanja, Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) je 1994. godine klasifikovala akrilamid kao potencijalni karcinogen – grupa 2A, što znači „verovatno karcinogen za ljude“ (IARC 1994).

Akrilamid je u hrani otkriven 1997. godine u oblasti Halandsa, na jugozapadu Švedske, gde su se pojavili alarmantni simptomi kod ljudi koji su radili na izgradnji železničkog tunela. Četvrtina radnika prijavila je utrnulost i peckanje u nogama i stopalima, što je izazvalo zabrinutost. Mleko, krompir i drugi poljoprivredni proizvodi iz tog regiona prestali su da se konzumiraju i otkazana je godišnja sezona lova, zbog sumnje da su kontaminirane životinje los i jelen. Zanimljivo je da su prvobitne sumnje upućivale na to da je hemikalija koja je mogla biti odgovorna za ove simptome potekla iz sredstva za fugovanje koje je korišćeno pri gradnji tunela. Iako su početne analize pokazale visoke koncentracije akrilamida u okolnim vodama, još uvek nije postojalo uverljivo objašnjenje o tome šta je tačno uzrokovalo smrt riba i paralizu stoke. Dr. Margareta Törnqvist sa Univerziteta u Stokholmu, razvila je hemoglobin (Hb)-adukt metodu, koja je omogućila *in vivo* praćenje reaktivnih komponenti kao što je akrilamid i izloženosti akrilamidu. Nakon što je metoda prethodno testirana praćenjem izloženosti radnika u Kini akrilamidu, primenjena je na stoci i divljim životinjama iz oblasti Halandsa, pri čemu je otkriveno da su te životinje bile izložene akrilamidu. Prvi rezultati ukazivali su na to da je nivo akrilamida u krvi radnika u Halandsu bio značajno viši u odnosu na ljude koji nisu živeli u zagađenim područjima (Erickson, 2004). Na osnovu tih podataka, istraživači su počeli da sumnjaju da je dugoročna izloženost akrilamidu potencijalno opasna za ljudsko zdravlje, čime je pokrenuto pitanje mogućih rizika.

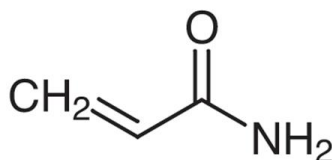
U pokušaju da objasne ovu pojavu, istraživači su počeli da se bave istraživanjem ishrane i toplotnih procesa u pripremi hrane, verujući da bi zagrevanje moglo biti odgovorno za formiranje akrilamida u namirnicama. Metodologija koja je korišćena na pacovima koji su hranjeni prženim i neprženim namirnicama dala je prve konkretne dokaze da je akrilamid prisutan u prženoj hrani. Ova otkrića podstakla su dalja istraživanja koja su otkrila da se akrilamid, u velikim količinama, formira u hrani bogatoj ugljenim hidratima, kao što je krompir, a posebno u prženim proizvodima od krompira kao što je čips, gde su koncentracije dostizale čak 4 mg/kg. Preliminarne procene ukazivale su da je rizik od izloženosti akrilamidu veći nego kod bilo koje druge hemikalije u hrani. Iako je tada bilo očigledno da je akrilamid prisutan u mnogim namirnicama koje se svakodnevno konzumiraju, razmere ovog problema postale su jasno prepoznatljive tek nakon što su istraživači konačno objavili svoja saznanja u periodu 2000-2002. godine. Istraživanja su pokazala da se akrilamid formira hemijskom reakcijom aminokiseline asparagina i redukujućih šećera kada se hrana peče, prži ili priprema na temperaturama iznad 120 °C (Tareke *i sar.* 2000, 2002.). Ovo otkriće je izazvalo veliku

medijsku pažnju i globalni naučni i javno-zdravstveni interes. Međunarodne organizacije poput Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization*, WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organization*, FAO) pokrenule su opsežna istraživanja naučnih studija o uticaju akrilamida na ljudsko zdravlje. Takođe, Evropska unija na čelu sa Evropskom agencijom za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority*, EFSA) vođena izveštajima FAO i WHO, pokreće 2005. godine detaljna praćenja sadržaja akrilamida u različitim vrstama namirnica, a sve u cilju konačnog utvrđivanja pravnih okvira u pogledu maksimalno dozvoljenih koncentracija ovog kontaminanta u hrani. Regulatorni okviri brzo su se prilagodili novim otkrićima o akrilamidu.

Danas postoje brojni međunarodni i nacionalni standardi koji uspostavljaju mere i preporuke za smanjenje izloženosti akrilamidu, propisujući maksimalno dozvoljene koncentracije u različitim vrstama namirnica. Istraživanja se baziraju na proučavanju kompleksnih mehanizama nastanka i delovanja akrilamida, u cilju smanjenja njegovog prisustva u hrani i procene dugoročnih zdravstvenih rizika. Industrija prehrambenih proizvoda razvija nove tehnologije prerade hrane koje minimizuju nastajanje ovog jedinjenja. Bez obzira na ove napretke, stručnjaci naglašavaju da bi moglo biti teško drastično smanjiti nivoe akrilamida u hrani zbog prirode procesa pripreme hrane koji zahteva visoke temperature. Rezultati ovih istraživanja podstiču nova razmišljanja o rizicima koje prirodne hemikalije u hrani mogu predstavljati za ljudsko zdravlje.

2.2. Fizičko-hemijske karakteristike akrilamida

Akrilamid (prop-2-enamid) je organsko jedinjenje ugljenika, vodonika, azota i kiseonika, bruto formule C_3H_5NO . Poznat je i kao 2-propenamid, propenamid, vinil amid, etilen karboksamid. Strukturno, akrilamid sadrži dve funkcionalne grupe: vinilnu ($CH_2=CH-$), koja mu daje visoku reaktivnost i sposobnost brze polimerizacije i amidnu ($-CONH_2$), koja mu omogućava visoku polarnost (**Slika 1**).



Akrilamid

Slika 1. Strukturna formula.

Akrilamid je veoma reaktivno jedinjenje sa izraženim slabo baznim svojstvima u vodi. Karboksiamidna grupa ima sposobnost da privlači elektrone, poseduje afinitet ka nukleofilnim jedinjenjima usled čega dolazi do raznih mehanizama adicije (Majklova adicija, Diels–Alderova cikloadicija i reakcije sa slobodnim radikalima). Mnoge od ovih reakcija su važne i dešavaju se u biološkim sistemima, reverzibilne su i brzina reakcije zavisi od jačine nukleofila. Sa druge strane reakcije amidne grupe uključuju hidrolizu, dehidrataciju, alkoholizu i kondenzaciju sa aldehidima,

dok vinil dvostruka veza reaguje sa amonijakom, alifatičnim aminima, fosfinima, hlorom, bromom, bisulfitima i ditiokarbamatima, kao i sa proteinima (Elbashir *i sar.* 2014).

Akrilamid je na sobnoj temperaturi postojan u vidu belog kristalnog praha bez mirisa, koji polimerizuje prilikom topljenja ili izlaganja ultraljubičastom zračenju. Dodatnim prečišćavanjem sa benzenom, taloži se u obliku listova pahuljastog kristala (IARC 1986; Smith *i sar.* 1991). Pregled fizičko-hemijskih svojstava akrilamida dat je u **Tabeli 1.**

Tabela 1. Akrilamid: opšti podaci i fizičko-hemijska svojstva.

Karakteristika	Specifikacija
CAS #	79-06-1
Molekulska formula	C_3H_5NO
Molekulska masa	71,078 g/mol
Gustina na 30 °C	1,122 g/mL
Temperatura topljenja	84,5 °C
Temperatura ključanja na 25 mm Hg	125 °C
Napon pare na 25 °C	0,9 Pa
Stabilnost	Stabilan na sobnoj temperaturi
Rastvorljivost u vodi na 30 °C	215,5 g/100mL
Rastvorljivost u organskim rastvaračima na 30 °C	Metanol: 155 g/100 mL
	Etanol: 86,2 g/100 mL
	Aceton: 63,1 g/100 mL
	Etil acetat: 12,6 g/100 mL
	Hloroform: 2,66 g/100 mL
	Benzen: 0,346 g/100 mL
	Heptan: 0,0068 g/100 mL

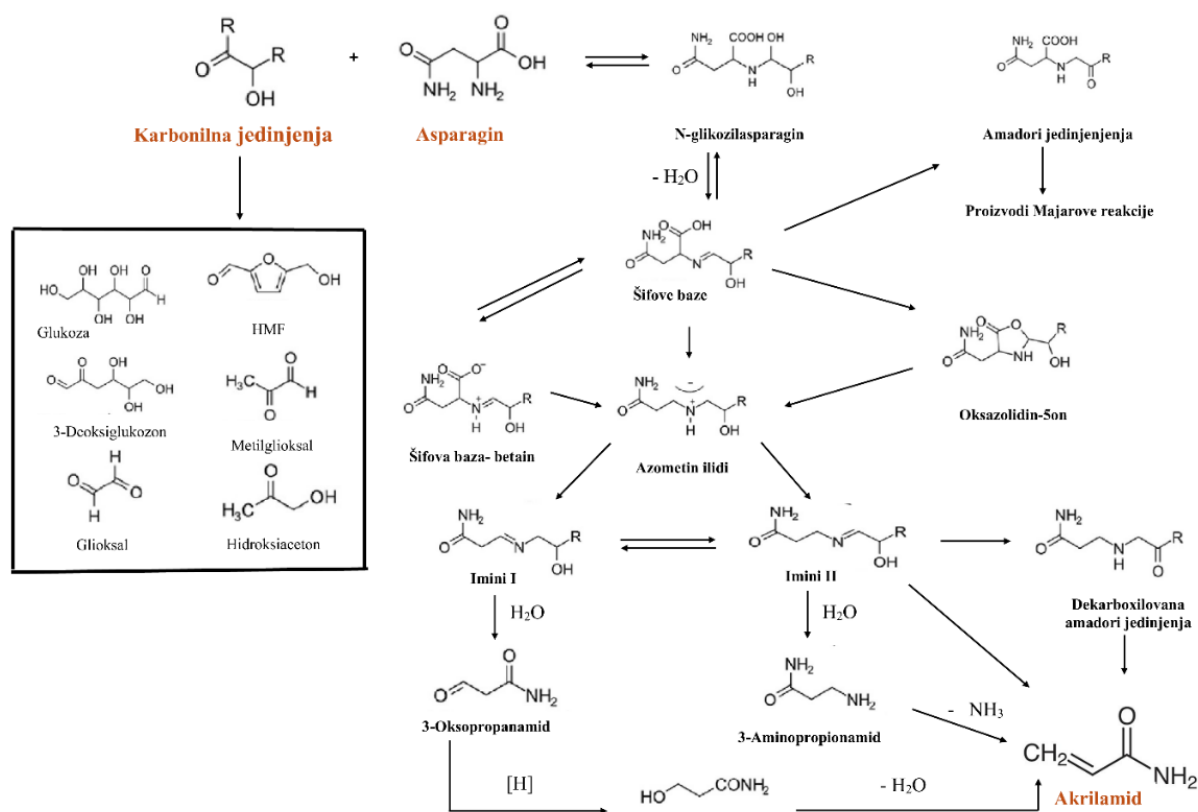
2.3. Hemijski mehanizmi nastanka akrilamida u hrani

Nakon otkrića akrilamida u hrani, brojne naučne studije potvrdile su da je Majlardova reakcija između aminokiselina i redukujućih šećera prvenstveno odgovorna za formiranje akrilamida u određenim namirnicama, kao što su čips, pomfrit i proizvodi na bazi žitarica (Mottram *i sar.* 2002; Stadler *i sar.* 2002; Tareke *i sar.* 2002; Becalski *i sar.* 2003).

Majlardova reakcija dobila je ime po francuskom hemičaru Luisu Kamiju Majlardu (*Louis-Camille Maillard*), koji ju je prvi opisao 1912. godine (Maillard, 1912), iako su koraci u reakciji kako se danas razumeju prvi put predloženi od strane američkog hemičara Džona Hodža 1953. godine, kao Hodžova šema (Hodge, 1953). Majlardova reakcija, kako je Hodž opisao, obuhvata niz neenzimskih reakcija između karbonilne grupe koja najčešće potiče od redukujućih šećera i amino grupa, koje se

pospešuju visokom temperaturom ($>120\text{ }^{\circ}\text{C}$) i niskim sadržajem vlage, zbog čega se uglavnom javlja u hrani pripremljenoj prženjem, pečenjem i tostiranjem (Raffan i Halford, 2019). Proizvodi Majlardove reakcije uključuju melanoidinske pigmente (polimerna jedinjenja) i složene smeše jedinjenja koji daju karakterističan ukus i aromu, heterociklična jedinjenja kao što su furani, pirazini, piroli, oksazoli, tiofeni, tiazoli (Halford *i sar.* 2011). Pomenuta jedinjenja daju različitim kuvanim namirnicama karakterističan ukus, aromu i boju, što znači da će sve mere preduzete za smanjenje formiranja akrilamida verovatno uticati i na karakteristike koje definišu vrste proizvoda i razlikuju jedan brend od drugog, čineći problematiku još težom za rešavanje.

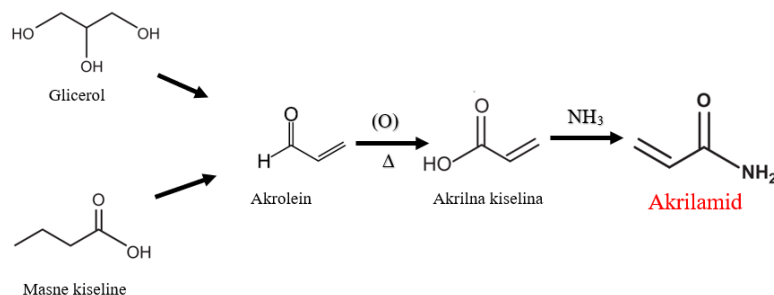
Stadler *i sar.* (2002) i Mottram *i sar.* (2002) pokazali su da se akrilamid može formirati u toku termičke obrade određenih aminokiselina, posebno asparagina. Kasnija istraživanja koja su sprovedi Zyzak *i sar.* (2003), koristeći izotopski obeleženi ugljenik i azot asparagina, dodatno su potvrdila da je asparagin ključni prekursor u formiranju akrilamida. Iako je asparagin identifikovan kao glavni izvor, direktna konverzija samog asparagina u akrilamid je zanemarljiva u odnosu na reakciju asparagina i karbonilnih jedinjenja, posebno redukujućih šećera (Yaylayan *i sar.* 2003). Ove rezultate potvrdilo je nekoliko dodatnih studija koje su pokazale da reakcija između karbonilnih jedinjenja i asparagina dovodi do formiranja akrilamida (Hamzalıoğlu i Gökmen, 2012; Stadler *i sar.* 2002, 2004). Glavni put formiranja akrilamida prikazan je na **Slici 2**. Prema ovom mehanizmu, u prvoj fazi α -amino grupa asparagina reaguje sa karbonilnom grupom redukujućih šećera pri čemu preko glikokonjugata (N-glikozilasparagina) nastaju Šifove baze (Stadler *i sar.* 2002; Tareke *i sar.* 2002; Zyzak *i sar.* 2003). Putem Amadori mehanizma premeštanja nastaju Amadori (eng. *Amadori*) jedinjenja, koja u ovoj fazi nastajanja nisu direktni intermedijeri u formiranju akrilamida (Ledl i Schleicher, 1990; Stadler *i sar.* 2004). U drugoj fazi formiranja akrilamida, dekarboksilacijom Šifovih baza nastaju azometin ilidi, pri čemu se razvija čitav niz reakcija koje vode ka različitim intermedijerima. Prema literaturi, izdvajaju se dva glavna puta reakcije, koji se razlikuju po mehanizmu transformacije i stepenu doprinosa ukupnom nastanku akrilamida (Yaylayan *i sar.* 2003; Zyzak *i sar.* 2003). Prvi reakcioi put (Imin I) predstavlja mehanizam nastanka Strekerovog (eng. *Strecker*) aldehida (3-oksopropanamid), koji može biti prekursor formiranja akrilamida, ali u tragovima (Blank, 2005; Stadler *i sar.* 2004). Drugi reakcioni put (imin-II) može proizvesti akrilamid na dva načina, direktno β -eliminacijom i hidrolizom do 3-aminopropionamida (3-APA), a zatim deaminacijom 3-APA (Stadler *i sar.* 2004; Zyzak *i sar.* 2003). Takođe, 3-APA, koji može biti prisutan u značajnim koncentracijama u sirovoj hrani kao proizvod enzimske dekarboksilacije asparagina u nekim slučajevima predstavlja efikasan prekursor za formiranje akrilamida i bez prisustva redukujućih šećera (Granvogl *i sar.* 2004; Granvogl i Schieberle, 2007). U prilog ovome govore istraživanja koja potvrđuju prisustvo akrilamida i u namirnicama pripremljenim od sirovina koje sadrže niske količine asparagina (Granvogl *i sar.* 2004). Intermedijeri nastali iz redukujućih šećera tokom termičke obrade mogu takođe inicirati formiranje akrilamida iz asparagina zahvaljujući svojim karbonilnim grupama (Amrein *i sar.* 2006). Istraživanja su pokazala da je hidroksimetilfurfural (HMF) efikasniji od glukoze u formiranju akrilamida pri povišenim temperaturama (Gökmen *i sar.* 2012; Berk *i sar.* 2020). Posebnu pažnju privukla su α -dikarbonilna jedinjenja poput metilglioksala i glioksala, koji kao veoma reaktivni karbonili mogu značajno doprineti formiranju akrilamida. Amrein *i sar.* (2006) su utvrdili da su ova jedinjenja (glioksal, metilglioksal i diacetil) mnogo efikasnija od glukoze ili fruktoze u konverziji asparagina u akrilamid čak i pri blagim uslovima ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 minuta). Međutim, rezultati istraživanja su ponekad kontradiktorni. Dok su Koutsidis *i sar.* (2008) istakli značajnu ulogu glioksala, Stadler *i sar.* (2004) ukazuju na suprotno, da metilglioksal i glioksal imaju mali doprinos formiranju akrilamida u eksperimentima sa niskom vlažnošću na $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Constantinou i Koutsidis (2016) su takođe pokazali da se više akrilamida formira u model sistemu asparagin-glukoza nego asparagin-glioksal pri niskom sadržaju vlage.



Slika 2. Mehanizmi nastajanja akrilamida - Majlardova reakcija (Mottram *i sar.* 2002; Stadler *i sar.* 2002; Yaylayan *i sar.* 2003).

Pored metaboličkog puta posredstvom Majlardove reakcije, naučna istraživanja ukazuju da oksidacija lipida, u toku zagrevanja ulja na visokim temperaturama (prženje hrane), značajno doprinosi formiranju akrilamida kroz generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, koja stupaju u reakciju sa karbonilnim jedinjenjima. Ovaj proces omogućava sintezu akrilamida putem više paralelnih metaboličkih puteva u kojima ključnu ulogu kao intermedijerni molekuli imaju piruvinska kiselina, β -alanin, asparaginska kiselina, karnozin i akrolein.

Značajno je pomenuti akrolein metabolički put u kome tok degradacije lipida, za posledicu ima nastanak glicerola i masnih kiselina i konačno akroleina, koji potom podleže oksidaciji do akrilne kiseline, koja u reakciji sa amonijakom (nastao deaminacijom aminokiselina ili Strecker-ovom degradacijom) dovodi do nastanka akrilamida (Granvogl *i sar.* 2004; Yasuhara *i sar.* 2003), (**Slika 3**).



Slika 3. Mehanizmi nastajanja akrilamida: Akrolein metabolički put (Granvogl *i sar.* 2004; Yasuhara *i sar.* 2003).

Iako postoje dokazi o značajnom doprinosu različitih intermedijera u formiranju akrilamida, nedostaju sveobuhvatne studije koje bi ispitalle ulogu različitih α -dikarbonilnih i drugih karbonilnih jedinjenja pri različitim uslovima zagrevanja i vlažnosti. Važno je napomenuti da se formiranje akrilamida intenzivira na temperaturama iznad 120 °C i u suvim ili polusuvim sistemima, zbog čega je većina model-istraživanja izvedena u takvim uslovima. Međutim, postoji mali broj studija koje istražuju formiranje akrilamida pri blažim uslovima, u smislu izlaganja hrane nižim temperaturama (Becalski *i sar.* 2011; Napolitano *i sar.* 2008; Yaylayan *i sar.* 2003).

2.4. Faktori koji utiču na formiranje akrilamida u hrani

Posebno je značajno razumeti koji faktori i kako utiču na formiranje akrilamida. Razumevanje ovih faktora i poznavanje mehanizama uticaja, može pomoći u sprečavanju formiranja ovog kontaminanta, što je ključno za poboljšanje bezbednosti hrane. Brojni faktori mogu uticati na formiranje akrilamida u hrani, uključujući temperaturu, vreme obrade, pH vrednost, način pripreme, vrstu sirovine, upotrebu aditiva, kao i uslove skladištenja.

2.4.1. Temperatura i vreme termičke obrade

Više temperature (>120 °C) i duže vreme izlaganja termičkoj obradi namirnice, poput prženja u dubokom ulju ili pečenja, podstiču stvaranje akrilamida. Pri višim temperaturama, amino grupa slobodnog asparagina prisutnog u hrani, podleže kondenzaciji sa karbonilnom grupom redukujućih šećera, formirajući intermedijerna jedinjenja, Šifove baze, koja su odgovorna za formiranje akrilamida (Govindaraju *i sar.* 2024). U pomfritu nakon 6 minuta prženja na 150 °C, koncentracija akrilamida je 265 µg/kg da bi nakon 5 minuta prženja na 190 °C vrednost bila 2130 µg/kg (Jackson i Al-Taher, 2005). U keksima nakon 10 minuta pečenja kvantifikovano je 50 µg/kg akrilamida, da bi se nakon 20 minuta koncentracija povećala na 200 µg/kg (Keramat *i sar.* 2011). Sa druge strane, postoje studije koje pokazuju da produženo vreme zagrevanja snižava sadržaj akrilamida usled njegove degradacije (Becalski *i sar.* 2003; Elmore *i sar.* 2005; Mottram *i sar.* 2002), kao i da priprema nekih prehrambenih proizvoda na nižoj temperaturi tokom dužeg vremenskog perioda smanjuje sadržaj akrilamida (Suman *i sar.* 2019). Kafa se generalno peče na 220–250 °C, a vreme i brzina prženja kafe najviše utiču na njene senzorne karakteristike (boja, aroma i ukus), koje joj daju kvalitet i karakterističan identitet. Prema studijama, uticaj temperature izlaganja kafe u toku pripreme nema značajan uticaj na nastanak akrilamida. U kafi, akrilamid se formira u visokim koncentracijama tokom prvih minuta pečenja, što rezultira koncentracijama > 7 mg/kg, da bi se produženjem vremenu pečenja koncentracija akrilamida smanjivala usled razgradnje akrilamida, ali i rezultirala stvaranjem nepoželjnih i neprijatnih aroma i ukusa (Soares *i sar.* 2015).

2.4.2. Sastav hrane

Direktan uticaj na sadržaj akrilamida u određenoj namirnici ima sadržaj prekursora odgovornih za nastanak akrilamida (redukujući šećeri i slobodne aminokiseline) u osnovnoj sirovini od koje se namirnica priprema. Proizvodi na bazi krompira i cerealijska, kao i kafa prepoznati su kao najveći izvori pomenutih prekursora u procesu nastanka akrilamida. Najznačajniji prekursori su asparagin (predstavnik aminokiselina) i fruktoza i glukoza (predstavnici redukujućih šećera) (Batuwita *i sar.* 2024).

Asparagin: Analiza 18 aminokiselina u pogledu njihove efikasnosti u formiranju akrilamida, koju su sprovedi Daniali *i sar.* (2018), pokazala je da asparagin daje najveću količinu akrilamida (5987,5 µg/kg), a fenilalanin najnižu (9,25 µg/kg). Asparagin je identifikovan kao primarni prekursor akrilamida u hrani. Njegova koncentracija u usevima značajno zavisi od različitih faktora kao što su genotip, klimatski uslovi i đubrenje (sadržaj sumpora i azota), a koji takođe utiču na sastav aminokiselina i sadržaj proteina (Sá i House, 2024). Asparagin se akumulira u biljkama u povišenim koncentracijama kada je stepen sinteze proteina nizak, usled čega biljke imaju obilno snabdevanje azotom. U situacijama kada biljke ne mogu da skladište azot u proteinima, slobodni asparagin služi kao rezervoar azota (Curtis i Halford, 2016). Posebno je značajno da je asparagin jedna od najvažnijih aminokiselina koje reaguju sa dikarbonilnim jedinjenjima, služeći kao glavni prekursor u formiranju akrilamida kroz Strecker-ovu degradaciju u Majlardovoj reakciji (Batuwita *i sar.* 2024). Kada je reč o proizvodima od krompira, asparagin je identifikovan kao dominantna slobodna aminokiselina, čineći približno trećinu ukupnog sadržaja aminokiselina (Raffan i Halford, 2019). Međutim, u krompiru su redukujući šećeri ograničavajući faktor za formiranje akrilamida. Istraživanja na prženim proizvodima od krompira pokazala su da su nivoi asparagina u krompiru relativno visoki u poređenju sa sadržajem redukujućih šećera (Zhang *i sar.* 2018). Iako ne postoji zvanično deklarirana gornja granica za sadržaj redukujućih šećera u sortama krompira koje se koriste za proizvodnju čipsa, proizvođačima se savetuje da koriste sorte sa redukujućim šećerima koji ne prelaze 3 g/kg sveže mase. Nasuprot tome, kod proizvoda na bazi žitarica, asparagin je ograničavajući faktor u formiranju akrilamida zbog njegove niže zastupljenosti. U kafi, asparagin je druga najzastupljenija aminokiselina u sirovom zrnju. Rezultati ispitivanja sadržaja akrilamida u dve vrste kafe Robusta i Arabika pokazuju da Robusta kafa ima više koncentracije akrilamida (500 µg/kg) u poređenju sa Arabika kafom (230 µg/kg) usled veće zastupljenosti asparagina u ovoj vrsti kafe (Alves *i sar.* 2010; Soares *i sar.* 2015).

Redukujući šećeri: studija Bertuzzi *i sar.* (2020) pokazala je da hidroliza polisaharida dovodi do oslobađanja šećera niske molekulske mase kao što su fruktoza i glukoza, koji značajno doprinose formiranju akrilamida. Iako aldehidna grupa glukoze pokazuje veću reaktivnost u poređenju sa keto grupom fruktoze, glukoza pokazuje relativno nižu reaktivnost i manji doprinos Majlardovoj reakciji u uslovima niske vlažnosti i niske molekulske mobilnosti (García-Ríos *i sar.* 2023). Fruktoza, povećava formiranje akrilamida za približno dva puta u poređenju sa drugim redukujućim šećerima kao što je glukoza (Khorshidian *i sar.* 2020). Ova povećana reaktivnost fruktoze može se pripisati njenoj nižoj tački topljenja, što povećava mobilnost i olakšava brže interakcije između prekursora za formiranje Majlardovih intermedijera (Stadler i Studer, 2016). U kafi saharoza se tokom prženja razlaže na glukozu i fruktozu (Batuwita *i sar.* 2024). Friedman (2003) je naveo da izbor sorti krompira sa niskim nivoom redukujućih šećera igra ključnu ulogu u smanjenju sadržaja akrilamida, a predloženo je da maksimalna vrednost redukujućih šećera bude 1 g/kg kako bi se značajno smanjilo nastajanje akrilamida.

Odnos prekursora u različitim prehrambenim proizvodima: Razumevanje specifičnih karakteristika i odnosa prekursora u različitim proizvodima od fundamentalnog je značaja za razvoj strategija za smanjenje formiranja akrilamida u prehrambenim proizvodima. Ovo znanje omogućava ciljani pristup kontroli prekursora u zavisnosti od vrste proizvoda. Dobar pokazatelj razlike u potencijalu formiranja akrilamida je koncentracija slobodnog asparagina (Halford *i sar.* 2022). Za različite sirovine bogate asparaginom i redukujućim šećerima postoje različita pravila. Na osnovu model-supstrata krompira identifikovana prelomna tačka odnosa slobodni asparagin/redukujući šećeri je 2,25. Više i niže vrednosti ovog odnosa znače da redukujući šećeri ili slobodni asparagin deluju kao primarni ograničavajući faktor u formiranju akrilamida (Pedreschi *i sar.* 2014; Di Francesco *i sar.* 2019). U slučaju namirnica na bazi žitarica, asparagin je ograničavajući faktor za nastanak akrilamida, jer se ove sirovine odlikuju višim sadržajem redukujućih šećera u odnosu na asparagin. Iz perspektive vrste žitarice, raž ima značajno više asparagina u odnosu na pšenicu, dok se integralno brašno odlikuje višim sadržajem asparagina od belog rafinisanog brašna. Ovo se može objasniti neujednačenom raspodelom asparagina u različitim delovima pšeničnog zrna, gde je utvrđeno da sadržaj slobodnog asparagina iznosi 55,5 g/kg u klici (zametku novog zrna), 1,48 g/kg u mekinjama (spoljašnjem sloju) i samo 0,17 g/kg u endospermu (unutrašnjem delu zrna koji se koristi za proizvodnju belog brašna) (Gündüz i Cengiz, 2015). Integralni proizvodi, koji sadrže sve delove zrna (klicu, mekinje i endosperm), sadrže znatno više asparagina u poređenju sa proizvodima od rafinisanog brašna, gde su mekinje i klica uklonjeni tokom procesa mlevenja. Ova razlika u sadržaju asparagina direktno utiče na formiranje akrilamida, jer je asparagin njegov glavni prekursor u pekarskim proizvodima. Posledično, integralni pekarski proizvodi prirodno pokazuju veću tendenciju formiranja akrilamida tokom termičke obrade u poređenju sa proizvodima od belog brašna. Ovaj fenomen predstavlja značajan paradoks u nutritivnom smislu - dok se integralni proizvodi generalno smatraju nutritivno vrednijim zbog većeg sadržaja vlakana, vitamina i minerala, istovremeno mogu imati povišen potencijal za formiranje akrilamida, supstance koja se prema trenutnim naučnim saznanjima smatra potencijalno štetnom po zdravlje. U kontekstu kafe, važno je istaći da asparagin predstavlja drugu najzastupljeniju aminokiselinu u sirovom zrnju, što značajno doprinosi potencijalu za formiranje akrilamida. Tokom procesa prženja, dolazi do razlaganja saharoze (koja sama po sebi nije redukujući šećer) na glukozu i fruktozu, čime se obezbeđuju neophodni redukujući šećeri za reakcije koje vode ka formiranju akrilamida. Posebno je značajno napomenuti da Robusta kafa prirodno sadrži viši nivo asparagina u poređenju sa Arabikom, što direktno rezultira većim sadržajem akrilamida u finalnom proizvodu nakon termičke obrade. Ova razlika u hemijskom sastavu između različitih vrsta kafe predstavlja jedan od ključnih faktora koji određuju intenzitet formiranja akrilamida tokom procesa proizvodnje (Pedreschi *i sar.* 2014).

2.4.3. pH vrednost

pH vrednost hrane značajno utiče na Majlardovu reakciju i posledično na formiranje akrilamida. Proučavanjem efekata pH na formiranje akrilamida zaključeno je da niže vrednosti pH snižavaju, dok više vrednosti pH povećavaju nivo akrilamida u hrani (Adimas *i sar.* 2024). U mehanizmu formiranja akrilamida kroz Majlardovu reakciju, procesi koji uključuju formiranje Šifovih baza, putem Amadori mehanizma premeštanja direktno su zavisni od pH vrednosti. Konverzija neprotonovane amino grupe u protonovanu amino grupu u uslovima kisele sredine blokira reakciju formiranja akrilamida, što posledično smanjuje sadržaj akrilamida u hrani. Nasuprot tome, u alkalnim uslovima, slobodna amino grupa podleže deprotonovanju, formirajući nukleofilne molekule koji mogu lako reagovati sa karbonilnom grupom redukujućih šećera, što inicira mehanizam Majlardove reakcije (Govindaraju *i sar.* 2024). Ove činjenice potvrđuju naučne studije koje dokazuju da se nivoi akrilamida drastično povećavaju u namirnicama pripremljenim uz korišćenje sredstava za podizanje testa poput natrijum-bikarbonata (pH ~ 8), dok se snižavaju u hlebu i keksima pripremljenim u uslovima nižih pH vrednosti (Adimas *i sar.* 2024). Takođe, proces

fermentacije snižava pH vrednost testa usled nastanka ugljendioksida, pa samim tim i doprinosi sprečavanju nastanka akrilamida. Ovo je slučaj kod pripreme testa sa kvascem (pH ~ 5) ili kod pripreme kiselog testa (pH 4,4-5). Prema tome, svaki proces obrade hrane ima uticaj na formiranje akrilamida u različitim namirnicama (Adimas *i sar.* 2024).

2.4.4. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage, koji predstavlja količinu nevezane vode u prehrambenim proizvodima, ima značajnu ulogu u procesu formiranja akrilamida tokom termičke obrade namirnica. Eksperimentalna istraživanja potvrđuju da se akrilamid ne formira prilikom kuvanja u vodi (temperature ispod 100 °C), što ukazuje na neophodnost viših temperatura i/ili uslova smanjene vlažnosti za njegovo nastajanje. Pri zagrevanju u atmosferskim uslovima, povišene temperature na površini namirnica najčešće se postižu kada se istovremeno odvija i proces sušenja, što je karakteristično za metode termičke obrade poput prženja, pečenja i pečenja na žaru. Gubitak vode tokom zagrevanja i sušenja namirnica apsorbuje značajan deo toplotne energije, zbog čega je unutrašnji deo proizvoda na znatno nižoj temperaturi u odnosu na temperaturu sredstva za zagrevanje. Stoga, temperatura, vreme i vlaga predstavljaju ključne faktore koji determinišu formiranje akrilamida u namirnicama tokom termičke obrade. Sadržaj vlage određuje fizičko stanje i mobilnost hemijskih sastojaka u matriksu hrane. Pored toga, voda direktno utiče na hemijske puteve i mehanizme formiranja akrilamida. Sa porastom temperature dolazi do smanjenja sadržaja vlage u namirnicama, što pospešuje formiranje akrilamida (Gökmen i Palazoğlu, 2008). Kod pekarskih proizvoda, sadržaj vlage značajno modifikuje koncentraciju akrilamida i karakteristike testa tokom procesa pečenja. Smanjeni sadržaj vlage se dovodi u vezu sa Majlardovom reakcijom, koja ima ključnu ulogu u procesu dekarboksilacije Amadori jedinjenja. Ova pojava potencira formiranje akrilamida u namirnicama usled izostanka inhibitornog efekta viška vode na reakciju. S obzirom na to da je sadržaj vlage na površinskom sloju namirnica znatno niži u poređenju sa unutrašnjošću, koncentracija nastalog akrilamida pokazuje tendenciju povećanja na spoljašnjim delovima prehrambenih proizvoda kao što su pomfrit, konditorski proizvodi, hleb, biskviti i gotovi proizvodi od žita (Govindaraju *i sar.* 2024).

2.4.5. Ostali faktori

Primena azotnih đubriva u poljoprivrednoj proizvodnji značajno doprinosi povećanju sadržaja prekursora akrilamida u biljkama, prvenstveno redukujućih šećera i asparagina. Studije su pokazale da je sadržaj akrilamida u pekarskim proizvodima značajno viši kada se koriste sirovine dobijene iz biljaka koje su đubrene azotnim đubrivima. Na primer, istraživanja su potvrdila da je sadržaj akrilamida u hlebu pripremljenom od pšenice đubrene sa 220 kg N/ha bio četiri puta veći u odnosu na hleb dobijen od pšenice koja nije bila đubrena (Murugan *i sar.* 2016). Ovi rezultati ukazuju na direktnu povezanost između intenzivne primene azotnih đubriva i povećane akumulacije akrilamida u prehrambenim proizvodima.

Klimatski faktori, uključujući temperaturu tokom vegetacionog perioda, takođe imaju značajan uticaj na formiranje akrilamida. Niske temperature u intervalu od 8 do 12 °C, kao i visoke temperature od 25 do 30 °C, dovode do povećanja nivoa akrilamida u prehrambenim proizvodima (Govindaraju *i sar.* 2024). Pored toga, istraživanja pokazuju da produženje vegetacionog perioda može doprineti smanjenju koncentracije akrilamida u krajnjem proizvodu, što ukazuje na važnost optimalnog vremena berbe u kontroli ovog kontaminanta.

Vrsta i trajanje skladištenja sirovina takođe igraju važnu ulogu u formiranju akrilamida. Kako bi se obezbedila dostupnost sirovina tokom cele godine, proizvođači moraju da ih skladište i

po nekoliko meseci. Krompir se obično skladišti na niskim temperaturama kako bi se sprečilo klijanje. Skladištenje sirovog krompira na niskim temperaturama (ispod 8 °C) može uzrokovati proces poznat kao "hladno zaslađivanje" (eng. *cold sweetening*), pri kome dolazi do povećane akumulacije heksoza, posebno glukoze i fruktoze. Ova pojava rezultira povećanim nivoima redukujućih šećera u sirovini, što može doprineti povećanom formiranju akrilamida tokom termičke obrade (García-Ríos *i sar.* 2023; Adimas *i sar.* 2024). Reverzibilno smanjenje nivoa redukujućih šećera može se postići skladištenjem krompira na 15 °C tokom tri nedelje nakon perioda niskotemperaturnog čuvanja (Murugan *i sar.* 2016).

Zrelost biljke i vreme žetve značajno utiču na sastav suve materije, odnos šećera i skroba, kao i nivo asparagina u sirovini. Rano ubrani plodovi krompira karakterišu se nižim sadržajem suve materije (16%) i višim koncentracijama redukujućih šećera u poređenju sa potpuno zrelim krtolama. Iako nivo asparagina varira u uskom opsegu, koncentracija šećera može značajno oscilovati u zavisnosti od sorte, uslova uzgoja i skladištenja (Murugan *i sar.* 2016). Optimalan izbor faze zrelosti u trenutku berbe može značajno doprineti smanjenju sadržaja akrilamida u finalnim proizvodima.

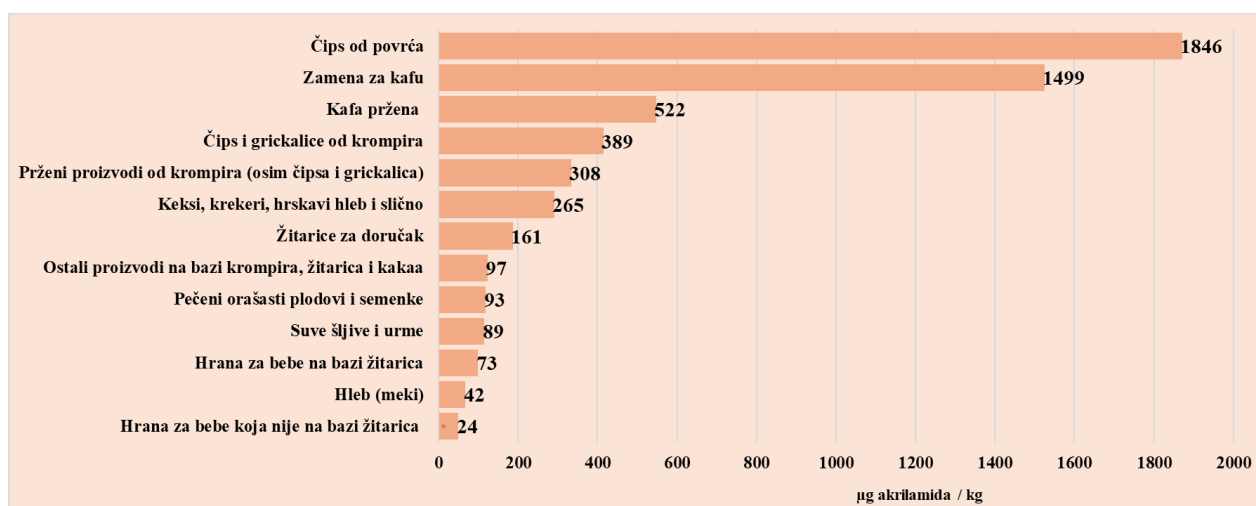
Sastav prehrambenih proizvoda i prisustvo određenih manjih sastojaka mogu direktno uticati na količinu akrilamida. Studije su pokazale da dodavanje pečenih badema, susama i semenki maka u pekarske proizvode povećava nivo akrilamida, dok dodatak lešnika nema značajan uticaj (Weisshaar *i sar.* 2004). Takođe, način dodavanja ovih sastojaka igra važnu ulogu. Ukoliko se oni nalaze na površini proizvoda, njihova izloženost visokoj temperaturi tokom pečenja može dodatno povećati akrilamidni sadržaj.

Promene u formulaciji proizvoda, kao što su modifikacija sastava žitarica, prisustvo različitih vrsta šećera i začina, mogu imati pozitivan ili negativan efekat na formiranje akrilamida (FoodDrinkEurope, 2019). Stoga je optimizacija sastava prehrambenih proizvoda jedna od važnih strategija za smanjenje ovog kontaminanta u finalnom proizvodu.

2.5. Zastupljenost akrilamida u hrani

Brojne naučne studije potvrdile su prisustvo akrilamida u širokom spektru namirnica koje su bogate skrobom i podvrgnute visokim temperaturama tokom obrade, posebno kada se primenjuju metode pripreme kao što su prženje ili pečenje. Rezultati opsežnih istraživanja nedvosmisleno ukazuju da je akrilamid prisutan u velikom broju svakodnevnih prehrambenih proizvoda, pri čemu njegova koncentracija pokazuje značajnu varijabilnost, kako među različitim vrstama namirnica, tako i na regionalnom nivou, što se može pripisati razlikama u lokalnim normama i praksama prehrambene industrije. Najviše koncentracije akrilamida zabeležene su prevashodno u proizvodima na bazi krompira i kafi, a potom u namirnicama bogatim cerealijama. Ova korelacija može se objasniti većim sadržajem redukujućih šećera i aminokiseline asparagina u krompiru u poređenju sa žitaricama, s obzirom na to da ova jedinjenja predstavljaju glavne prekursore u formiranju akrilamida. Značajno je istaći da su istraživanja pokazala da hrana biljnog porekla sadrži veće količine akrilamida u odnosu na namirnice životinjskog porekla. Shodno tome, termički obrađena hrana bogata proteinima karakteriše se nižim sadržajem akrilamida u poređenju sa namirnicama koje obiluju ugljenim hidratima (Friedman 2003; Bent *i sar.* 2012). Posebno je važno naglasiti da u sirovim i kuvanim namirnicama akrilamid nije detektovan, što nedvosmisleno potvrđuje činjenicu da se njegovo formiranje odvija isključivo tokom termičke obrade na temperaturama iznad 120 °C (Raffan i Halford, 2019). Meta-analiza koju su sprovedi Mousavi Khaneghah *i sar.* (2022), zasnovana na temeljnom pregledu 47 naučnih članaka obuhvatajući 230 pojedinačnih studija, pruža sveobuhvatan uvid u distribuciju akrilamida među različitim kategorijama prehrambenih proizvoda. Rezultati ove

opsežne analize omogućavaju precizan uvid u rangiranje namirnica prema prosečnom sadržaju akrilamida. Najviše koncentracije akrilamida zabeležene su u hrani na bazi krompira, koja prednjači sa prosečnom vrednošću od 740,33 mg/kg. Nakon nje sledi pržena hrana sa 328,65 mg/kg, dok treće mesto zauzimaju gotovi proizvodi od žita (žitarice za doručak) sa 263,27 mg/kg. Kafa i čokolada pokazuju slične vrednosti, sa koncentracijama od 234,54 mg/kg odnosno 233,68 mg/kg. Posebno je značajno da je hrana za bebe takođe svrstana među namirnice sa značajnim sadržajem akrilamida, sa prosečnom vrednošću od 156,30 mg/kg. U kategoriji pekarskih proizvoda, hleb sadrži prosečno 133,12 mg/kg, dok biskviti i deserti pokazuju vrednosti od 116,42 mg/kg odnosno 109,27 mg/kg. Niže koncentracije akrilamida zabeležene su u tortama (75,65 mg/kg) i ostaloj hrani na bazi žitarica (59,48 mg/kg). Najniži sadržaj akrilamida među analiziranim kategorijama namirnica ustanovljen je u orašastim plodovima, sa prosečnom vrednošću od samo 20,38 mg/kg (Mousavi Khaneghah *i sar.* 2022). Takođe, značajno je pomenuti i izveštaj Evropske agencije za sigurnost hrane iz 2015. godine koji pruža detaljan pregled nivoa akrilamida u hrani, prikupljen od strane šest prehrambenih asocijacija i država članica EU (EFSA CONTAM Panel, 2015). Ovaj izveštaj omogućava uvid u bitne aspekte koji se odnose na distribuciju akrilamida u širokom spektru namirnica (**Slika 4**). Prema ovim podacima, najviši nivoi akrilamida zabeleženi su u čipsu od povrća, sa prosečnom koncentracijom od 1846 µg/kg, dok je prosečna vrednost u grupi proizvoda zamena za kafu iznosila 1499 µg/kg. Visoke prosečne vrednosti su zabeležene u grupi proizvoda zamena za kafu na bazi cikorije (2942 µg/kg).

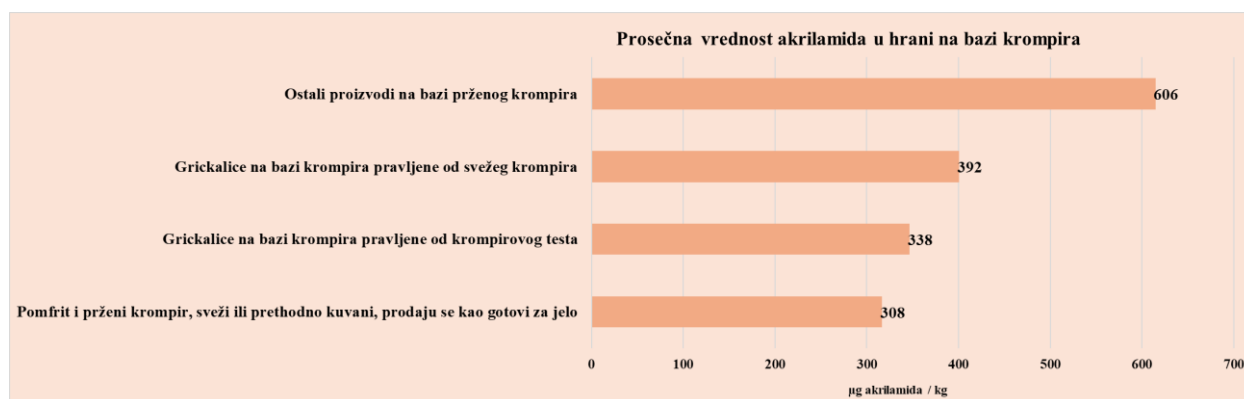


Slika 4. Zastupljenost akrilamida u različitim grupama namirnica (EFSA CONTAM Panel, 2015).

2.5.1. Zastupljenost akrilamida u hrani na bazi krompira

Proizvodi od krompira predstavljaju jedan od najznačajnijih izvora akrilamida u ishrani. Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane iz 2013. godine, proizvodi na bazi krompira doprinose sa čak 50% ukupnom unosu akrilamida putem ishrane, dok, za poređenje, hleb i srodni proizvodi sadrže znatno niže vrednosti i čine oko 20% ukupnog unosa. Detaljnija analiza EFSA pokazuje da je prosečna koncentracija akrilamida u prženim proizvodima od krompira (isključujući čips i grickalice) 308 µg/kg. Najniži nivoi zabeleženi su u kategoriji „pomfrit i prženi krompir, svež ili prethodno kuvani“ (prosečno 239 µg/kg), dok su najviše koncentracije pronađene u grupi „ostali prženi proizvodi od krompira“ koja uključuje palačinke od krompira (prosečno 606 µg/kg). Više koncentracije akrilamida su detektovane u prženim proizvodima od krompira napravljenim od svežeg krompira (prosečno 275 µg/kg) u poređenju sa onima napravljenim od krompirnog testa (prosečno 197 µg/kg). Međutim, nije uočena značajna razlika između pomfrita pečenog u rerni (prosečno 257 µg/kg) i duboko prženog pomfrita (prosečno 243 µg/kg). Kada je reč o čipsu i grickalicama od

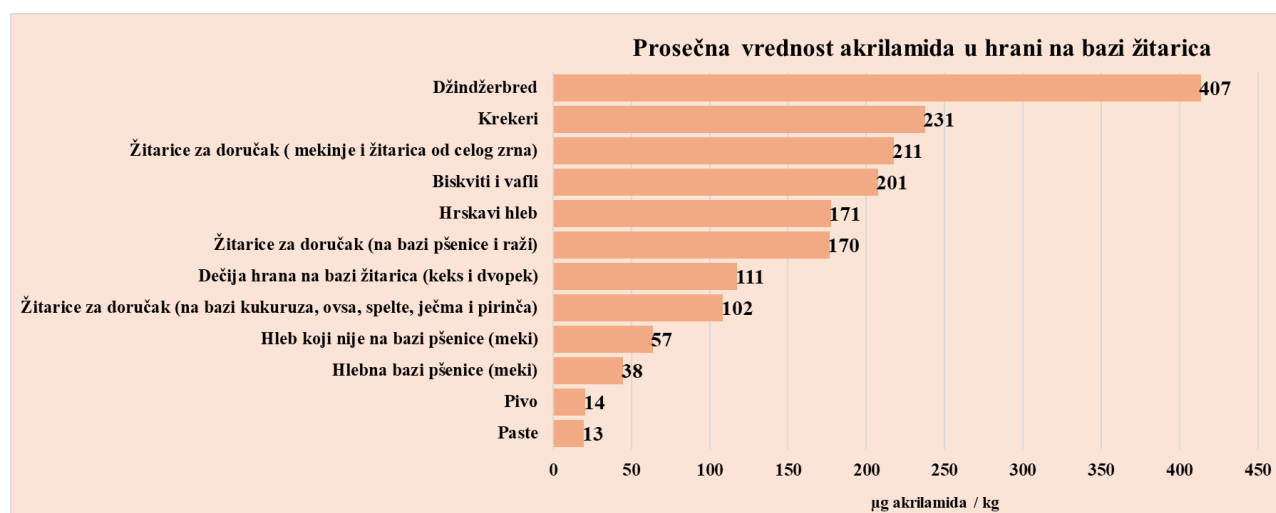
krompira, prosečna koncentracija akrilamida iznosi 389 $\mu\text{g/kg}$ (EFSA CONTAM Panel, 2015). Čips proizveden od svežeg krompira sadrži više akrilamida (prosečno 392 $\mu\text{g/kg}$) u poređenju sa čipsom napravljenim od krompirnog testa (prosečno 338 $\mu\text{g/kg}$). Takođe, niže koncentracije akrilamida zabeležene su u čipsu proizvedenom šaržnim procesom (prosečno 327 $\mu\text{g/kg}$) nego u onom proizvedenom kontinuiranim procesom (prosečno 387 $\mu\text{g/kg}$). Na **Slici 5** dat je grafički prikaz zastupljenosti akrilamida u različitim grupama namirnica na bazi krompira (EFSA CONTAM Panel, 2015)



Slika 5. Zastupljenost akrilamida u različitim grupama namirnica na bazi krompira (EFSA CONTAM Panel, 2015).

2.5.2. Zastupljenost akrilamida u hrani na bazi žitarica

Proizvodi na bazi žitarica predstavljaju izuzetno široku i raznovrsnu grupu namirnica namenjenih ljudskoj ishrani, koja zauzima centralno mesto u svakodnevnoj ishrani većine stanovništva. Iako su detektovane koncentracije akrilamida u ovim namirnicama generalno niže u poređenju sa proizvodima na bazi krompira, njihov značaj kao izvora akrilamida u ishrani ne treba potcenjivati, prvenstveno zbog njihove visoke učestalosti konzumiranja. Prema podacima EFSA iz 2015. godine koncentracije akrilamida značajno variraju među različitim kategorijama proizvoda na bazi žitarica (EFSA CONTAM Panel, 2015). Na **Slici 6** dat je grafički prikaz zastupljenosti akrilamida u različitim kategorijama namirnica na bazi žitarica.



Slika 6. Zastupljenost akrilamida u različitim grupama namirnica na bazi žitarica (EFSA CONTAM Panel, 2015).

U okviru ove grupe namirnica posebno se ističu pekarski proizvodi, među kojima su hleb, fini pekarski proizvodi (keks, krekeri, čajna peciva, biskviti, vafli, kolači itd.), kao i gotovi proizvodi od žita, koje čine neizostavan deo prehrambenih navika savremenog čoveka.

2.5.2.1. Fini pekarski proizvodi

Prema dostupnim podacima, pekarski proizvodi doprinose sa približno 25% ukupnoj dnevnoj izloženosti akrilamidu i generalno sadrže znatno više koncentracije akrilamida u poređenju sa hlebom (Claus *i sar.* 2008).

Ovo se može pripisati kombinaciji više faktora:

- većem sadržaju redukujućih šećera koji učestvuju u Majlardovoj reakciji;
- višim temperaturama pečenja (često iznad 180 °C);
- nižem sadržaju vlage u finalnom proizvodu;
- čestoj upotrebi amonijum-bikarbonata kao sredstva za narastanje testa, koji dokazano potencira formiranje akrilamida.

Dodatno, duže vreme pečenja i veći odnos površine prema zapremini kod ovih proizvoda pogoduje intenzivnijem formiranju akrilamida u površinskim slojevima gde su temperature najviše (Boyaci Gunduz, 2023).

2.5.2.2. Hleb kao izvor akrilamida

Među proizvodima na bazi žitarica, hleb zauzima posebno mesto, kako sa aspekta svakodnevnog unosa, tako i sa aspekta doprinosa ukupnoj dijetalnoj izloženosti akrilamidu. Hleb predstavlja jednu od najstarijih i najrasprostranjenijih osnovnih prehrambenih namirnica širom sveta, prisutnu u različitim oblicima, ukusima i nutritivnim profilima. Globalna prosečna potrošnja hleba iznosi oko 70 kg po osobi godišnje (De Boni *i sar.* 2019). Prema Ginisovoj knjizi rekorda (Gündüz i Cengiz, 2015), 2000. godine Srbija je bila druga u svetu po potrošnji hleba sa 135 kg po stanovniku godišnje, odmah iza Turske. Podaci novijeg datuma pokazuju da prosečan dnevni unos hleba u Srbiji iznosi 0,17 kg/dan (Republički zavod za statistiku, 2023), što je gotovo identično prosečnoj evropskoj potrošnji (0,18 kg/dan) (Mihai *i sar.* 2020). Upravo zbog ovako visoke potrošnje, hleb iako sam po sebi sadrži umerene koncentracije akrilamida u odnosu na ostale proizvode na bazi žitarica, postaje jedan od najvažnijih pojedinačnih izvora ukupnog unosa ovog kontaminanta (Forstova *i sar.* 2014). Veliki broj naučnih studija sproveden je sa ciljem kvantifikacije sadržaja akrilamida u različitim vrstama hleba, analizirajući faktore koji utiču na njegovu koncentraciju i mogućnosti za njegovo redukovanje. Prikaz relevantnih istraživanja iz prethodnih godina dat je u **Tabeli 2**.

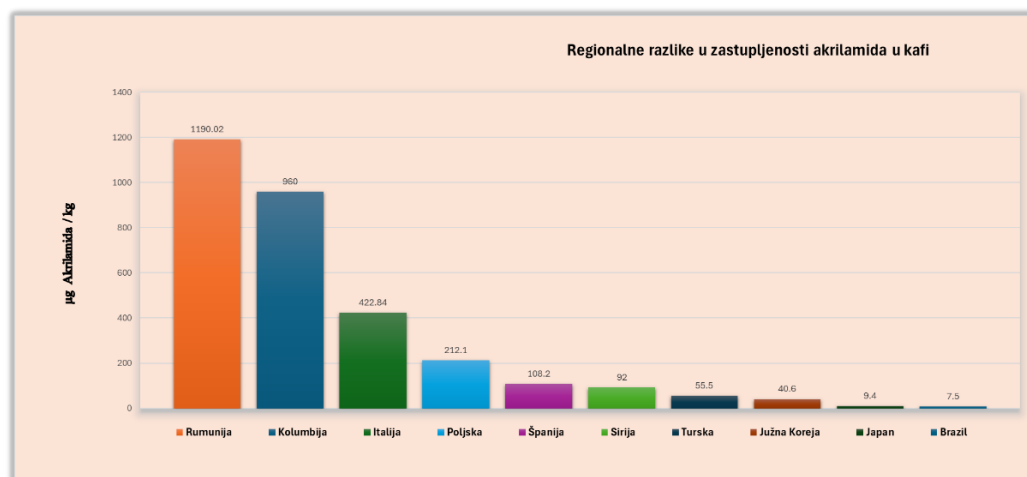
Tabela 2. Zastupljenost akrilamida u hlebu-pregled literature.

Tip hleba	Poreklo	Analitička metoda	Analitički opseg	Srednja koncentracija	Referenca
			(µg/kg)		
pšenični	Turska	GC-MS/MS	81,7	61–130	Basaran <i>i sar.</i> 2022
tost	Mađarska	LC-MS/MS	<20	/	Tölgyesi i Sharma, 2020
meki, pšenični	Poljska	GC-MS	5,7-65	26,9	Roszkó <i>i sar.</i> 2020
ne-pšenični	Poljska	GC-MS	3,6-163	42,6	Roszkó <i>i sar.</i> 2020
pšenični	Rumunija	GC-MS/MS	5,63-45,01	/	Mihai <i>i sar.</i> 2020
ne-pšenični	Rumunija	GC-MS/MS	21,78-74,17	/	Mihai <i>i sar.</i> 2020
pšenični	Rumunija	LC-MS/MS	9,80-17,30	13,63	Pogurschi <i>i sar.</i> 2021
pšenični	Iran	LC-MS/MS	<1 (LOQ)-83,3	24,4	Eslamizad <i>i sar.</i> 2019
meki, pšenični i ne-pšenični	Češka	LC-MS/MS	7-22	16	Forstova <i>i sar.</i> 2014
tost i hleb	Slovenija	GC-MS	44,5- 246,1	134,8	Mencin <i>i sar.</i> 2020
pšenični	Hrvatska	LC-MS/MS	<20 (LOQ)-30	21	Andačić <i>i sar.</i> 2020
ne-pšenični	Hrvatska	LC-MS/MS	<20 (LOQ)-42	27	Andačić <i>i sar.</i> 2020

Istraživanja pokazuju da na formiranje akrilamida u hlebu utiču brojni faktori kao što su: sastav sirovina, način pripreme (temperatura, vlaga, vreme), kao i dodatak različitih aditiva (Nasiri Esfahani *i sar.* 2017; Gazi *i sar.* 2023; El-Zakhem Naous *i sar.* 2018). Prema EFSA studiji iz 2015. godine, prosečni nivoi akrilamida u hlebu značajno variraju u zavisnosti od tipa proizvoda (EFSA CONTAM Panel, 2015). Tako je meki hleb sadržao prosečno 42 µg/kg, dok je u hrskavom hlebu koncentracija iznosila čak 171 µg/kg. Prosečna vrednost koncentracije akrilamida u uzorcima netostiranog hleba, namenjenog za tostiranje, bila približno jednaka vrednostima detektovanim u mekom hlebu. Takođe, primećena je jasna razlika u sadržaju akrilamida u hlebu u zavisnosti od vrste žitarica od kojih je napravljen. Niže koncentracije akrilamida izmerene su u mekom (38 µg/kg) i hrskavom hlebu (126 µg/kg) na bazi pšenice, dok su viši nivoi zabeleženi u mekom (57 µg/kg) i hrskavom hlebu (245 µg/kg) na bazi raži (EFSA CONTAM Panel, 2015). Ova razlika se može objasniti većim sadržajem slobodnog asparagina u raži, koji je ključni prekursor u formiranju akrilamida tokom termičke obrade.

2.5.3. Zastupljenost akrilamida u kafi

Proces prženja kafe predstavlja važnu fazu u obradi ovog popularnog napitka, tokom koje dolazi do formiranja karakteristične boje, kompleksne arome i prepoznatljivog ukusa. Ovi senzorni atributi nastaju kao rezultat Majlardove reakcije, pri čemu je formiranje akrilamida tokom ovog procesa neminovno. Obim nastanka akrilamida u kafi determinisan je kako koncentracijom prekursora prisutnih u zelenom zrnu, tako i specifičnim uslovima prženja i naknadnog skladištenja. Istraživanja su pokazala da tokom procesa prženja koncentracija akrilamida najpre pokazuje tendenciju rasta, nakon čega sledi opadanje, što se pripisuje postupnoj potrošnji prekursora. U svojoj opsežnoj studiji, Başaran i saradnici (2020) utvrdili su značajna variranja u nivoima akrilamida u različitim vrstama kafe: u instant kafi zabeležene su vrednosti od 16,5 do 79,5 ng/mL, u kuvanoj kafi spremnoj za piće od 5,9 do 38,8 ng/mL, dok je u turskoj kafi i drugim tradicionalnim pripremama sadržaj akrilamida iznosio između 5,3 i 54,8 ng/mL. Komplementarni rezultati ukazuju da se koncentracija akrilamida u napicima od kafe kreće u rasponu od 7,7 do 40 µg/L. Značajna variranja u sadržaju akrilamida u kafi mogu se pripisati raznim faktorima, među kojima se posebno ističu razlike u sorti kafe (Arabika ili Robusta), stepen zrelosti zrna, intenzitet i specifični uslovi prženja (prvenstveno u pogledu vremena trajanja i primenjene temperature), kao i vremenski period skladištenja i metoda pripreme napitka. Značajan doprinos sistematizaciji naučnih saznanja u ovoj oblasti dali su Mousavi Khaneghah *i sar.* (2022), koji su pružili detaljan pregled studija sprovedenih u različitim zemljama, fokusiranih na kvantifikaciju sadržaja akrilamida u kafi. Distribucija rezultata ovih istraživanja ilustrovana je grafički na **Slici 7**, omogućavajući komparativni uvid u regionalne varijacije koncentracije ovog jedinjenja u jednom od najkonzumiranih napitaka na globalnom nivou.



Slika 7. Pregled koncentracija akrilamida u kafi prema podacima iz različitih zemalja (Mousavi Khaneghah *i sar.* 2022).

2.5.4. Ostali proizvodi u kojima je detektovano prisustvo akrilamida

Koštunjavo voće i semenke: više naučnih studija potvrdilo je prisustvo akrilamida u orašastim plodovima (bademi, pistači, lešnici, kikiriki) i suvom voću kao što su kajsije, šljive i urme (De Paola *i sar.* 2017). Studije potvrđuju da je razlog tome visok sadržaj prekursora i termička obrada kojoj se ti proizvodi podvrgavaju (npr. sušenje, blanširanje i pečenje) radi poboljšanja njihovih senzornih svojstava i stabilnosti tokom skladištenja. U slučaju pečenih orašastih plodova, znatno visoka temperatura pečenja (160-180 °C) i vreme (25-30 min) su ključni faktori za formiranje akrilamida. Proces sušenja voća, s druge strane, obično se odvija na relativno niskoj temperaturi (70-80 °C), ali je trajanje izlaganja toploti dovoljno dugo (24-36 h) da omogući formiranje akrilamida. Pored toga, proces sušenja (do oko 20% vlage) povećava koncentraciju šećera i asparagina, što može da podstakne formiranje akrilamida (De Paola *i sar.* 2017). Prema Nematollahi *i sar.* (2020), sadržaj akrilamida u 17 uzoraka pečenih orašastih plodova, uključujući kikiriki, bademe, pistače i lešnike, varirao je od 83,4 do 250,9 mg/kg. Najveća srednja vrednost akrilamida je pronađena u prženim bademima sa koncentracijom od 176,9 mg/kg, a najmanja u pečenim lešnicima sa koncentracijom od 90,6 mg/kg. Koncentracija akrilamida u sušenom voću kretala se od < LOQ za urme, sultanije i brusnice, do 141 mg/kg za šljive u analizi 28 komercijalnih uzoraka (Surma *i sar.* 2018).

Stone masline: vezano za ovu grupu namirnica EFSA je u studiji iz 2015. godine izdvojila crne masline u salamuri kao potencijalni izvor akrilamida, zbog toga što ove namirnice sadrže slične ili čak više nivoe od onih pronađenih u drugim prehrambenim proizvodima poput pomfrita, žitarica ili kafe (EFSA CONTAM Panel, 2015). Međutim, koncentracije akrilamida u stonim maslinama mogu značajno varirati između različitih komercijalnih konzerviranih crnih zrelih maslina sa zabeleženim vrednostima od 243 do 1349 µg/kg (Casado *i sar.* 2010).

Namirnice životinjskog porekla: postoje studije koje su objavile koncentracije akrilamida u proizvodima od mesa i to 11 µg/kg (Sirot *i sar.* 2012) i 14 µg/kg (Delgado-Andrade *i sar.* 2012; Lambert *i sar.* 2018), kao i u proizvodima koji sadrže jaja i meso 36 µg/kg (Delgado-Andrade *i sar.* 2012). Ove koncentracije akrilamida su posledica dodavanja hlebnih prezli i/ili brašna, koje predstavljaju adekvatan supstrat za formiranje akrilamida, kao i samog načina pripreme koji uključuje prženje. Ovo je još jedan dokaz do koje mere nivo akrilamida u hrani zavisi od sirovina i načina pripreme.

2.6. Metabolizam i toksični efekti akrilamida

Do sada su brojne studije pokazale da akrilamid i njegov visoko reaktivni metabolit, glicidamid, mogu izazvati višestruke oblike toksičnosti, uključujući oštećenje DNK, neurotoksičnost, genotoksičnost, negativne efekte na reproduktivni sistem i karcinogenost (Matoso *i sar.* 2019; Pundir *i sar.* 2019). Nakon unosa, akrilamid se brzo apsorbuje kroz digestivni sistem i distribuira u različita tkiva tela putem krvotoka (Khorshidian *i sar.* 2020). U jetri, enzimi citohrom P450 2E1 pretvaraju akrilamid u glicidamid, njegov reaktivniji epoksidni oblik (Aydin, 2018; 2005; El-Zakhem Naous *i sar.* 2018). Glicidamid potom može formirati konjugovane proizvode sa malim molekulima poput glutaciona, glavnog supstrata za formiranje merkapturonokiselinskih metabolita koje telo eliminiše putem urina (Fennell i Friedman, 2005; Tekkeli *i sar.* 2012). Fennell *i sar.* (2006) su potvrdili prisustvo glicidamida u ljudskom urinu nakon izlaganja akrilamidu putem ishrane. Posebno zabrinjavajuća je sposobnost akrilamida i glicidamida da formiraju adukte sa funkcionalnim grupama DNK ($-SH$, $-OH$, $-NH_2$), što dovodi do oksidativnog oštećenja i genotoksičnosti. Neurotoksični efekti akrilamida i njegovih jedinjenja su takođe dokumentovani kod ljudi, manifestujući se kroz promene na nukleotidima i proteinama u neuronima, što naknadno inhibira sintezu proteina u nervnom tkivu (Da Costa *i sar.* 2003; Khorshidian *i sar.* 2020; Park *i sar.* 2002). U krvi, poluvreme života akrilamida iznosi oko dva časa. U tkivima, ukupni akrilamid (osnovno jedinjenje i metaboliti) pokazuje dvofazno uklanjanje sa približnim primarnim poluvremenom života od 5 časova i terminalnim poluvremenom života od 8 dana. Važno je napomenuti da do sada nisu dokazane osobine bioakumulacije akrilamida u organizmu (Peivasteh-Roudsari *i sar.* 2024). Izloženost akrilamidu se obično određuje utvrđivanjem koncentracije adukata hemoglobina sa akrilamidom i glavnim metabolitom glicidamidom (Peivasteh-Roudsari *i sar.* 2024). Prema toksikološkim studijama, približno 60% propisane doze akrilamida može se detektovati u urinu u roku od 24 časa. Značajno je da preko 90% apsorbovanog akrilamida čini urinarno izlučivanje u vidu metabolita u ljudskom organizmu, dok se manje od 2% izbacuje kao nepromenjen akrilamid. Bilijarna i fekalna izlučivanja čine manji procenat ukupnog eliminisanog akrilamida (Erkekoglu and Baydar 2010).

2.6.1. Neurotoksičnost

Važna meta toksičnih uticaja akrilamida je nervni sistem. Česta izloženost akrilamidu povezana je sa poremećajima pamćenja, učenja i kognitivnim disfunkcijama, jer dolazi do degeneracije perifernih nerava i nervnih završetaka u određenim regionima mozga (moždana kora, hipokampus i hipotalamus) (Matoso *i sar.* 2019). Oštećenja centralnog i perifernog nervnog sistema kod ljudi primećena su nakon dugotrajne izloženosti akrilamidu putem profesionalnih i akcidentalnih puteva izlaganja (Nematollahi *i sar.* 2020). Erkekoglu i Baydar (2014) zaključuju da se neurotoksičnost akrilamida može ispoljiti na tri načina:

- direktnom inhibicijom neurotransmisije;
- promenom nivoa neurotransmitera;
- supresijom kinezin-zavisnog brzog aksonalnog transporta.

Nedostatak koordinacije, gubitak težine, slabost skeletnih mišića, predstavljaju opšte simptome neurološkog oštećenja usled izloženosti ljudi akrilamidu. Prijavljeni su teški simptomi centralnog nervnog sistema povezani sa akutnom i subakutnom izloženošću visokim dozama akrilamida, uključujući konfuziju, pospanost, dezorijentaciju, gubitak pamćenja i halucinacije. Kod dugotrajne izloženosti akrilamidu mogu se pojaviti karakteristični simptomi periferne polineuropatije, kao što su trnjenje prstiju, utrnulost donjih ekstremiteta, smanjena osetljivost na ubod iglom, preosetljivost na dodir, gubitak osećaja vibracije i slabost ili odsustvo tetivnih refleksa (Rifai i Saleh, 2020). Interakcija akrilamida sa kinezinom, motornim proteinom koji je prisutan u

neuronima, može oštetiti brzi anterogradni prenos faktora rasta nerava iz ćelijskog tela ka periferiji, što dovodi do smrti neurona. Akrilamid negativno utiče na apsorpciju neurotransmitera u strijatalne sinaptičke vezikule, prvenstveno zbog interakcije sa sulfhidrilnim grupama na određenim proteinima, što remeti presinaptičko oslobađanje neurotransmitera (Kumar *i sar.* 2018).

2.6.2. Karcinogenost i genotoksičnost

Prema dokumentovanim karcinogenim svojstvima kod eksperimentalnih životinja, Međunarodna agencija za istraživanje raka klasifikovala je akrilamid kao „verovatno karcinogen za ljude“ (Grupa 2A) (IARC 1994). Ipak, brojne epidemiološke studije o profesionalnoj izloženosti akrilamidu nisu pružile stabilne i pouzdane dokaze o karcinogenosti kod ljudi (Peivasteh-Roudsari *i sar.* 2024). Tačan mehanizam karcinogenih efekata akrilamida još uvek nije potpuno razjašnjen. Kao multi-organski karcinogen, akrilamid deluje preko svog reaktivnog epoksida, glicidamida, koji formira DNK adukte i uzrokuje razvoj tumora kod glodara. Neki epidemiološki dokazi ukazali su na moguću vezu između hronične izloženosti akrilamidu i povećanog rizika od raka jajnika i dojke, hiperplazije endometrijuma i ginekoloških karcinoma (Capuano i Fogliano, 2011). Ipak, epidemiološke studije sprovedene do danas su ograničene i do sada nisu dale ubedljive podatke o povezanosti ljudskih karcinoma sa izloženošću ovom kontaminantu u hrani (Peivasteh-Roudsari *i sar.* 2024). Konverzija akrilamida u glicinamid čini ga štetnijim u pogledu genotoksičnosti i karcinogenosti, jer je glicinamid visoko mutagen u poređenju sa akrilamidom. Glicinamid može indukovati tačkaste mutacije u enzimima putem alkilacije DNK, što dovodi do narušavanja različitih fizioloških odgovora. Akrilamid može izmeniti funkcije proteina vezivanjem za cisteinske ostatke u proteinima. Dodatno, deluje kao Majklov akceptor stvarajući adukte sa -SH, -OH i -NH₂ grupama u DNK, što rezultira oštećenjem DNK (Pundir *i sar.* 2019; Adani *i sar.* 2020). Doprinos mutageneze povezane sa akrilamidom ljudskim karcinomima ispitivali su Zhivagui i saradnici (2019). Eksperimentalno su identifikovali novu karakterističnu mutaciju nastalu delovanjem akrilamida kroz aktivnost glicinamida. Mutacijski potpis glicinamida pronađen je u jednoj trećini od približno 1600 ispitanih genoma tumora. Najveće povećanje glicinamida mutacijskih potpisa uočeno je kod karcinoma pluća (88%), jetre (73%), bubrega (>70%), žučnih puteva (57%) i grlića materice (50%) (Zhivagui *i sar.* 2019). Globalnim sistematskim pregledom Filippini je sa saradnicima pokazao je da ne postoji dozno-zavisna povezanost između visoke dijetetske izloženosti akrilamidu i različitih karcinoma specifičnih za određene lokacije u opštoj populaciji, zbog relativno niskog dijetalnog izlaganja akrilamidu u opštoj populaciji (dnevni unos od 6,8–44,1 µg; što odgovara do oko 0,7 µg/kg telesne težine dnevno) u poređenju sa toksičnim nivoima akrilamida u studijama na životinjama (50 mg/kg telesne težine dnevno) (Filippini *i sar.* 2022). Drugi sistematski pregled koji su sprovedli Atabati i saradnici (2020) ukazao je na zanemarljiv rizik od raka dojke u definisanim podgrupama izloženim visokom unosu akrilamida zbog konzumacije kafe. Oprečni rezultati u prethodnim studijama mogu se objasniti razlikama u obrascu konzumiranja hrane u različitim starosnim grupama, uticajem interferirajućih agenasa na metabolizam akrilamida (kao što su antioksidativna svojstva kojima matriks hrane može prevazići toksičnost akrilamida), kulturom ishrane u različitim geografskim regionima i nedostatkom procene istovremenog prisustva drugih karcinogena iz hrane u matriksu hrane (Atabati *i sar.* 2020; Filippini *i sar.* 2022; Başaran *i sar.* 2023).

2.6.3. Toksično delovanje akrilamida na reproduktivni sistem

Toksično delovanje akrilamida na ljudsku reprodukciju nije u potpunosti razjašnjeno. Dokazano je da kontakt sa većim količinama akrilamida izaziva toksični uticaj na reproduktivnu sposobnost kod eksperimentalnih životinja (Kumar *i sar.* 2018). Testirani su različiti parametri kako bi se procenili mogući toksični efekti akrilamida na reproduktivni sistem. Rezultati upućuju na to da

akrilamid može negativno uticati reproduktivnu sposobnost kod muškaraca usled transformacije akrilamida u glicidamid, što predstavlja značajan korak u akrilamid-indukovanoj mutaciji u germinativnim i somatskim ćelijama. Kratkotrajna izlaganja akrilamidu u visokim dozama mogu izazvati širok spektar testikularne toksičnosti kod mužjaka pacova, uglavnom karakterisane smanjenim indeksom parenja, abnormalnim spermatozoidima, značajnim smanjenjem koncentracije epididimalnih spermatozoida, promenama u razvoju i pokretljivosti spermatozoida, degeneracijom germinativnih ćelija, stvaranjem multinuklearnih džinovskih i apoptotičnih ćelija u seminiferim tubulama, i smanjenim preživljavanjem Lajdigovih ćelija (Recio *i sar.* 2017; Kalaivani *i sar.* 2018). Kao jedinjenje male molekulske mase koje se lako rastvara u vodi, akrilamid može proći kroz placentu i majčino mleko kod životinja i ljudi, utičući na normalan prenatalni i rani postnatalni razvoj novorođenčadi (Semla *i sar.* 2017).

2.7. Kvantifikacija akrilamida u hrani

Kvantifikacija akrilamida u hrani predstavlja značajan izazov zbog njegovih specifičnih fizičko-hemijskih karakteristika: male molekulske mase, visoke polarnosti i rastvorljivosti u vodi, visoke reaktivnosti i niske isparljivosti (Oracz *i sar.* 2011). Dodatni izazov predstavlja raznolikost i složenost matriksa termički obrađene hrane bogate ugljenim hidratima, kao i sam postupak ekstrakcije uzoraka. Postupci kvantifikacije akrilamida u hrani moraju dati pouzdane kvantitativne podatke. Pored toga, trebalo bi da budu ekonomični i pogodni za rutinsku primenu (robustni). Do sada su u literaturi kao pouzdane metode za analizu i detekciju akrilamida opisane instrumentalne analize zasnovane na hromatografiji i masenoj spektrometriji, uključujući tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC), gasnu hromatografiju (GC), tečnu hromatografiju sa tandemnom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), gasnu hromatografiju-masenu spektrometriju (GC-MS), kao i gasnu hromatografiju sa tandemnom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS). Pored instrumentalnih analiza zasnovanih na hromatografiji i masenoj spektrometriji, koje su najzastupljenije u literaturi, takođe se pominju i metode analize zasnovane na kapilarnoj elektroforezi (CE), spektroskopske i imunoenzimske metode (ELISA) (Oracz *i sar.* 2011; Elbashir *i sar.* 2014). Generalno, postupak pripreme i analize akrilamida može se svesti na sledeće faze: homogenizacija uzorka, dodavanje internog standarda (opciono), ekstrakcija uzorka, prečišćavanje i koncentrovanje ekstrakta uzorka (opciono) i konačno sama analiza (**Slika 8**).



Slika 8. Šematski prikaz pripreme i analize uzorka akrilamida u hrani.

Zvanična standardna metoda kvantifikacije akrilamida u hrani EN 16618 objavljena je 2015. godine od strane Evropskog komiteta za standardizaciju (eng. *European Committee on Standardisation-CEN*). Ista metoda je bila izdata 2015. godine od strane Instituta za standardizaciju Srbije (ISS) pod oznakom SRPS EN 16618. Pomenuta standardna metoda je zasnovana na kvantifikaciji akrilamida primenom instrumentalne analize zasnovane na tečnoj hromatografiji i tandemnoj masenoj spektrometriji (LC-MS/MS) i validovana je međulaboratorijskim ispitivanjem u opsegu od 14,3 µg/kg do 9083 µg/kg.

2.7.1. Metode ekstrakcije

Priprema uzoraka predstavlja jedan od važnih koraka u analitičkom postupku određivanja akrilamida u hrani, pri čemu uslovi ekstrakcije imaju presudnu ulogu u efikasnosti celokupne analitičke procedure (Elbashir *i sar.* 2014). Tokom proteklih godina, značajan broj istraživanja bio je usmeren ka razvoju optimizovanih metoda ekstrakcije, uz istovremeno unapređenje tehnika hromatografskog razdvajanja i maseno-spektrometrijske detekcije. Na efikasnost ekstrakcije akrilamida iz uzoraka hrane utiče niz faktora, uključujući granulaciju uzorka, procedure odmašćivanja, izbor ekstrakcionog sredstva, odnos rastvarača i uzorka, postupak homogenizacije, način i vreme trajanja ekstrakcije, kao i temperaturu na kojoj se proces odvija (Elbashir *i sar.* 2014).

2.7.1.1. Načini ekstrakcije

Za ekstrakciju akrilamida iz kompleksnih matriksa hrane razvijen je širok spektar metoda, koje se razlikuju prema tehničkom pristupu i uslovima izvođenja. Najčešće primenjivane tehnike su: ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija na horizontalnoj i rotacionoj mešalici, homogenizacija pomoću Ultra Turrax sistema, primena vorteks oscilatora ili vibratora, kao i ekstrakcija u termostatskom vodenom kupatilu (Elbashir *i sar.* 2014). Izbor optimalne metode često zavisi od specifičnih karakteristika uzorka i ciljne instrumentalne tehnike za analizu.

2.7.1.2. Izbor ekstrakcionog sredstva

Ekstrakciona sredstva koja se koriste za izolovanje akrilamida iz hrane mogu se podeliti u dve osnovne kategorije: voda i organski rastvarači (Khoshnam *i sar.* 2010).

Voda se izdvaja kao najčešće korišćeno ekstrakciono sredstvo u analizi akrilamida, prvenstveno zbog izražane hidrofилnosti akrilamida i njegove dobre rastvorljivosti u vodi (Rosén *i sar.* 2007; Şenyuva i Gökmen, 2006). Ekstrakcija vodom na sobnoj temperaturi često predstavlja metodu izbora jer minimizuje ko-ekstrakciju nepoželjnih jedinjenja poput soli, proteina i ugljenih hidrata, koja mogu interferirati tokom analitičkog procesa i potencijalno oštetiti hromatografski sistem ukoliko se ne uklone adekvatnim postupcima prečišćavanja (Petersson *i sar.* 2006; Wang *i sar.* 2008). U određenim slučajevima, povišena temperatura ekstrakcije primenjuje se radi poboljšanja bubrenja matriksa i efikasnije penetracije rastvarača u uzorak (Petersson *i sar.* 2006). Pojedina istraživanja su pokazala da se visok prinos ekstrakcije akrilamida može postići primenom koncentrovanih vodenih rastvora natrijum-hlorida kao ekstrakcionog sredstva, čime se inhibira proces emulzifikacije tokom pred-tretmana uzorka i postiže delimična denaturacija proteina (Zhang *i sar.* 2009). Organski rastvarači kao što su metanol, propanol, aceton, etil-acetat i acetonitril predstavljaju alternativna ekstrakciona sredstva za izolovanje akrilamida (Elbashir *i sar.* 2014; Fan *i sar.* 2023). Primena organskih rastvarača često rezultira dobijanjem bistrijih ekstrakata u poređenju sa vodenom ekstrakcijom, usled ograničene rastvorljivosti interferirajućih komponenti poput

polisaharida i proteina, koji su uobičajeno prisutni u uzorcima hrane.

Metanol se pokazao kao posebno efikasno ekstrakciono sredstvo za uzorke hrane sa visokim sadržajem masti, poput čipsa od krompira. Prednost metanola ogleda se u tome što ne ekstrahuje skrob i druge polisaharide, čime se dobija znatno čistiji ekstrakt u poređenju sa vodenom ekstrakcijom, čak i bez dodatnog koraka centrifugiranja. Dodatna pogodnost metanola je mogućnost njegovog lakog isparavanja pod blagom strujom azota, što omogućava koncentrovanje ekstrakta i snižavanje limita kvantifikacije (LOQ) (Şenyuva i Gökmen, 2006).

Aceton kao sredstvo za ekstrakciju akrilamida, prema istraživanjima, zahteva prisustvo dovoljne količine vode kako bi se postigla potpuna ekstrakcija analita iz uzoraka. Iako ekstrakcija čistim acetonom daje dobar prinos akrilamida iz obogaćenih uzoraka čipsa od krompira i rezultira čistijim ekstraktom u poređenju sa vodenom ekstrakcijom, utvrđeno je da čist aceton nije efikasan u ekstrakciji nativno prisutnog akrilamida u uzorcima (Takatsuki *i sar.* 2003).

2.7.1.3. Metode prečišćavanja ekstrakta

Uzorci hrane na bazi krompira i žitarica karakterišu se visokim sadržajem skroba, proteina i masti, koji mogu dovesti do emulzifikacije tokom ekstrakcije i predstavljaju potencijalne interferirajuće komponente u analitičkom postupku. Stoga je njihovo uklanjanje neophodan korak za dobijanje pouzdanih analitičkih rezultata (Fan *i sar.* 2023).

Uklanjanje proteina najčešće se postiže taloženjem pomoću organskih rastvarača kao što su acetonitril, metanol, etanol i aceton. Takođe, neki pristupi uključuju dodatak natrijum-hlorida ili kombinovanu primenu kalijum-fericijanida, Karez I reagensa (eng. *Carrez I*) i cink-sulfata, Karez II reagensa (eng. *Carrez II*) (Cossu *i sar.* 2024).

Uklanjanje masti predstavlja bitan korak u prečišćavanju ekstrakta, s obzirom na to da prisustvo lipidnih komponenti može značajno ometati ekstrakciju akrilamida. Za ekstrakciju masti iz uzoraka hrane često se koriste rastvarači poput heksana, dihlormetana, petroletara i cikloheksana (Hu *i sar.* 2015). Pojedine studije su pokazale da se lipidi mogu efikasno ukloniti i zamrzavanjem uzorka, nakon čega sledi centrifugiranje ili filtracija (Wang *i sar.* 2008). Posebno se ističe metoda uklanjanja masti *n*-heksanom iz čipsa od krompira, koja poboljšava svojstva bubrenja uzorka i omogućava bolji kontakt vode sa matriksom hrane, čime se značajno povećava prinos ekstrakcije akrilamida (Fernandes i Soares, 2007).

2.7.1.4. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

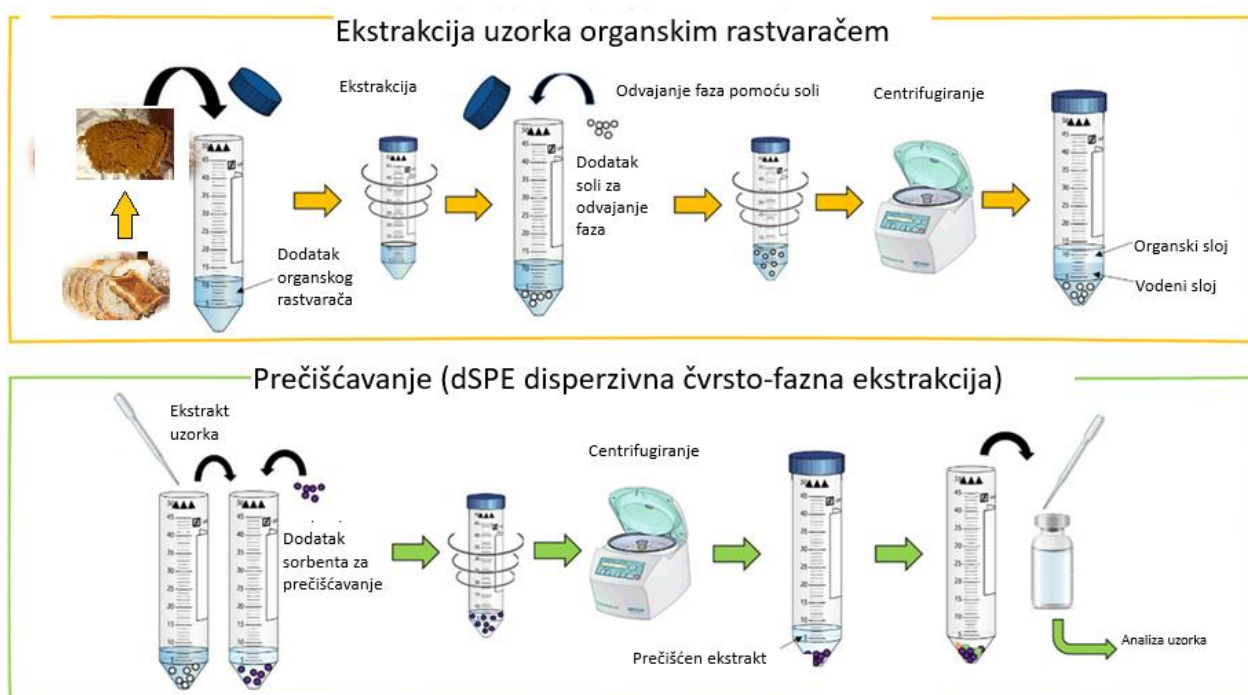
Ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction* - SPE) izdvojila se kao jedna od najčešće primenjivanih tehnika ekstrakcije i prečišćavanja uzoraka u analizi akrilamida (Wang *i sar.* 2008; Cossu *i sar.* 2024). Poseban značaj ove metode ogleda se u sposobnosti prečišćavanja sirovih ekstrakata pre hromatografskih i elektroforetskih analiza, čime se eliminišu brojne interferirajuće komponente, što direktno doprinosi snižavanju limita kvantifikacije i povećanju preciznosti i tačnosti instrumentalnih analiza (Oracz *i sar.* 2011). Dodatno, SPE omogućava koncentrovanje ekstrakta u cilju postizanja nižih limita kvantifikacije. Istraživanja su potvrdila izuzetnu važnost pravilnog odabira čvrste faze (sorbenta) za efikasnu pripremu uzoraka u analizi akrilamida. U literaturi se najčešće navodi SPE metodologija prečišćavanja koja podrazumeva kombinovanje više različitih tipova sorbenata, sa ciljem smanjenja uticaja interferirajućih jedinjenja, uz istovremeno postizanje

niskog limita detekcije (Ahn *i sar.* 2002; Becalski *i sar.* 2003; Keramat *i sar.* 2011; Aguas *i sar.* 2006; Zhang *i sar.* 2009).

2.7.1.5. QuEChERS metodologija pripreme uzoraka

Jedna od savremenih i široko primenjivanih tehnika za pripremu uzoraka za određivanje sadržaja akrilamida u hrani jeste disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (dSPE), poznata kao QuEChERS (eng. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Ova metoda pripreme uzoraka je prvi put predstavljena 2003. godine od strane Anastassiades i saradnika i prvobitno je razvijena za ekstrakciju pesticida u multirezidualnim analizama uzoraka hrane. Zahvaljujući svojoj jednostavnosti, širokoj primenjivosti, niskoj potrošnji rastvarača i ekonomičnosti, QuEChERS tehnika je brzo stekla popularnost u analitičkoj praksi pripreme uzoraka. Kako je prikazano na Slici 9, postupak QuEChERS pripreme obuhvata sledeće faze:

- ekstrakciju uzorka organskim rastvaračem (najčešće acetonitril);
- odvajanje faza pomoću soli;
- prečišćavanje ekstrakta različitim sorbentima (disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi, dSPE).



Slika 9. Postupak QuEChERS pripreme uzoraka.

U zavisnosti od tipova soli koje se dodaju, organskog ekstrakcionog sredstva u prvoj fazi ekstrakcije, kao i postupka za prečišćavanje ekstrakta u drugoj fazi, postoje sledeće tri varijante QuEChERS metode pripreme:

Originalna metoda (Anastassiades *i sar.* 2003)

- ekstrakcija acetonitrilom;
- dodatak magnezijum-sulfata i natrijum-hlorida za odvajanje faza;
- prečišćavanje pomoću PSA (primarni-sekundarni amin) sorbenta.

AOAC metoda (eng. *Association of Official Analytical Collaboration*), (AOAC 2007.01)

- ekstrakcija sa acetonitrilom zakišljenim 1% mravljom kiselinom;
- dodatak magnezijum-sulfata i natrijum-acetata za odvajanje faza;
- stabilizacija jedinjenja koja su osetljiva na promene pH vrednosti (bazno osetljivih).

Evropska standardna metoda (EN 15662)

- dodatak magnezijum-sulfata, natrijum-hlorida i citratnog pufera (trinatrijum-citrat dihidrat i dinatrijum-hidrogencitrat seskvihidrat);
- stabilizacija jedinjenja koja su osetljiva na promene pH vrednosti (bazno osetljivih);
- prečišćavanje pomoću različitih tipova sorbenata u zavisnosti od tipa matriksa.

Reagensi za QuEChERS ekstrakciju i njihova funkcija

Magnezijum-sulfat, anhidrovan: olakšava razdvajanje rastvarača i poboljšava efikasnost ekstrakcije (eng. *Recovery*) polarnih analita; takođe se dodaje i u fazi prečišćavanja uzorka i tada ima funkciju uklanjanja zaostale vode u ekstraktu.

Natrijum-hlorid: smanjuje količinu polarnih interferenci i ima funkciju isolvavanja, čime potpomaže prelazak analita od interesa u organsku fazu.

Sirćetna kiselina: koristi se za podešavanje pH vrednosti u cilju sprečavanja degradacije analita od interesa koji su osetljivi na promenu pH vrednosti.

Acetonitril: organski rastvarač koji ima najbolje karakteristike za ekstrakciju najšireg spektra analita sa najmanjim brojem ko-ekstrahovanih jedinjenja; pogodan za LC i GC analizu.

Puferi: sprečavaju degradaciju analita koji su osetljivi na promene pH, održavanjem optimalne pH vrednosti.

Reagensi za prečišćavanje i njihova funkcija

Primarno-sekundarni amin (PSA): uklanja šećere i masne kiseline, organske kiseline, lipide i neke pigmente;

C18: uklanjanja masne kiseline dugih lanaca, sterole i ostale nepolarne interference; obično se kombinuje sa PSA;

Granularni crni ugalj ili karbonski crni prah (GCB): snažan sorbent za uklanjanje pigmenata, polifenola i drugih polarnih jedinjenja; obično se kombinuje sa PSA;

Magnezijum-sulfat, anhidrovan: uklanja zaostalu vodu iz organske faze; obično se koristi u kombinaciji sa navedenim reagensima za prečišćavanje.

Primena QuEChERS metode u analizi akrilamida prvi put je objavljena 2006. godine (Mastovska *i sar.* 2006). Ova metodologija podrazumeva dodavanje unutrašnjeg standarda (*Internal Standard*, IS) homogenizovanom uzorku zajedno sa 5 mL *n*-heksana, vode, acetonitrila, anhidrovanog magnezijum-sulfata i natrijum-hlorida. Svaka komponenta u procesu ima specifičnu ulogu:

- voda poboljšava ekstrakciju akrilamida (dodaje se u slučaju uzoraka sa niskim sadržajem vode);
- *n*-heksan služi za odmašćivanje uzorka;
- dodavanje soli smanjuje međusobnu mešljivost rastvarača, što rezultuje faznim razdvajanjem acetonitrila i vodene faze i omogućava efikasniji prelazak akrilamida u acetonitril.

U sledećem koraku, alikvot od 1 mL acetonitrilnog ekstrakta prečišćava se pomoću dSPE metode korišćenjem primarno-sekundarnog amina (PSA) kao sorbenta i anhidrovanog magnezijum-sulfata. Konačni ekstrakt se analizira tečnom ili gasnom hromatografijom (Mastovska i Lehotay, 2006).

QuEChERS metoda se odlikuje nizom značajnih prednosti, uključujući: povećan protok uzoraka, niže troškove analize, eliminaciju vremenski i radno intenzivnih koraka poput isparavanja, izmene rastvarača, filtracije i višestrukih SPE prečišćavanja, kao i smanjenje rizika od potencijalne kontaminacije akrilamidom iz laboratorijskog pribora (Mastovska i Lehotay, 2006; Zhang *i sar.* 2009). Nakon objavljivanja studije od strane Mastovske i Lehotaya 2006. godine, razvijene su brojne modifikacije ovog pristupa (Marzouk *i sar.* 2023; Kumari *i sar.* 2023; Cossu *i sar.* 2024).

Kritični faktori u ekstrakciji akrilamida

Na osnovu literaturnih podataka može se izdvojiti nekoliko faktora koji utiču na ekstrakciju akrilamida i pouzdanost dobijenih rezultata:

- naknadno formiranje akrilamida iz njegovih prekursora tokom Soxhlet ekstrakcije krompira u metanolu, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata (Goldmann *i sar.* 2006; Pedersen i Olsson, 2003);
- kontaminacija iz laboratorijskog pribora, posebno iz špric-filtera i ultra-filtera, što može značajno uticati na tačnost analitičkih rezultata;
- pH vrednost ekstrakcionog medijuma – istraživanja su pokazala da se veće količine akrilamida mogu ekstrahovati u jako alkalnim uslovima (pH 12) u poređenju sa neutralnim ili blago kiselim uslovima (pH 6) (Goldmann *i sar.* 2006; Petersson *i sar.* 2006);
- trajanje i temperatura ekstrakcije – prekratko vreme ekstrakcije ili niska temperatura mogu rezultirati nepotpunom ekstrakcijom akrilamida iz uzorka;
- gubici analita mogu nastati tokom odmašćivanja uzorka ili isparavanja rastvarača, posebno kada se ovi faktori kombinuju (Petersson *i sar.* 2006; Zhang *i sar.* 2009);
- priprema uzoraka hrane pre instrumentalne analize je bitan korak koji uključuje homogenizaciju, ekstrakciju, a opciono koncentrovanje i prečišćavanje ekstrakta;
- usitnjavanje, mlevenje i homogenizacija uzorka predstavlja jedan od najkritičnijih aspekata procesa pripreme uzorka, jer akrilamid može biti čvrsto vezan za uzorak i nehomogeno raspoređen (Biedermann *i sar.* 2002; Elbashir *i sar.* 2014). Veličina čestica uzorka značajno utiče na efikasnost ekstrakcije, posebno kod uzoraka sa širokim rasponom veličina čestica, poput čipsa od krompira i hrskavog hleba. Istraživanja su pokazala da je optimalno koristiti čestice manje od 1000 µm kako bi se obezbedio adekvatan prinos ekstrakcije (Petersson *i sar.* 2006).

Poznavanje i kontrola ovih faktora su značajni za razvoj pouzdanih i robustnih metoda za određivanje sadržaja akrilamida u uzorcima hrane.

2.7.2. Analitičke metode za analizu akrilamida u hrani

2.7.2.1. Tečna hromatografija i masena spektrometrija (LC-MS)

Visokoeфикасна tečna hromatografija (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom predstavlja jednu od najzastupljenijih tehnika za određivanje akrilamida u hrani. Prema studiji Mousavi Khaneghah *i sar.* (2022), metode zasnovane na tačnoj hromatografiji čine više od polovine (56,55%) objavljenih studija u vezi sa analizom akrilamida u hrani. U pojedinim slučajevima, za detekciju su korišćeni i spektrofotometrijski detektori poput UV-Vis detektora ili detektora sa sistemom dioda (*Diode Array Detector*, DAD) (Wang *i sar.* 2008; Khoshnam *i sar.* 2010). Međutim, primena ovih detektora je ograničena zbog niske osetljivosti i nemogućnosti pouzdane identifikacije. Gökmen *i sar.* (2005) su objavili metodu analize akrilamida u čipsu zasnovanu na tačnoj hromatografiji sa detekcijom u UV oblasti na 226 nm, ali ista studija potvrđuje da je ova metoda značajno poboljšana kada je kombinovana visokoeфикасна tečna hromatografija sa tandemnom masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS). Kombinacija separacionih mogućnosti hromatografije sa mogućnostima masenog spektrometra u procesu identifikacije omogućava razlikovanje analita sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu njihovih različitih masenih spektara. Ovo je posebno važno kod analize kompleksnih uzoraka kao što je hrana. Visokoeфикасна tečna hromatografija sa tandemnom masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS ili LC-MS/MS) je analitička tehnika koja se posebno izdvaja zbog svoje selektivnosti i osetljivosti, naročito kada se radi u režimu praćenja višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM). Ova tehnika omogućava detekciju akrilamida čak i u kompleksnim matriksima hrane, što je nemoguće postići primenom konvencionalnih HPLC detektora. Literaturni pregled nekih razvijenih i validovanih LC-MS/MS metoda analize akrilamida u hrani dat je u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Pregled LC-MS/MS metoda analize akrilamida u hrani.

Metoda ekstrakcije	Metoda prečišćavanja	Analitička kolona	Validovan matriks	Tačnost (% rikaveri)	Preciznost (% RSD)	Limit detekcije (LOD)	Limit kvantifikacije (LOQ)	Referenca
(μg/kg)								
QuEChERS	dSPE	CAPCELL PAK ADME C18	kafa, biskvit, čokolada, čaj, hleb, testenina, pecivo, pomfrit	81,7–94,2	1,7–8,2	2,0–3,4	6,0–10	Yangping <i>i sar.</i> 2023
Metanol	Karez I i II	Zorbax Extend-C18	krekeri	91,4	2,86–3,12	0,62	1,89	Jozinović <i>i sar.</i> 2019
Metanol	Karez I i II, dSPE sa PSA	ODS-H optimal-C18	hleb	90,42–101	6,63	0,3	1	Eslamizad <i>i sar.</i> 2019
AcN/H ₂ O/HCOOH 69/30/1, v/v/v	d-SPE sa alumina	ACE Excel 3 SuperC18 column	dečija hrana	100–108	7,0–10,0	5	20	Prata <i>i sar.</i> 2023
Voda	SPE	Hypcarb	hleb	93–112	1,1–29	13	-	Nielsen <i>i sar.</i> 2006
vodeni rastvor 10 mM HCOOH	Karez I i II, MCX SPE	Hypcarb	biskvit	-	-	3	10	Žilić <i>i sar.</i> 2020
AcN/H ₂ O/HCOOH 69/30/1, v/v/v	/	HILIC TSKgel Amide-80	džindžerbred	101 – 105	2,9 – 7,6	8	20	Tölgyesi i Sharma 2020
Voda	SPE	HILIC Waters BEH Amide	čips od krompira, biskvit	91,5–98,2	2,71–4,82	3	10	Li YL <i>i sar.</i> 2019

Princip rada LC-MS/MS sistema u režimu monitoringa višestrukih reakcija se može podeliti na nekoliko faza:

- hromatografsko razdvajanje: komponente uzorka se razdvajaju na hromatografskoj koloni;
- jonizacija: razdvojene komponente se jonizuju u jonskom izvoru;

- analiza mase prekursora: joni prekursora se razdvajaju prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z) u prvom analizatoru masenog spektrometra (eng. *Quadrupole-Q1*);
- fragmentacija: selektovani joni prekursora u kolizionoј ćeliji se sudaraju sa molekulima inertnog gasa (obično argon), pri čemu dolazi do njihove fragmentacije na jone proizvode;
- analiza mase proizvoda: joni proizvodi se razdvajaju prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z) u drugom analizatoru masenog spektrometra (eng. *Quadrupole-Q2*);
- detekcija: razdvojeni joni se detektuju i signal se pretvara u maseni spektar.

Hromatografsko razdvajanje akrilamida

Zbog visoke hidrofilnosti, akrilamid pokazuje slab afinitet prema konvencionalnim reverzno-faznim (eng. *Reversed-Phase*, RP) analitičkim kolonama, kao što su RP-C8 i RP-C18 (Fan *i sar.* 2023). Ovaj problem nastaje zbog specifičnih molekulskih interakcija gde akrilamid ostvaruje jake polarne interakcije (vodonične veze, dipol-dipol interakcije) sa polarnom mobilnom fazom. U mobilnoj fazi, koja je najčešće smeša vode i polarnog organskog rastvarača (acetonitrila ili metanola), akrilamid pokazuje visoku rastvorljivost. Usled odsustva polarnih grupa na površini reverzno-fazne stacionarne faze, akrilamid biva eluiran sa kolone gotovo odmah nakon kontakta sa mobilnom fazom, što onemogućava adekvatno razdvajanje. Dodatno, pri radu sa mobilnim fazama sa visokim sadržajem vode, što je često neophodno za zadržavanje polarnih analita, konvencionalne reverzno-fazne kolone pokazuju problem sklupčavanja ugljovodoničnih lanaca (fenomen „kolaps faze“) koji značajno umanjuje efikasnost razdvajanja i reproduktivnost analize (Rafferty *i sar.* 2008).

Za prevazilaženje navedenih problema, literatura ukazuje na nekoliko mogućih rešenja. Jedno od njih je primena hidrofilno modifikovanih reverzno-faznih stacionarnih faza sa polarnim funkcionalnim grupama ugrađenim u alkil lanac (eng. *Polar embedded phase*). Ove polarne funkcionalne grupe omogućavaju formiranje hidrofilnog sloja na površini stacionarne faze koji sprečava kolaps ugljovodoničnih lanaca, čime se značajno poboljšava reproduktivnost i retencija polarnih analita (Rafferty *i sar.* 2008). Dodatna prednost ovih stacionarnih faza je u poboljšanoj kvašljivosti u poređenju sa tradicionalnim C18 fazama, što je posebno značajno kada su neophodne mobilne faze sa visokim sadržajem vode. Uprkos ovim poboljšanjima, za izrazito polarna jedinjenja poput akrilamida, čak i modifikovane RP kolone mogu pokazati ograničenja u postizanju optimalnog razdvajanja (Tölgyesi i Sharma, 2020).

Korišćenje poroznih grafitnih ugljeničnih stacionarnih faza (eng. *Porous Graphitic Carbon*, PGC) predstavlja drugačiji pristup zasnovan na mehanizmu koji kombinuje hidrofobne interakcije i elektronske interakcije između π -elektrona grafitne površine i polarizabilnih grupa analita. Ove kolone pokazuju izuzetnu sposobnost zadržavanja polarnih jedinjenja i obično ne podležu kolapsu faze kao konvencionalne C18 kolone. Međutim, njihova primena za rutinsku analizu akrilamida takođe zahteva korišćenje 100% vodene mobilne faze, što u kontekstu MS detekcije može predstavljati problem. Mobilna faza sa visokim sadržajem vode povećava površinski napon rastvarača, što smanjuje stabilnost elektrospreja.

Posebno se izdvaja primena stacionarnih faza zasnovanih na hidrofilnim interakcijama (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC), koje su specifično dizajnirane za analizu polarnih jedinjenja (Fan *i sar.* 2023). Međutim, u okviru pomenutih istraživanja, tečna hromatografija zasnovana na hidrofilnim interakcijama za određivanje akrilamida u hrani javlja se u svega nekoliko studija, od kojih su autori u samo dve studije objavili kompletne podatke validacije analitičkog postupka (Desmarchelier *i sar.* 2022).

Razdvajanje na HILIC kolonama odvija se po principu koji kombinuje više mehanizama razdvajanja: hidrofilne interakcije, jonsku izmenu i hidrofobne interakcije. Ova kombinacija omogućava efikasno razdvajanje i zadržavanje polarnih analita poput akrilamida. HILIC kolone pokazuju posebnu efikasnost kada se koriste u kombinaciji sa mobilnim fazama koje sadrže visok udeo organskog rastvarača (najčešće acetonitrila) i mali udeo vodene faze. Ovakav sastav mobilne faze istovremeno doprinosi boljoj elektrosprej jonizaciji u masenom spektrometru (Bernal *i sar.* 2011). Ono što razlikuje HILIC hromatografiju od ostalih mehanizama razdvajanja (npr. normalno-fazne i reverzno-fazne tečne hromatografije) je da je voda najjači eluent i da u tom smislu povećanje sadržaja vode u mobilnoj fazi smanjuje retenciju analita (Buszewski i Noga, 2012). Tipična mobilna faza za HILIC hromatografiju uključuje polarne organske rastvarače mešljive sa vodom, kao što su acetonitril, tetrahidrofuran, dioksan, alkoholi. Izbor odgovarajućeg organskog modifikatora za mobilnu fazu se vrši primenom eluotropnog niza, koji navodi rastvarače prema rastućoj elucionoj snazi. Relativne jačine rastvarača u HILIC hromatografiji mogu se sumirati na sledeći način:

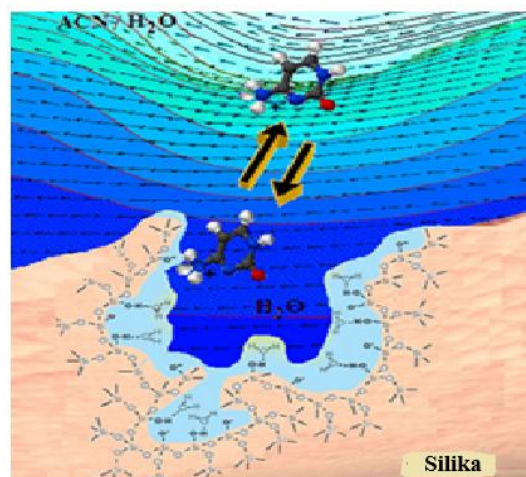
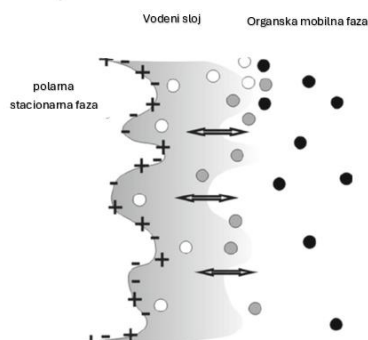
aceton < izopropanol $\approx$ propanol < acetonitril < etanol < dioksan < DMF $\approx$ metanol < voda.

HILIC razdvajanja mogu da se izvode u izokratskom ili u gradijentnom režimu koji obično počinju sa visokim procentom organskog rastvarača. Značajno je istaći, posebno u kontekstu eluiranja u uslovima gradijenta, da su HILIC mehanizmi kinetički sporiji od uobičajenih mehanizama u reverzno-faznoj hromatografiji (RP-HPLC), što rezultira dužim vremenom uspostavljanja stanja ravnoteže kolone, obično dva do četiri puta duže u odnosu na reverzno-fazne kolone (Thermo Scientific, 2014).

Najšire prihvaćena teorija o mehanizmu separacije u HILIC hromatografiji predlaže da je retencija uzrokovana raspodelom injektovanih analita između mobilne faze i sloja obogaćenog vodom u hidrofilnoj HILIC stacionarnoj fazi (Bernal *i sar.* 2011). Suština HILIC retencije može se opisati sledećim principom: što je veća hidrofilnost analita, to je ravnoteža raspodele više pomerena prema imobilisanom vodenom sloju u stacionarnoj fazi, i samim tim, analit se duže zadržava na koloni. Drugim rečima, razdvajanje se zasniva na polarnosti jedinjenja i stepenu solvatacije. Brojne studije sugerišu da HILIC nije samo jednostavno particioniranje, već uključuje multimodalni mehanizam razdvajanja koji obuhvata:

- vodonične veze između analita i vode vezane za površinu stacionarne faze;
- dipol-dipol interakcije između analita i stacionarne faze;
- slabe elektrostatičke interakcije u uslovima visokog sadržaja organskog rastvarača.

Opšte je prihvaćeno da u HILIC hromatografiji mobilna faza formira sloj bogat vodom na površini polarne stacionarne faze nasuprot mobilnoj fazi siromašnoj vodom, stvarajući sistem tečno/tečne ekstrakcije. Analit se raspoređuje između ova dva sloja (**Slika 10**). Imajući u vidu opisane mehanizme za optimalne rezultate analize akrilamida, neophodno je pažljivo razmotriti sastav mobilne faze i uslove razdvajanja, što i jeste jedna od tema ove doktorske disertacije.



Slika 10. Mehanizam razdvajanja na HILIC koloni (Buszewski i Noga, 2012).

Detekcija akrilamida-tandemna masena spektrometrija (MS/MS)

Za jonizaciju akrilamida, najčešće se koriste tehnike elektrosprej jonizacije (eng. *Electrospray Ionization*, ESI) i hemijske jonizacije pri atmosferskom pritisku (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Ove „meke“ tehnike jonizacije omogućavaju opstanak pseudomolekulskih jona analita, što je u slučaju akrilamida veoma značajno zbog njegove niske molekulske mase, usled čega fragmentacija u jonskom izvoru nije poželjna. Za kvantifikaciju akrilamida najčešće se koristi prelaz $72 \rightarrow 55$, jer pokazuje relativno visok intenzitet (Tareke *i sar.* 2000; Ahn *i sar.* 2002; Rosén i Hellenäs 2002; Becalski *i sar.* 2003). Za potvrdu identifikacije često se prate i drugi prelazi, kao što su $72 \rightarrow 54$, $72 \rightarrow 44$ i $72 \rightarrow 27$. Prelaz $72 \rightarrow 72$ takođe je prijavljen u literaturi sa relativnim intenzitetom od približno 195% u poređenju sa prelazom $72 \rightarrow 55$ (Tölgyesi i Sharma 2020; Rosén i Hellenäs 2002). Dodatno, za preciznu kvantifikaciju, često se koristi metoda internog standarda sa izotopski obeleženim akrilamidom. Za detekciju ovih jedinjenja, prate se prelazi $75 \rightarrow 58$ za D_3 -akrilamid i $^{13}C_3$ -akrilamid, kao i $73 \rightarrow 56$, što dodatno doprinosi pouzdanosti i tačnosti metode (Petersson *i sar.* 2006; Cossu *i sar.* 2024).

Izazovi LC-MS/MS analize akrilamida

Jedan od najvećih izazova u LC-MS/MS analizi hrane predstavlja kompleksnost hrane kao matriksa i matriks efekat kao uzročno-posledična pojava. Uprkos selektivnosti koju nudi tandemna masena spektrometrija (MS/MS), interference u toku analize se i dalje mogu pojaviti upravo zbog kompleksnosti hrane kao matriksa. Poseban izazov predstavljaju interferirajuće supstance koje mogu dovesti do greške u kvantifikaciji akrilamida. U kompleksnom matriksu kao što je kafa, smetnje matriksa mogu doprineti povišenim rezultatima analize akrilamida i do 40% (Delatour *i sar.* 2022). Prema dostupnim istraživanjima, valin je identifikovan kao jedan od glavnih izvora rizika vezano za pogrešnu kvantifikaciju akrilamida u proizvodima na bazi krompira i žitarica. Primenom masene spektrometrije visoke rezolucije utvrđeno je da valin daje protonovani jon sa monoizotopskom masom na m/z 118,0863, koji daje fragmentisane jone m/z 72,0808 i m/z 55,0542. Ovi fragmentisani joni mogu ometati signal akrilamida na m/z $72 \rightarrow 55$, dovodeći do viših vrednosti sadržaja akrilamida (Şenyuva i Gökmen, 2006). N-acetil- β -alanin je identifikovan kao interferirajuća supstanca prisutna u prženoj kafi. Utvrđeno je da ovo jedinjenje daje fragmente m/z 72,0444 i m/z 55,0178 u toku jonizacije unutar jonskog izvora, koji imaju iste monoizotopske mase kao i protonovani molekul

akrilamida (m/z 72,0444) i njegov produkt (m/z 55,0178). U literaturi su opisani analiti koji pokazuju identična retenciona vremena kao akrilamid i njegovi izotopski obeleženi analog D_3 -akrilamid (interni standard). Ovaj problem se može rešiti povećanjem pH vrednosti rastvora iz koga se akrilamid ekstrahuje u organski rastvarač. Becalski *i sar.* (2003) su takođe utvrdili postojanje ranoeluirajućih jedinjenja koja interferiraju kada se prelaz $72 \rightarrow 55$ koristi za detekciju akrilamida. Utvrđeno je da ovaj problem može da se prevaziđe povećanjem dužine analitičke kolone sa 100 na 150 mm i primenom tehnike SPE prečišćavanja ekstrakta.

Iz navedenog se može zaključiti da je dobro hromatografsko razdvajanje u kombinaciji sa adekvatnom pripremom uzorka od presudnog značaja za izbegavanje pogrešnih rezultata, a primena HILIC hromatografije i HILIC kolona može značajno doprineti ovom cilju.

2.7.2.2. Gasna hromatografija i masena spektrometrija (GC-MS)

Kvantitativna analiza akrilamida u namirnicama takođe se može sprovesti i primenom gasne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Međutim, analiza akrilamida tehnikom gasne hromatografije obično zahteva dodatni korak derivatizacije pre same analize, zbog slabe isparljivosti ovog analita, što dodatno produžava vreme i povećava troškove analize, kao i mogućnost potencijalnih gubitaka analita. Najviše primenjivana metoda derivatizacije akrilamida je bromovanje u kiselim uslovima sa bromovodoničnom kiselinom, bromnom vodom ili kalijum-bromid/kalijum-bromat sredstvima za derivatizaciju, pri čemu dolazi do transformacije akrilamida u 2,3-dibromopropilamid ili 2-brom akrilamid (Fan *i sar.* 2023). Značajan nedostatak ovog pristupa je oslobađanje para broma, koje predstavljaju opasnost po zdravlje analitičara. Prema literaturnim podacima, takođe se koriste i derivatizacioni reagensi koji ne uključuju postupak bromovanja, kao što su: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (eng. *N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*, BSTFA) i trifluoroacetanhidrid (eng. *Trifluoroacetic anhydride*, TFAA) (Surma *i sar.* 2017). Takođe je značajno naglasiti da su u pojedinim slučajevima, za detekciju akrilamida korišćeni i konvencionalni GC detektori poput azot-fosfor detektora (eng. *Nitrogen-Phosphorus Detector*, NPD), detektora sa zahvatom elektrona (eng. *Electron Capture Detector*, ECD) i plamenionizacionog detektora (eng. *Flame Ionization Detector*, FID). Međutim, kao i u slučaju tečne hromatografije njihova primena je ograničena zbog niske osetljivosti i nemogućnosti pouzdane identifikacije. Zbog toga je gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom metoda izbora zbog svoje osetljivosti i selektivnosti u većini naučnih studija. Kada je reč o GC analizi nederivatizovanog akrilamida tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom (eng. *Solid Phase Microextraction*, SPME) praćena GC-MS analizom je predložena, ali postignuti limiti kvantifikacije nisu bili dovoljno niski, pa samim tim je i metoda analize imala ograničenu primenu (Delatour *i sar.* 2022). Jedan od dodatnih nedostataka GC analize nederivatizovanog akrilamida je što može doći do njegovog naknadnog formiranja iz prekursora (asparagin i redukujući šećeri) u zagrejanom injeksionom portu gasnog hromatografa, što se može izbeći jedino uklanjanjem tragova prekursora pojačanim postupkom prečišćavanja ekstrakta (Mastovska i Lehotay, 2006). Literaturni pregled GC i GC-MS metoda analize akrilamida u hrani dat je u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Pregled GC i GC-MS/MS metoda analize akrilamida u hrani.

Detekcija	Metoda pripreme uzorka			Analitička kolona	Validovan matriks	Tačnost (% rikaveri)	Limit detekcije (LOD)	Limit kvantifikacije (LOQ)	Referenca
	ekstrakcija	derivatizacija	prečišćavanje				(µg/kg)		
GC-ECD	acetonitril	trifluoroacetanhidrid (TFAA)	Izooktan	SE-54 (5 % phenyl-95 % dimethylpolysiloxane)	krekeri i biskviti	96-99,8	1	25	Notardonato <i>i sar.</i> 2013
GC-MS/MS, EI	voda	Bromovanje (KBr, HBr)	Karez I i II	TG-WaxMS polyethylene glycol (PEG)	pekarski proizvodi	99,59-102,28	2,41	7,23	Negoitǎ i Culetu 2016
GC-MS, EI	voda	Bromovanje (KBr, HBr)	SPE (Oasis HLB; Oasis MCX)	HP-5 MS (5%-phenyl-methylpolysiloxane)	kineska pržena hrana	102-110	5	10	Cheng <i>i sar.</i> 2006
GC-MS, EI	disperzivna tečno-tečna mikroekstrakcija	Ksantidrol	Karez I i II	HP-5 MS (5%-phenyl-methylpolysiloxane)	hrana na bazi serealija	95	0,6	2	Nematollahi <i>i sar.</i> 2019
GC-MS, EI	QuEChERS, acetonitril	N,O-bis(trimetilsilil)tri fluoroacetamid (BSTFA)	n-hekasn, dSPE (PSA, SAX)	DB-5MS (5%-phenyl)-methylpolysiloxane	kafa i zamena za kafu	95	2,4	8	Surma <i>i sar.</i> 2017
GC-MS/MS, EI	QuEChERS, acetonitril	/	dSPE (PSA)	Polyethylene glycol (PEG)	Pekarski proizvodi, hrana za bebe, kafa, čips, itd.	82,9-104,2	25	75	Pacetti <i>i sar.</i> 2015

2.7.2.3. Ostale metode

Kolorimetrija je spektroskopska metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje analita koja se zasniva na poređenju ili merenju intenziteta obojenosti rastvora. Uprkos nedostacima poput niske osetljivosti, značajnih interferencija i veće merne nesigurnosti, kolorimetrijska metoda ima značajnu primenu u analitičkoj hemiji, naročito u oblasti brze analize, zahvaljujući jednostavnom izvođenju, ekonomičnosti i vizuelnim rezultatima koji omogućavaju brzu interpretaciju (Fan *i sar.* 2023).

Fluorescentna spektroskopija (eng. *Fluorescence Spectroscopy*, FS) je metoda zasnovana na fenomenu emisije svetlosti nakon apsorpcije energije, pri čemu karakteristike emitovane svetlosti odražavaju strukturalna svojstva ispitivanog jedinjenja. Liu i saradnici (2014) su razvili metodu za detekciju akrilamida zasnovanu na fluorescentnom određivanju. U ovom pristupu, akrilamid se prvo razgrađuje kroz Hoffmannovu reakciju pri čemu nastaje vinil-amin, koji zatim reaguje sa fluoreskaminom (fluorescentnim reagensom) formirajući pirolidon. Nastali produkt pokazuje intenzivnu emisiju fluorescencije na 480 nm. Intenzitet fluorescencije linearno je proporcionalan kvadratnom korenu koncentracije akrilamida, sa visokim koeficijentom korelacije (0,9935) i 0,015 µg/mL granicom detekcije (Fan *i sar.* 2023).

Infracrvena spektroskopija sa Ramanovom i Furijeovom transformacijom: Spektroskopske tehnike zasnovane na Ramanovom rasejanju ili na Furijeovoj transformaciji infracrvene spektroskopije (FTIR) predstavljaju atraktivne mogućnosti za praćenje koncentracije akrilamida u različitim prehrambenim proizvodima, omogućavajući nedvosmisleni identifikaciju i kvantifikaciju ovog jedinjenja (Fan *i sar.* 2023).

Kapilarna elektroforeza (eng. *Capillary Electrophoresis*, CE) je analitička metoda za kvantitativno određivanje akrilamida koja se zasniva na razdvajanju komponenti prema razlikama u koeficijentu distribucije i elektroforetskoj pokretljivosti. Među najčešće korišćenim visokoefikasnim detektorima u kapilarnoj elektroforezi izdvajaju se detektor sa nizom dioda i fluorescentni detektor. Analiza akrilamida pomoću kapilarne elektroforeze često zahteva prethodnu derivatizaciju, što čini pripremu uzorka složenijom i potencijalno utiče na preciznost metode (Fan *i sar.* 2023).

Enzimski imunosorbentni test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) je bioanalitička metoda koja se zasniva na specifičnom vezivanju antigena i antitela, pri čemu se detekcija odvija merenjem obojenog produkta koji nastaje u enzimski katalizovanoj reakciji. Ova metoda nalazi široku primenu u analitici hrane. Zbog niske molarne mase i slabe imunogenosti, akrilamid je neophodno konjugovati sa proteinskim nosačem visoke molarne mase kako bi se formirao kompletan antigen sposoban da indukuje stvaranje odgovarajućih antitela. Fu i saradnici (2011) su koristili glutaraldehid kao umreživač za sintezu kompletnog antigena, formiranjem Šifove baze između goveđeg serumskog albumina (proteinski nosač) i akrilamida. Preston i saradnici (2008) su razvili unapređeni pristup derivatizacijom akrilamida sa 3-sulfanilbenzojevom kiselinom i njegovim povezivanjem sa goveđim tireoglobulinom, čime su dobili kompletan antigen sa većim afinitetom u poređenju sa direktnom metodom koja koristi glutaraldehid.

Elektrohemijski biosenzor (eng. *Eletrochemical Biosensor*, EB) koristi biološki materijal (enzim, antigen, antitelo, ćeliju, tkivo) kao osetljivi element, elektrodu kao pretvarač signala, i karakteristične elektrohemijske signale (električni kapacitet, potencijal, struja, provodljivost) kao analitički odgovor za kvalitativnu i/ili kvantitativnu analizu. Poslednjih godina, detekcija zasnovana na elektrohemijskim biosenzorima postala je inovativni pristup za brzu detekciju kontaminanata u oblasti bezbednosti hrane. Varmira i saradnici (2018) su razvili elektrohemijski biosenzor za detekciju akrilamida u uzorcima, zasnovan na reakciji akrilamida sa α -NH₂ grupom N-terminalnog valina u hemoglobinu, što dovodi do smanjenja redukcione struje kompleksa hemoglobin-Fe³⁺. Modifikovani biosenzor karakterisan je pomoću spektroskopije energetske disperzije X-zraka (eng. *Energy-Dispersive Spectroscopy*, EDS), spektroskopije elektrohemijske impedanse (eng. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS), skenirajuće elektronske mikroskopije (eng. *Scanning Electron Microscope*, SEM) i ciklične voltametrije (eng. *Cyclic Voltammetry*, CV). Biosenzor pokazuje visoku selektivnost prema akrilamidu čak i u prisustvu visokih koncentracija interferirajućih supstanci. Ova metoda pokazuje izuzetne karakteristike poput kratkog vremena odziva (manje od 8 sekundi), dugotrajne stabilnosti, visoke osetljivosti i dobre ponovljivosti. Rezultati dobijeni ovom metodom pokazali su dobru saglasnost sa rezultatima dobijenim referentnom GC-MS metodom, što potvrđuje pouzdanost i tačnost ovog pristupa (Fan i sar. 2023).

2.8. Procena rizika po ljudsko zdravlje usled izloženosti akrilamidu u hrani

Izloženost akrilamidu kroz hranu je glavni put unosa ovog jedinjenja, kod opšte populacije. Procenjeni dnevni unos akrilamida varira u zavisnosti od prehrambenih navika i može se kretati od 0,3 do 2 µg/kg telesne mase dnevno (EFSA CONTAM Panel, 2015). Deca su posebno osetljiva populaciona grupa zbog manje telesne mase i specifičnih prehrambenih obrazaca, što rezultira unosom koji može biti i do 2–3 puta veći u poređenju sa odraslima, kada se preračuna po kilogramu telesne mase. Najveći doprinos ukupnom unosu akrilamida potiče iz sledećih grupa namirnica: proizvodi na bazi krompira (pomfrit, čips), cerealija (hleb, peciva, gotovi proizvodi od žita), kao i kafa. Ove tri grupe zajedno doprinose gotovo jednoj trećini ukupnog unosa akrilamida, dok ostali prehrambeni proizvodi učestvuju sa dodatnih ~10% (Capuano i Fogliano, 2011). U zemljama sa visokom potrošnjom hleba, poput Srbije, upravo hleb može biti glavni izvor izloženosti akrilamidu, iako njegova koncentracija u tom proizvodu nije najveća. Ovo se objašnjava učestalošću konzumacije u poređenju sa ređe konzumiranim, ali visoko kontaminiranim proizvodima poput prženog krompira. IARC je klasifikovala akrilamid kao verovatno karcinogen za ljude (grupa 2A), što znači da postoje ograničeni dokazi za ovo tvrđenje kod ljudi i dovoljni dokazi kada su u pitanju eksperimentalne životinje. EFSA u svom izveštaju iz 2015. godine potvrđuje genotoksičnost akrilamida, naglašavajući da ne postoji bezbedan prag izloženosti (EFSA CONTAM Panel, 2015). Zbog navedenog, procena rizika po zdravlje ljudi usled izloženosti akrilamidu u hrani predstavlja važan element u razumevanju i upravljanju ovom toksičnom supstancom. Procena se najčešće sprovodi u skladu sa smernicama dve

vodeće institucije: EFSA (EFSA CONTAM Panel, 2015) i Američke agencije za zaštitu životne sredine (eng. *United States Environmental Protection Agency*, US EPA) (US EPA, 2024). Iako se oba pristupa oslanjaju na toksikološke parametre, razlikuju se u načinu izražavanja rizika i tumačenju rezultata. EFSA (2015) pristup se smatra jednostavnijim i konzervativnijim, dok US EPA (2024) omogućava sofisticiranije modelovanje doživotnog karcinogenog rizika, što je pogodno za istraživačke svrhe. Njihova kombinacija pruža sveobuhvatan i robustan okvir za kvantitativnu procenu rizika. Uporedni prikaz dva navedena pristupa prikazan je u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Uporedni prikaz EFSA i US EPA pristupa procene rizika po zdravlje ljudi usled izloženosti akrilamidu u hrani.

	EFSA (2015)	US EPA (2024)
Pristup	Konzervativan, regulatorni	Detaljan, istraživački
Toksikološki parametar	Referentni nivo doze (BMDL ₁₀)	Referentna doza (RfD) Faktor nagiba krive raka (CSF)
Metod procene rizika	Margina izloženosti (MOE)	Koeficijent opasnosti (HQ) Procena karcinogenog rizika (R)
Tumačenje rizika	Prihvatljiv rizik $MOE \geq 10.000 \rightarrow$ za karcinogene efekte $MOE \geq 100 \rightarrow$ za nekarcinogene efekte	$HQ < 1 \rightarrow$ prihvatljiv rizik $R < 1,00E-06 \rightarrow$ bezbedan nivo
Prednost	Jednostavan za komunikaciju među regulatornim telima	Omogućava kvantitativnu procenu individualnog i populacionog rizika
Primena	Procena rizika u okviru EU politike bezbednosti hrane	Detaljna analiza rizika, modelovanje izloženosti, javne zdravstvene studije

2.8.1. Metodologija procene rizika po zdravlje ljudi

Procena rizika po zdravlje ljudi usled izloženosti akrilamidu u hrani obuhvata četiri osnovne faze: identifikaciju opasnosti, karakterizaciju opasnosti, procenu izloženosti i karakterizaciju rizika. Identifikacija opasnosti uključuje utvrđivanje da li određena supstanca, u ovom slučaju akrilamid, može izazvati štetne efekte po zdravlje. Toksikološki profil akrilamida je detaljno proučen u brojnim studijama i opisan je u poglavlju 2.6.

2.8.1.1. Karakterizacija opasnosti

Karakterizacija opasnosti podrazumeva utvrđivanje kvantitativnih referentnih vrednosti koje omogućavaju procenu rizika pri različitim nivoima izloženosti toksičnoj supstanci. Bitni toksikološki parametri koji se koriste u ovoj fazi uključuju parametre: referentni nivo doze (eng. *Bench Mark Dose Level*, BMDL), referentnu dozu (eng. *Reference Dose*, RfD) i faktor nagiba krive kancera (eng. *Cancer Slope Factor*, CSF). Parametar BMDL₁₀ predstavlja donju granicu pouzdanosti od 95% za dozu koja izaziva 10% promene u učestalosti određenog štetnog efekta. Referentna doza (RfD) predstavlja procenu dnevne izloženosti za koju se smatra da neće izazvati štetne efekte kod

ljudi tokom životnog veka, uključujući i osetljive podgrupe stanovništva. Za genotoksične karcinogene, faktor nagiba krive kancera (CSF) koristi se za kvantifikaciju potencijala supstance da izazove kancer pri određenom nivou izloženosti.

Za akrilamid su utvrđene sledeće referentne vrednosti zasnovane na toksikološkim studijama:

- BMDL₁₀ za nekarcinogene efekte: 0,43 mg/kg telesne mase/dan na osnovu neurotoksičnosti (EFSA CONTAM Panel, 2015);
- BMDL₁₀ za karcinogene efekte: 0,17 mg/kg telesne mase/dan (na osnovu učestalosti pojave tumora) (EFSA CONTAM Panel, 2015);
- RfD 0,002 mg/kg telesne mase/dan (US EPA, 2024);
- CSF 0,5 po mg/kg/dan (US EPA, 2024).

2.8.1.2. Procena izloženosti

Ova faza podrazumeva kvantifikaciju unosa akrilamida putem hrane. Za potrebe procene rizika, koriste se različiti parametri izloženosti, pri čemu je jedan od bitnih indikatora, procenjeni dnevni unos (eng. *Estimated Daily Intake*, EDI), koji se računa po sledećoj formuli:

$$EDI \left(\frac{mg}{kg * dan} \right) = \left(\frac{C \times IR \times EF \times ED}{BW \times AT} \right) \times CF$$

gde su:

C: koncentracija akrilamida u hrani (µg/kg)

IR: stopa unosa hrane (g/dan)

EF: učestalost izloženosti (dana/godina)

ED: trajanje izloženosti (godina)

BW: telesna masa (kg)

AT: prosečno vreme - za karcinogen supstance 70 godina, a za nekarcinogene prosečno vreme trajanja izloženosti (dana)

CF: faktor konverzije.

Posebna pažnja se posvećuje različitoj osetljivosti dece u odnosu na odrasle, kroz primenu faktora prilagođavanja koji su uvedeni od strane US EPA (US EPA, 2005b) za supstance sa mutagenim dejstvom. Ovi faktori, koji su široko prihvaćeni u naučnoj zajednici, prepoznaju povećanu osetljivost dece tokom kritičnih perioda razvoja. Za najmlađi uzrast, decu od 0 do 2 godine, primenjuje se faktor 10, što odražava njihovu izuzetnu osetljivost na toksične supstance. Kod dece od 2 do 16 godina ovaj faktor se smanjuje na 3, ali i dalje ukazuje na veću podložnost štetnim efektima u poređenju sa odraslima. Za odrasle osobe primenjuje se osnovni faktor 1, koji služi kao referentna vrednost za poređenje stepena rizika među različitim starosnim grupama.

2.8.1.3. Karakterizacija rizika

Karakterizacija rizika predstavlja završnu fazu u procesu procene rizika, gde se integrišu informacije iz prethodnih faza (identifikacija opasnosti, karakterizacija opasnosti i procena izloženosti) kako bi se procenio potencijalni zdravstveni rizik. Ova faza daje odgovor na pitanje koliki je rizik za populaciju ili određene podgrupe stanovništva pri datom nivou izloženosti akrilamidu.

EFSA pristup (EFSA, 2015) proceni rizika je zasnovan izračunavanju margine izloženosti (eng. *Margin of Exposure*, MOE). MOE pristup predstavlja odnos između toksikološke referentne tačke (u ovom slučaju $BMDL_{10}$) i procenjene izloženosti ljudi. Ova metodologija ne daje direktnu procenu rizika, već ukazuje na nivo zabrinutosti za javno zdravlje. Niže vrednosti MOE ukazuju na veći nivo zabrinutosti. Margina izloženosti se izračunava na osnovu sledeće jednačine:

$$MOE = \frac{BMDL_{10}}{EDI}$$

Prihvatljivim rizikom se smatraju vrednosti $MOE \geq 100$ za nekarcinogene efekte i $MOE \geq 10.000$ za karcinogene efekte. EFSA je u svojoj proceni iz 2015. godine utvrdila da su MOE vrednosti za akrilamid za evropsku populaciju uglavnom bile između 50 i 425, što ukazuje na zabrinutost za javno zdravlje, posebno kada je reč o karcinogenim efektima (EFSA CONTAM Panel, 2015).

US EPA pristup za procenu nekarcinogenog efekta (US EPA, 2024), koristi koeficijent opasnosti (eng. *Hazard Quotient*, HQ), koji kvantifikuje odnos između procenjene izloženosti (EDI) i referentnog nivoa koji se smatra bezbednim (RfD). Ovaj pristup se zasniva na pretpostavci da postoji prag ispod kojeg štetni efekti nisu očekivani. Koeficijent opasnosti (HQ) se izračunava kao odnos procenjenog dnevnog unosa i referentne doze prema sledećoj formuli:

$$HQ = \frac{EDI}{RfD}$$

Prilikom tumačenja vrednosti rizika, vrednost $HQ < 1$ ukazuje na prihvatljiv rizik po ljudsko zdravlje, odnosno u slučaju akrilamida na odsustvo neurotoksičnih efekata. Vrednost $HQ \geq 1$ ukazuje na mogući zdravstveni problem, pri čemu veće vrednosti HQ ukazuju na veći potencijal za štetne efekte.

US EPA pristup za procenu karcinogenog rizika (US EPA, 2024), procenjuje verovatnoću pojave kancera tokom životnog veka usled izloženosti karcinogenu. Ovaj pristup koristi faktor nagiba krive kancera (CSF) za kvantifikaciju potencijala supstance da izazove kancer i izračunava se prema sledećoj formuli:

$$R = EDI \times CSF$$

Pri tumačenju vrednosti karcinogenog rizika koristi se višestepena skala. Vrednost R manja od $1E-06$ smatra se bezbednim nivoom, što predstavlja manje od jednog dodatnog slučaja kancera na milion izloženih ljudi tokom životnog veka. Kada je vrednost rizika između $1,00E-06$ i $1,00E-4$ to ukazuje na mogući i značajan karcinogeni i mutageni rizik, što odgovara između jednog slučaja na milion i jednog slučaja na 10.000 izloženih osoba. Vrednost R iznad $1,00E-4$ ukazuje na visok rizik i potrebu za aktivnim nadzorom, jer predstavlja više od jednog slučaja kancera na 10.000 izloženih ljudi tokom životnog veka.

2.9. Mere i strategije za smanjenje unosa akrilamida u ishrani

Neposredno nakon otkrića prisustva akrilamida u hrani, naučna zajednica je uložila značajne napore u istraživanja njegovih mehanizama formiranja, što je postavilo temelje za razvoj praktičnih i efikasnih strategija smanjenja rizika. Veliki izazov u implementaciji ovih mera jeste pronalaženje rešenja koja će omogućiti značajno smanjenje akrilamida, a da pri tom ne dođe do značajnog narušavanja organoleptičkih svojstava hrane, kao što su ukus, tekstura i boja. Prema dostupnim podacima, najveći napredak u razvoju strategija za smanjenje sadržaja akrilamida u hrani

postignut je do 2011. godine, što je rezultovalo značajnim padom učestalosti ekstremno visokih koncentracija akrilamida (iznad 2 mg/kg) – sa 4,8% u 2002. na svega 0,6% u 2016. godini (Stadler, 2019). Naučna istraživanja ukazuju na nekoliko bitnih strategija za smanjenje sadržaja akrilamida u hrani, koje se mogu klasifikovati u sledeće tri osnovne grupe:

- tehnološke strategije zasnovane na fizičkom pristupu;
- tehnološke strategije zasnovane na hemijskom pristupu;
- tehnološke strategije zasnovane na biotehnološkom pristupu.

2.9.1. Tehnološke strategije zasnovane na fizičkom pristupu

Fizičke metode za redukovanje sadržaja akrilamida fokusirane su na optimizaciju uslova procesuiranja hrane, kao što su temperatura, trajanje termičke obrade i nivo vlage u toku pripreme.

Smanjenje termičkog uticaja podrazumeva sledeće pristupe:

- produženo zagrevanje na nižim temperaturama;
- više temperature u ranim fazama (visok sadržaj vlage), praćene nižim temperaturama u završnim fazama;
- održavanje visoke relativne vlažnosti tokom pečenja;
- vakuum-prženje;
- mikrotalasno prženje (kraće vreme prženja).

U slučaju prženih namirnica, temperature iznad 175 °C značajno povećavaju sadržaj akrilamida, dok kontrola temperature ulja ispod 175 °C i kraće vreme prženja smanjuju sadržaj akrilamida. Dodatno sniženje temperature na 150 °C, pri kraju tretmana, dodatno smanjuje sadržaj akrilamida. Strategije poput vakuum-prženja značajno smanjuju sadržaj akrilamida čak i u sirovinama sa visokim nivoom redukujućih šećera, jer niže temperature tokom obrade ograničavaju procese oksidacije. Vakuum prženje je efikasna tehnologija koja može smanjiti sadržaj akrilamida u čipsu na bazi krompira i do 94% uz očuvanje senzorskih svojstava proizvoda.

Pečenje na pari snižava sadržaj akrilamida za 50% u poređenju sa tradicionalnim pečenjem. Takođe, snižavanje temperature rerne tokom pečenja snižava sadržaj akrilamida za 67% nakon 5 minuta, 36% nakon 10 minuta i 35% nakon 15 minuta (Murugan *i sar.* 2016). Značajno je pomenuti i neke post-procesne metode u industrijskoj proizvodnji namirnica kao što je sušenje nakon prženja, u slučaju proizvoda od krompira (Rifa i Saleh, 2020).

2.9.2. Tehnološke strategije zasnovane na hemijskom pristupu

Hemijski pristup uključuje upotrebu različitih aditiva, promena u recepturi pripreme (formulacija i sastav) hrane. Mnogi autori su potvrdili značajan uticaj natrijum-hlorida na formiranje akrilamida u eksperimentalnim modelima prehrambenih proizvoda. Dodavanjem 1% natrijum-hlorida u model-mešavinu, postignuto je smanjenje sadržaja akrilamida do 40%, što se objašnjava inhibicijom formiranja Šifove baze između redukujućih šećera i asparagina (Şenyuva i Gökmen, 2006). Testirane su i različite kombinacije pomoćnih sredstava za pečenje kako bi se smanjio sadržaj akrilamida. Pokazalo se da je potpuna zamena amonijum-hidrogenkarbonata natrijum-hidrogenkarbonatom dovela do smanjenja sadržaja akrilamida u medenjacima za preko 70% (Murugan *i sar.* 2016). U pšeničnim krekerima i medenjacima, zamena invertnih šećera saharozom dovela je do smanjenja sadržaja akrilamida za 60%. Međutim, krajnji proizvodi nisu imali zadovoljavajuću braon boju i morali su biti dodatno obojeni (Amrein *i sar.* 2004). Kod nekih

proizvoda na bazi krompira, delimična zamena krompira sastojcima sa nižim sadržajem ključnih reaktanata može smanjiti potencijal formiranja akrilamida, npr. upotrebom žitarica sa manjim sadržajem asparagina (pšenica, pirinač, kukuruz) u odnosu na krompir (FoodDrinkEurope, 2019). Nivo redukujućih šećera može se smanjiti potapanjem sečenog krompira u vodi na sobnoj temperaturi pre prženja. Takođe je potvrđeno da se sadržaj glukoze u kriškama krompira blago smanjio produžavanjem vremena potapanja u slanoj vodi (Murugan *i sar.* 2016). Značajno smanjenje sadržaja akrilamida od čak 75% je postignuto u pomfritu koji je pre prženja bio potopljen u 2% rastvor limunske kiseline u trajanju od 1 časa (Rifa i Saleh, 2020). Međutim, takođe je utvrđeno da potapanje u organskim kiselinama poput limunske i sirćetne dovodi i do negativnog uticaja na ukus proizvoda (Pedreschi *i sar.* 2014). Blanširanje je jedna od bitnih metoda za smanjenje sadržaja akrilamida, jer uklanjanje slobodni asparagin i redukujuće šećere pre termičke obrade. Efikasnost zavisi od temperature i trajanja blanširanja. Kraće blanširanje na višim temperaturama (70 °C, 10–15 min) daje najbolje rezultate (Pedreschi *i sar.* 2014). U industrijskoj proizvodnji pomfrita, blanširanje krompira se smatra jednom od veoma važnih faza. Tokom blanširanja krompira dolazi do deaktivacije enzima i formiranja sloja želatinoznog skroba, što ograničava apsorpciju ulja i poboljšava teksturu i boju proizvoda. Kriške blanširanog krompira, potopljene na 25 °C tokom 5 minuta u 0,1 M rastvore različitih soli, pokazale su smanjenje koncentracije akrilamida u odnosu na kontrolnu grupu: 32% za KCl, 46% za NaCl i 55% za CaCl₂. Istraživanja su pokazala da mikrotalasno blanširanje uranjanjem krompir-štapića u ključalu vodu, a zatim njihovo izlaganje mikrotalasima od 900 W pre sušenja, delimično prženje, hlađenje i zamrzavanje, može dovesti do značajnog smanjenja sadržaja akrilamida. Konkretno, smanjenje sadržaja akrilamida iznosilo je 18% nakon 1. minute, 48% nakon 2. minute, 71% nakon 3. minute i 79% nakon 4. minute blanširanja u mikrotalasnoj pećnici.

Dodavanje vitamina takođe pokazuje pozitivne efekte na smanjenje sadržaja akrilamida u namirnicama. Ispitivanja na model-sistemu amino kiselina/šećer, formiranje akrilamida je smanjeno za više od 60% nakon dodavanja približno 1% vitamina C (askorbinska kiselina) i vitamina B1 (tiamin), dok je smanjenje bilo 20-30% nakon dodavanja 1% vitamina B2 (riboflavin) i vitamina B5 (pantotenska kiselina) (Govindaraju *i sar.* 2024; Rifa i Saleh, 2020).

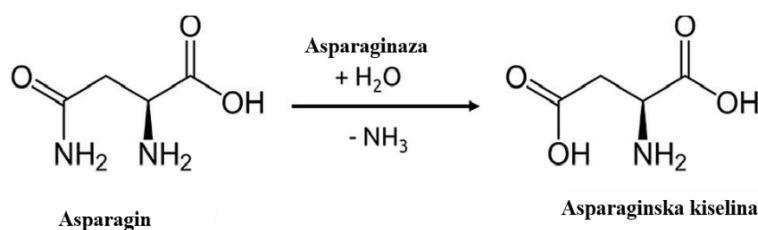
Brojne studije sprovedene između 2007. i 2013. godine pokazale su da dodavanje antioksidanasa kao što su ekstrakt bambusa, fenolna jedinjenja, ekstrakt divljeg origana, cimeta, zelenog čaja, ruzmarina, može smanjiti sadržaj akrilamid u prehrambenim proizvodima. Mehanizam delovanja antioksidanasa ogleda se u njihovoj sposobnosti da vežu redukujuće šećere, čime inhibiraju formiranje proizvoda Majlardove reakcije. Pored toga, dodavanje aminokiselina poput lizina, glicina i alanina smanjuje sadržaj akrilamida u hrani, jer ove aminokiseline mogu da konkurišu asparaginu prilikom reakcije sa karbonilnom grupom redukujućih šećera i/ili formiraju adukte sa akrilamidom nakon njegovog nastajanja. Tiolna (-SH) grupa cisteina (ili drugih tiola) može imati dvostruki benefit: formiranje adukta sa akrilamidom i termički indukovanu eliminaciju H₂S, čime se stvara dehidroalanin [CH₂=CH(NH₂)COOH]. Slično akrilamidu, -NH₂ grupa asparagina može zatim učestvovati u reakcijama adicije sa dvostrukom vezom dehidroalanina na konkurentan način. Teoretski, serin se takođe može konvertovati u dehidroalanin uklanjanjem H₂O (Govindaraju *i sar.* 2024). Potvrđeno je takođe da dodatak kazeina u proizvode od krompira pre prženja smanjuje sadržaj akrilamida i do 50% usled formiranja stabilnih adukata akrilamida i reaktivnih SH- i NH₂-grupa kazeina (Murugan *i sar.* 2016). Dodavanje dvovalentnih katjona kao što su Ca²⁺ i Mg²⁺ u testo pre pečenja smanjuje sadržaj akrilamida za gotovo 20%, a u blago kiselim uslovima (pH 5,5) smanjenje može dostići 50%. Slični rezultati su dobijeni u hlebu, gde je dodatak Ca²⁺ doveo do smanjenja sadržaja akrilamida za 30%. Šenyuva i Gökmen (2006) su proučavali uticaj dvovalentnih jona na formiranje akrilamida u proizvodima od krompira i dokazali da postoji skoro linearna negativna korelacija između formiranja akrilamida i koncentracije dodatog Ca²⁺.

2.9.3. Tehnološke strategije zasnovane na biotehnološkom pristupu

Biotehnološki pristup uključuje fermentaciju i upotrebu enzima kako bi se smanjila koncentracija prekursora akrilamida.

Proces fermentacije prehrambenih proizvoda može ograničiti sadržaj akrilamida kroz kontrolu trajanja fermentacije. Istraživanja su pokazala da fermentacija mlečnom kiselinom može značajno smanjiti količinu akrilamida u hrani za 39% kada se koristi *Streptococcus lutetiensis* i za 26% pri fermentaciji sa *Lactobacillus plantarum*. Takođe, studije *in vitro* simulacije varenja pokazale su da se tokom gastrične faze uklanjanja 30% akrilamida, dok se u crevnoj fazi eliminiše oko 40%. Pored toga, studija je pokazala da je soj bakterije mlečne kiseline *Pediococcus acidilactici* smanjio sadržaj akrilamida u hlebu na 5,64 µg/kg kada je inokulisan i fermentisan oko 16 sati. Fermentacija bakterijama mlečne kiseline ne samo da je uticala na smanjenje akrilamida, već je poboljšala i senzorske osobine hleba, doprinoseći većoj mekoći i boljem ukusu (Govindaraju *i sar.* 2024). Istraživanja su takođe pokazala da se sadržaj akrilamida u prženoj kafi može kontrolisati fermentacijom kvascem. Fermentacija sa *Saccharomyces cerevisiae* (poznatim i kao pekarski kvasac) i dodatkom šećera u hermetički zatvorenoj posudi na 30 °C tokom 48 sati dovela je do smanjenja sadržaja akrilamida za 70%. Produžena fermentacija proizvoda bogatih ugljenim hidratima rezultirala je smanjenjem sadržaja akrilamida, što se pripisuje povećanoj potrošnji asparagina tokom dužeg perioda fermentacije. Kvasci efikasno smanjuju sadržaj asparagina u testu, što dovodi do smanjenog formiranja akrilamida. Prema literaturi, u industrijskoj proizvodnji hleba treba izbegavati fermentacije duže od 1 sata, jer je sposobnost kvasca da metabolizuje asparagin ograničena, a razgradnja glutenske mreže može negativno uticati na strukturu i teksturu hleba (Govindaraju *i sar.* 2024). Smanjenje sadržaja akrilamida u hlebu primećeno je kada su prisutne bakterije mlečne kiseline, što se pripisuje smanjenju pH vrednosti i opadanju nivoa redukujućih šećera. U tom kontekstu, pokazano je da hleb fermentisan kvascem iz kiselog testa sadrži niže nivoe akrilamida u poređenju sa hlebom fermentisanim čistim kvascem. Ovi rezultati potvrđuju da fermentacija, bilo pomoću kvasaca ili bakterija mlečne kiseline, predstavlja efikasan pristup u kontroli akrilamida u prehrambenim proizvodima, uz dodatne benefite na teksturu i senzorska svojstva finalnog proizvoda. Kratkotrajna fermentacija krompira pomoću bakterija mlečne kiseline pre prženja dovela je do smanjenja sadržaja akrilamida do 90% u proizvodnji pomfrita.

Enzim asparaginaza (*L*-asparagin amidohidrolaza), EC 3.5.1. (eng. *Enzyme Commission Number*), postaje sve popularnije sredstvo za redukovanje sadržaja akrilamida u prehrambenim proizvodima. Njegova efikasnost zasniva se na specifičnom mehanizmu eliminacije asparagina, u procesu formiranja akrilamida, pri čemu se ne narušavaju senzorske karakteristike proizvoda, poput boje, teksture i ukusa. Asparaginaza pripada klasi aminohidrolaza. Ona katalizuje hidrolizu asparagina u asparaginsku kiselinu, koja ne može učestvovati u Majlardovoj reakciji sa redukujućim šećerima i stoga ne dovodi do stvaranja akrilamida (**Slika 11**).



Slika 11. Prelazak asparagina u asparaginsku kiselinu u prisustvu enzima asparaginaze.

Optimalna aktivnost enzima ostvaruje se u prehrambenim sistemima koji sadrže najmanje 30% vode, čime se omogućava efikasno enzimsko delovanje. Proces se odvija u dva koraka:

- enzim dolazi u kontakt sa svojim supstratima (voda i asparagin) i pretvara ih u odgovarajuće proizvode
- dobijeni proizvodi se zatim oslobađaju kako bi enzim mogao da katalizuje novu reakciju (Xu *i sar.* 2015).

Na aktivnost enzima značajno utiču sastav i struktura prehrambenog proizvoda, jer oni određuju dostupnost i mobilnost supstrata. Visok sadržaj vode olakšava kretanje enzima ka supstratu, čime se favorizuje hidroliza asparagina i smanjuje potencijal za formiranje akrilamida. Iz toga proizilazi da su sadržaj vlage, prisustvo supstrata i režim mešanja bitni faktori koji određuju brzinu i efikasnost enzimskog procesa. Kod pekarskih proizvoda (npr. hleb i biskviti), vreme inkubacije enzima može se lako integrisati u fazu odmaranja testa (Xu *i sar.* 2015). Enzimski tretman asparaginazom pokazao se posebno efikasnim kod proizvoda na bazi žitarica i krompira, gde je slobodni asparagin dominantni faktor u formiranju akrilamida. Prema literaturnim podacima, primena asparaginaze pokazuje različit stepen efikasnosti u smanjenju sadržaja akrilamida u zavisnosti od vrste proizvoda (da Cunha *i sar.* 2019; Gazi *i sar.* 2023; Govindaraju *i sar.* 2024):

- 80% u proizvodima za odojčad na bazi žitarica;
- do 90% u prženim krompir proizvodima (pomfrit, čips) nakon blanširanja i tretmana enzimom;
- značajno u hlebu i biskvitima pri primeni enzima pre pečenja;
- 70% u pšeničnim krekerima bez negativnog uticaja na kvalitet;
- do 90% u kukuruznim proizvodima;
- 85–90% u raznim proizvodima na bazi žitarica;
- u zrnju Arabika kafe: nakon parenja (45 minuta, 100 °C) i 60 minuta enzimskog tretmana na 60 °C sa 6000 jedinica asparaginaze (eng. *Asparaginase Unit*, ASU) po kilogramu kafe, postignuto je 70–80% smanjenje L-asparagina i 55–74% smanjenje akrilamida.

Efikasnost enzima zavisi od sledećih faktora:

- doza enzima – viša koncentracija omogućava veće smanjenje sadržaja akrilamida, ali može povećati troškove;
- vreme inkubacije – duža ekspozicija povećava konverziju asparagina;
- sadržaj vode – hidroliza zahteva prisustvo vode, što tretman čini pogodnijim za proizvode sa visokom vlagom;
- temperatura i pH – optimalna aktivnost je pri temperaturi 37–50 °C i pH vrednostima u rasponu od blago kiselog do neutralnog;
- kontakt enzim-supstrat – efikasnost zavisi od dostupnosti supstrata; kod čvrstih matriksa može biti potrebno usitnjavanje ili blanširanje.

Ipak, postoje i određena ograničenja u širokoj primeni enzima asparaginaze. Varijabilna koncentracija slobodnog asparagina u sirovinama između sorti i godina berbe otežava postizanje doslednih rezultata pri primeni enzimskog tretmana. Kada je reč o prženoj, mlevenoj i instant kafi, još uvek nisu razvijene metode primene asparaginaze koje bi efikasno smanjile sadržaj akrilamida bez negativnog uticaja na ukus, aromu i druge senzorske karakteristike finalnog proizvoda. Dodatno, uvođenje enzimskog tretmana u proizvodnji zahteva značajna finansijska ulaganja za nabavku specijalizovane opreme i optimizaciju proizvodnog procesa, što predstavlja poseban izazov za male proizvođače kafe koji često nemaju dovoljno kapitala za takve investicije.

Na tržištu su dostupna dva komercijalna preparata enzima:

- acrylaway – asparaginaza iz *Aspergillus oryzae*, proizvođač Novozymes, Danska;
- preventASe – asparaginaza iz *Aspergillus niger*, proizvođač DSM, Holandija.

Oba preparata imaju status GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) koji je dodelila Američka agencija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA), što potvrđuje njihovu bezbednost za upotrebu u prehrambenoj industriji (Murugan i sar. 2016).

2.9.4. Regulatorni nadzor akrilamida u hrani

Otkriće akrilamida u hrani izazvalo je značajnu zabrinutost među regulatornim telima širom sveta. Kao odgovor na zabrinutost vezanu za prisustvo akrilamida, zajednički FAO/WHO ekspertski komitet za prehrambene aditive (eng. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) sproveli su višestruke procene izloženosti i rizika u 2002., 2005. i 2011. godini. Njihova procena iz 2011. godine, zasnovana na podacima iz 27 zemalja (od čega 66% podataka potiče iz Evropske unije), otkrila je da je prosečna prehrambena izloženost akrilamidu varirala od 1,1 µg/kg telesne mase dnevno (tm/dan) za opštu populaciju do 4,8 µg/kg tm/dan za velike potrošače. Zaključeno je da ovi nivoi izloženosti izazivaju zabrinutost za zdravlje ljudi. U svetlu ovih nalaza, 2009. godine FAO/WHO propisuju kodeks prakse za smanjenje akrilamida u hrani (CAC/RCP 67-2009) koji bi pružio smernice nacionalnim vlastima i agencijama za hranu, proizvođačima i relevantnim telima. Nacionalne vlasti i regulatorne agencije za hranu širom sveta implementirale su programe specifične za svoje zemlje za praćenje nivoa akrilamida u hrani, procenu rizika, procenu prehrambene izloženosti i uspostavljanje mera za ublažavanje rizika od izloženosti populacije ovom jedinjenju. Generalno, ove mere uključuju modifikacije u procesu proizvodnje hrane, izbor sirovina sa nižim sadržajem prekursora akrilamida i optimizaciju parametara termičke obrade.

U Evropskoj uniji, početna faza regulatornog nadzora započela je 2005. godine kada je EFSA objavila svoju prvu izjavu o akrilamid u hrani, u kojoj je podržala zaključke JECFA da nivoi izloženosti akrilamid u hrani putem ishrane mogu predstavljati zabrinutost za zdravlje ljudi. Period od 2008. do 2012. godine obeležen je intenzivnijim praćenjem i prikupljanjem podataka. EFSA je 2008. organizovala naučni skup koji je okupio stručnjake iz celog sveta kako bi razgovarali o toksičnosti akrilamida i izloženosti putem ishrane. Usledilo je četvorogodišnje razdoblje sistematskog praćenja, tokom kojeg je EFSA objavila četiri uzastopna izveštaja o nivoima akrilamida u hrani, upoređujući podatke od 2007. do 2010. godine. Ovi izveštaji uglavnom nisu otkrili značajne razlike u nivoima akrilamida u većini procenjenih kategorija hrane tokom godina. Značajan napredak u regulatornom pristupu dogodio se 2012. godine kada su organizacije iz četiri države članice EU (Danska, Francuska, Nemačka i Švedska) zatražile od EFSA da razmotri nove naučne nalaze o mogućoj karcinogenosti akrilamida. Ovo je označilo prelaz sa običnog praćenja na aktivniju procenu rizika. Ovaj pristup je dodatno ojačan 2013. godine kada je Evropska komisija službeno zatražila od EFSA da pruži naučno mišljenje o potencijalnim rizicima akrilamida u hrani za ljudsko zdravlje. EFSA je identifikovala stotine naučnih studija koje treba razmotriti za svoju prvu potpunu procenu rizika od akrilamida. Kulminacija ovog regulatornog razvoja događa se kada 2015 godine EFSA objavljuje svoju prvu celovitu procenu rizika od akrilamida u hrani (EFSA CONTAM Panel, 2015). U svom naučnom mišljenju o akrilamid u hrani, EFSA je izvestila da je prosečan nivo izloženosti akrilamid u hrani putem ishrane u rasponu od 0,4 do 1,9 mg/kg telesne mase dnevno, zaključujući da ovi nivoi prehrambene izloženosti izazivaju zabrinutost zbog neoplastičnih efekata na osnovu dokaza na životinjama. Nakon mišljenja EFSA, Evropska komisija i države članice su se složile da su potrebne dalje mere upravljanja rizikom kako bi se osiguralo da su nivoi akrilamida u hrani dosledno niži koliko je to razumno dostižno (eng. *As Low As Reasonably Achievable*, ALARA), kroz primenu

odgovarajućih mera ublažavanja od strane svih subjekata u poslovanju sa hranom duž lanca ishrane. EU je donela uredbu (EU 2017/2158), kojom se uspostavljaju nivoi referentnih vrednosti prisustva akrilamida u određenim kategorijama hrane (**Tabela 6**) i preporuke vezano za najbolju praksu u upravljanju akrilamidom kao opasnosti po bezbednost hrane u lancu ishrane. Opšti cilj ove uredbe je da obezbedi da subjekti koji se bave proizvodnjom hrane preduzmu korake za ublažavanje formiranja akrilamida gde je to izvodljivo. Evropski proizvođači hrane su, u bliskoj saradnji sa EFSA i nacionalnim autoritetima u EU, objedinili saznanja industrijskih i akademskih istraživanja u priručnik (FoodDrinkEurope, 2019). Identifikovano je 14 različitih parametara grupisanih u četiri glavne kategorije, koje proizvođači hrane mogu selektivno primenjivati u skladu sa svojim tehnološkim procesima. Pri identifikaciji mera za redukovanje sadržaja akrilamida u hrani, priručnik je uzeo u obzir agronomske faktore (nivo sumpora u zemljištu, sastav i vrstu đubriva), recepturu (sastojke), procesiranje i finalnu pripremu (uputstva za pripremu na ambalaži namenjena potrošaču). Kombinacijom mera, prvenstveno na nivou recepture i tehnika procesiranja hrane proizvođači hrane u EU su tokom proteklih godina ostvarili značajan napredak, posebno u kategoriji hrane za bebe/odojčad, postižući prosečno smanjenje sadržaja akrilamida od 50% žitarice za odojčad, keks i gotova jela za bebe (Stadler, 2019). Takođe, u proizvodima čipsa na bazi krompira, podaci evropskih proizvođača o sadržaju akrilamida u periodu od 2002. do 2016. godine pokazali su da je od 2011. godine došlo do stabilizacije sadržaja akrilamida, pri čemu je srednja vrednost za 2016. godinu iznosila 412 ng/g, što predstavlja smanjenje od 46% u odnosu na 2002. godinu (Powers *i sar.* 2017). Uprkos značajnom napretku za neke namirnice, za određene proizvode, kao što su pržena, mlevena i instant kafa, nisu identifikovane održive mere koje ne bi ozbiljno narušile organoleptička svojstva i prihvatljivost proizvoda od strane potrošača (FoodDrinkEurope, 2019).

U Republici Srbiji (RS) su propisi i preporuke o sadržaju akrilamida u hrani prvi put stupili na snagu početkom 2020. godine. Nakon niza izmena i usaglašavanja sa regulatornim okvirima i propisima Evropske unije trenutno je aktuelan Pravilnik o maksimalnim koncentracijama određenih kontaminanata u hrani („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024) koji se primenjuje od 7. septembra 2024. godine. Ovim Pravilnikom pored ostalih kontaminanata u hrani, po uzoru na EU 2017/2158 propisano je sledeće vezano za prisustvo akrilamida u hrani:

- nivoi referentnih vrednosti prisustva akrilamida u hrani (**Tabela 6**);
- mere za ublažavanje efekata koji doprinose nastajanju akrilamida, koje primenjuju subjekti koji proizvode i stavljaju na tržište hranu rizičnu za stvaranje akrilamida;
- zahtevi u pogledu uzorkovanja i ispitivanja radi praćenja nivoa akrilamida u hrani.

Tabela 6. Uporedni pregled propisanih nivoa referentnih vrednosti akrilamida u hrani u Republici Srbiji (RS) i Evropskoj uniji (EU).

Kategorija hrane	Pravilnik RS*	Regulativa EU**
	akrilamid µg/kg	
Pomfrit (gotov)	500	500
Proizvodi od krompira i krompirovog testa	750	750
Hleb		
Hleb na bazi pšenice	50	50
Hleb koji nije na bazi pšenice	100	100
Crni ražani švapski (nemački) hleb (pumpernickel)	300	-
Žitarice za doručak / Gotovi proizvodi od žita		
Proizvodi od mekinja i proizvodi od celog zrna, ekspanzirani proizvodi od žita	300	300
Proizvodi na bazi pšenice i raži	300	300
Proizvodi na bazi kukuruza, ovsa, spelte, ječma i pirinča	150	150
Keks, čajno pecivo i srodni proizvodi		
Keksi i vafli / Keksi, čajno pecivo, vafle i dvopek	350	350
Krekeri osim krekeri na bazi krompira	400	400
Hrskavi (krisp) hleb	350	350
Džindžerbred (gingerbread), trajni slatki kolač i medenjaci	800	800
Proizvodi slični drugim proizvodima iz ove kategorije	300	300
Kafa i zamene za kafu		
Pržena kafa	400	400
Instant (rastvorljiva) kafa	850	850
Zamene za kafu		
Zamene za kafu isključivo na bazi žitarica	500	500
Zamene za kafu isključivo na bazi cikorijske	4000	4000
Dečja hrana		
Prerađena hrana na bazi žitarica za odojčad i malu decu	40	40
Keksi i dvopek za odojčad i malu decu	150	150

* „Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024; ** Commission Regulation (EU) 2017/2158

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Ova doktorska disertacija je strukturirana u dve istraživačke celine.

Prva celina se bavi razvojem i validacijom HILIC-MS/MS metode za određivanje sadržaja akrilamida u hrani. Optimizovana je analitička metoda za određivanje sadržaja akrilamida u hrani, kao i metoda ekstrakcije uzoraka. Takođe, razvijen je postupak za dobijanje hleba sa sadržajem akrilamida koji je niži od limita detekcije (LOD), kao osnova za pripremu kontrolnih uzoraka sa standardnim dodatkom. Celokupan analitički postupak je zatim podvrgnut validaciji kako bi se osigurala pouzdanost rezultata.

Druga istraživačka celina fokusirana je na procenu rizika po zdravlje stanovništva Srbije usled izloženosti akrilamidu u hrani. U okviru ove celine izvršeno je uzimanje uzoraka različitih vrsta hleba, odabranih finih pekarskih proizvoda, čipseva i dečije hrane na bazi cerealijske, koji se konzumiraju u Srbiji, sa ciljem određivanja sadržaja akrilamida u reprezentativnim uzorcima. Prikupljeni uzorci su podvrgnuti ekstrakciji i analizi primenom prethodno validovane metode. Posebna pažnja posvećena je ispitivanju uticaja dužine izloženosti odabranih uzoraka hleba visokoj temperaturi na formiranje akrilamida (tostiranje hleba) i potencijalnih zdravstvenih rizika kao posledicu konzumiranja istih. Sprovedena je i detaljna analiza distribucije akrilamida u korici i sredini hleba radi procene zdravstvenih rizika na osnovu različitih porcija koje uobičajeno konzumiraju odrasli i deca. Svi dobijeni rezultati su statistički obrađeni u cilju dobijanja uvida o sadržaju akrilamida u odabranim uzorcima hrane na tržištu Srbije. Na osnovu prikupljenih podataka izvršena je procena potencijalnih zdravstvenih rizika usled izloženosti akrilamidu, sa posebnim akcentom na nekarcinogene, karcinogene i mutagene rizike.

3.1. Standardi, hemikalije i rastvarači

3.1.1. Standardi korišćeni za kvantifikaciju akrilamida u odabranim uzorcima

- Akrilamid u praškastom obliku, čistoće >99% (*Dr. Ehrenstorfer GmbH*, Augsburg, Nemačka)
- $^{13}\text{C}_3$ -akrilamid koncentracije 1 mg/mL izotopske čistoće >99% (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*, Andover, MA)
- Akrilamid koncentracije 1 mg/mL (radni standardni rastvor) za pripremu serije rastvora za kalibraciju instrumenta. Rastvor je pripremljen odmeravanjem 10 mg akrilamida u praškastom obliku na analitičkoj vagi (Kern) i rastvaranjem u acetonitrilu HPLC čistoće, u normalnom sudu od 10,00 mL.
- Rastvor izotopski obeleženog akrilamida $^{13}\text{C}_3$ -akrilamid (ISTD) koncentracije 10 µg/mL za pripremu serije rastvora za kalibraciju (radni rastvor $^{13}\text{C}_3$ -AA). Rastvor je pripremljen odmeravanjem 10 µL $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida koncentracije 1 mg/mL i razblaživanjem acetonitriлом HPLC čistoće u normalnom sudu od 10,00 mL.
- Standardi akrilamida za kalibraciju instrumenta pripremljeni su serijskim razblaživanjem sa acetonitriлом HPLC čistoće, tako da su konačne koncentracije bile 2, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 i 500 ng/mL. Svaki od standardnih rastvora sadržao je 100 ng/mL $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida u svojstvu internog standarda.
- Standardi akrilamida u matriksu za kalibraciju instrumenta (eng. *Matrix Match Calibration*), za ispitivanje matriks efekta i retencionog vremena pripremljeni su serijskim razblaživanjem sa ekstraktom hleba bez prisustva akrilamida (sadržaj akrilamida <LOD; slepa proba-blank uzorak), tako da su konačne koncentracije akrilamida bile 10, 12,5, 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 1500 i 2500 µg/kg. Svi rastvori su obogaćeni sa 500 µg/kg $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida.

Svi radni standardni rastvori su čuvani u mraku na 4 °C do pravljenja kalibracionih standarda. Njihova stabilnost je bila 6 meseci. Standardi za kalibraciju instrumenta su pravljani uvek sveži, neposredno pre kalibracije instrumenta.

3.1.2. Rastvarači i hemikalije korišćeni za pripremu uzorka

- *n*-heksan, HPLC čistoće (*PanReac*; Barselona, Španija)
- Acetonitril, HPLC čistoće (*PanReac*; Barselona, Španija)
- Ultračista voda sa provodljivošću ispod 18,2 MΩ, dobijena korišćenjem sistema Milli-Q (*Millipore*, Bedford, MA, USA)
- Acrylaway®-3500 BG Granulat (enzim asparaginaza), komercijalni proizvod za pravljenje uzorka hleba sa sadržajem akrilamida ispod limita detekcije, (*Novozymes*; Danska)
- QuEChERS Mix I, komercijalna smeša soli za ekstrakciju, koja se sastojala od 4 g anhidrovanog magnezijum-sulfata, 1 g natrijum-hlorida, 0,5 g dinatrijum-hidrogencitrata seskvihidrata, 1 g trinatrijum-citrata dihidrata (*Macherey-Nagel*; Düren, Valencienner, Nemačka)
- QuEChERS Mix VI, komercijalna smeša soli za dSPE prečišćavanje ekstrakta koja se sastojala od 0,15 g primarnog-sekundarnog amina (PSA), 0,9 g magnezijum-sulfata, 0,15 g C18 (*Macherey-Nagel*; Düren, Valencienner, Nemačka)
- QuEChERS-Acrylamide LLE Method, komercijalna smeša soli za ekstrakciju, koja se sastojala od 4 g anhidrovanog magnezijum-sulfata, 0,5 g natrijum-hlorida (*Lab.Instruments S.R.L.*; Bari, Italy)

3.1.3. Rastvarači i hemikalije korišćeni za pripremu mobilne faze

- Acetonitril (AcN), HPLC-MS čistoće (*Fisher Chemical*; Waltham, Massachusetts, US)
 - Voda (H₂O), HPLC-MS čistoće (*Fisher Chemical*; Waltham, Massachusetts, US)
 - Mravlja kiselina (HCOOH), HPLC-MS čistoće (*Fisher Chemical*; Waltham, Massachusetts, US)
- Mobilna faza se sastojala od smeše acetonitrila i vode (80/20 v/v) i 0.1% mravlje kiseline.

3.2. Uzimanje, priprema i klasifikacija uzoraka

3.2.1. Uzorci sa tržišta Srbije za analizu sadržaja akrilamida

Za potrebe analize sadržaja akrilamida, ukupno je prikupljeno 50 reprezentativnih uzoraka sa lokalnog tržišta u Srbiji, i to 34 uzorka hleba, 5 uzoraka keksa, 3 uzorka grisina, 3 uzorka čipsa od krompira i 5 uzoraka dečije hrane na bazi cerealija. Uzorci hleba klasifikovani su prema tipu proizvodnje: 20 industrijski proizvedenih (komercijalna ambalaža sa deklaracijom) i 14 poluindustrijskih (sveže pečeni u supermarketima). Svi analizirani uzorci hleba i njihova klasifikacija prema tipu, načinu proizvodnje i zastupljenosti semenki detaljno su prikazani u **Tabeli 7**. Priprema uzoraka za postupak ekstrakcije sprovedena je u skladu sa karakteristikama različitih prehrambenih proizvoda. Uzorci hleba su najpre usitnjeni na manje komade, nakon čega su podvrgnuti procesu sušenja na sobnoj temperaturi u papirnim kesama. Za razliku od uzoraka hleba, uzorci keksa, grisina i čipsa su do faze mlevenja čuvani u svojoj originalnoj ambalaži kako bi se očuvale njihove karakteristike. Nakon inicijalne faze pripreme, uzorci su samleveni i temeljno homogenizovani, čime je obezbeđena reprezentativnost uzorka za analizu. Pripremljeni uzorci su zatim prebačeni u tamne staklene boce i skladišteni na temperaturi od -20 °C do analize. Izuzeti od ovog postupka bili su uzorci dečije hrane na bazi voća i povrća sa dodatkom žitarica, koji su već bili u formi kaše, te nisu zahtevali dodatni predtretman. Ovi uzorci su zadržani u svojim originalnim staklenim teglama i čuvani u mraku do analize. Ovakav protokol skladištenja odabran je imajući u vidu da akrilamid pokazuje stabilnost u uslovima odsustva svetlosti, niske vlažnosti i niskih temperatura, što je

osiguralo očuvanje integriteta analita i sprečilo njegovu degradaciju pre sprovođenja analitičkog postupka.

Tabela 7. Klasifikacija uzoraka hleba sa tržišta Srbije prema tipu, načinu proizvodnje i sadržaju semenki.

Uzorak (oznaka uzorka)		Sa semenkama (da/ne)	Način proizvodnje (industrijski/polu-industrijski)
1. Pšenični meki hleb			
Pšenični-Meki-1	(PM-1)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-2	(PM-2)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-3	(PM-3)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-4	(PM-4)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-5	(PM-5)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-6	(PM-6)	ne	industrijski
Pšenični-Meki-7	(PM-7)	ne	polu-industrijski
Pšenični-Meki-8	(PM-8)	ne	polu-industrijski
2. Pšenični integralni hleb			
Pšenični-Integralni-1	(PI-1)	da	polu-industrijski
Pšenični-Integralni-2	(PI-2)	da	polu-industrijski
Pšenični-Integralni-3	(PI-3)	da	polu-industrijski
Pšenični-Integralni-4	(PI-4)	da	industrijski
Pšenični-Integralni-5	(PI-5)	da	industrijski
Pšenični-Integralni-6	(PI-6)	da	polu-industrijski
Pšenični-Integralni-7	(PI-7)	ne	polu-industrijski
Pšenični-Integralni-8	(PI-8)	da	industrijski
Pšenični-Integralni-9	(PI-9)	da	industrijski
3. Mešani hleb			
Mešani Pšenica-Kukuruz-1	(MPK-1)	ne	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Kukuruz-2	(MPK-2)	ne	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Raž-1	(MPR-1)	ne	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Raž-2	(MPR-2)	ne	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Raž-3	(MPR-3)	da	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Raž-4	(MPR-4)	da	polu-industrijski
Mešani Pšenica-Raž-5	(MPR-5)	ne	polu-industrijski
Mešani Kukuruz-Pirinač-1	(MKP-1)	ne	industrijski
Mešani Kukuruz-Pirinač-2	(MKP-2)	da	industrijski
Mešani Kukuruz-Pirinač-3	(MKP-3)	ne	industrijski
Mešani Kukuruz-Pirinač-4	(MKP-4)	da	industrijski
4. Dvopek			
Dvopek-Raž	(DR)	da	industrijski
Dvopek-Pšenica	(DP)	ne	industrijski
Dvopek-Kukuruz-Pirinač-1	(DKP-1)	ne	industrijski
Dvopek-Kukuruz-Pirinač-2	(DKP-2)	ne	industrijski
5. Ražani hleb			
Ražani-integralni-1	(RI-1)	da	industrijski
Ražani-integralni-2	(RI-2)	da	industrijski

3.2.2. Uzorci za razvoj i validaciju analitičke metode

Za validaciju analitičke metode korišćeni su sledeći sertifikovani referentni materijali:

- Hrskavi hleb (Crisp Bread, QC-0194), sertifikovana koncentracija akrilamida 52,9 µg/kg, (BIPEA, Pariz, FRANCUSKA);
- Hrana za odojčad (Infant Food-T30102QC), sertifikovana koncentracija akrilamida 196 µg/kg, (Fapas, York, UK);
- Čips od povrća (Vegetable Crisps-T30111XQC), sertifikovana koncentracija akrilamida 1035 µg/kg, (Fapas, York, UK).

3.2.3. Priprema uzorka hleba bez prisustva akrilamida

Uzorak hleba sa sadržajem akrilamida <LOD (blank uzorak) pripremljen je u kućnim uslovima prema tradicionalnoj recepturi. Rafinisano belo brašno (Tip-500; 1 kg), kvasac (25 g), so (20 g), voda (800 mL) i Acrylaway® 3500 BG Granulate (5 g), temeljno su pomešani. Nakon mešenja testo je ostavljeno da stoji 30 minuta. Hleb je pečen 40 minuta na 150 °C. Nakon pečenja hleb je ostavljen da se ohladi.

3.2.4. Priprema uzoraka hleba u cilju ispitivanja uticaja dužine izloženosti visokoj temperaturi na formiranje akrilamida (tostiranje hleba)

U cilju ispitivanja uticaja vremena tostiranja na formiranje akrilamida i procene zdravstvenih rizika nastalih kao posledica tostiranja hleba, za eksperiment je odabran komercijalni beli pšenični hleb, namenjen za tostiranje, nabavljen u maloprodajnom objektu u Beogradu, Srbija. Za potrebe ispitivanja korišćena su tri pakovanja hleba, pri čemu je svako pakovanje sadržalo po 22 prethodno isečene kriške. Kako bi se simulirali realni uslovi svakodnevnih prehrambenih navika potrošača, tostiranje je izvršeno u kućnom tosteru (TEFAL GC 241D, 2000 W), koji predstavlja uobičajeni način pripreme tostiranog hleba u domaćinstvima. Eksperimentalni rad obuhvatio je analizu:

- pet netostiranih kriški hleba radi određivanja početne koncentracije akrilamida;
- jedanaest eksperimentalnih grupa po pet kriški hleba koje su bile izložene procesu tostiranja u trajanju od 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 15 minuta.

Nakon termičke obrade, svi uzorci su samleveni, svaka grupa zasebno, homogenizovani, preneseni u tamne staklene posude i skladišteni na -20 °C do analize.

3.2.5. Priprema uzoraka za analizu distribucije akrilamida u korici i sredini hleba

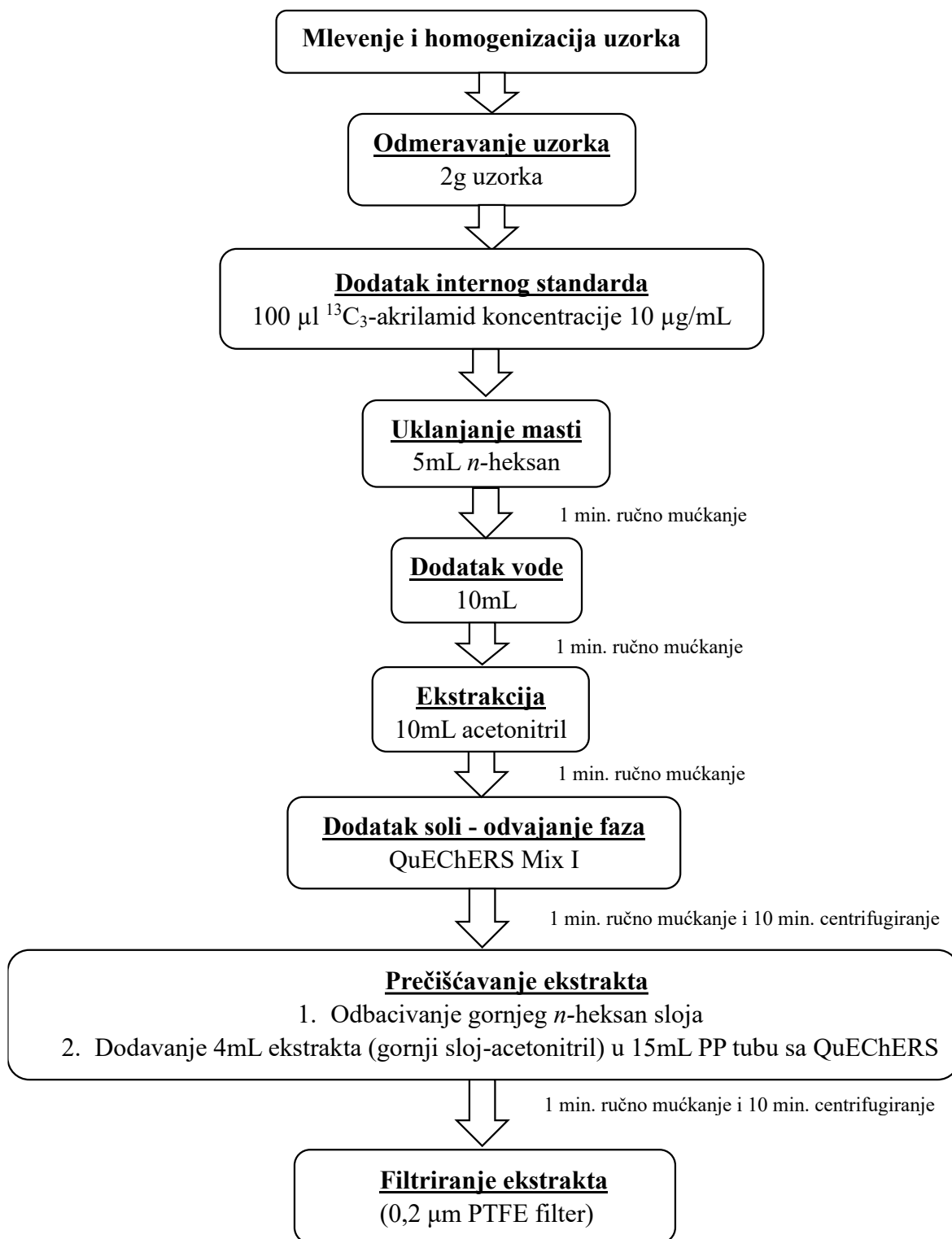
U cilju detaljnije analize distribucije akrilamida u različitim delovima hleba i povezanih zdravstvenih rizika, izvršeno je selektivno uzorkovanje i priprema reprezentativnih tipova hleba. Istraživanje je bilo usmereno na utvrđivanje razlika u koncentraciji akrilamida između kore i sredine hleba, što predstavlja važan aspekt u proceni bezbednosti hrane. Za ovu studiju odabrani su reprezentativni uzorci hleba koji su u prethodnim analizama pokazali različite nivoe koncentracija akrilamida, kako bi se dobila kompletna slika o distribuciji ovog jedinjenja. Uzorci su birani tako da zastupaju širok spektar vrsta hleba, uključujući hlebove sa niskim i visokim sadržajem akrilamida, hlebove sa i bez semenki. Od svakog odabranog tipa hleba uzeta je po jedna vekna, koja je zatim pažljivo razdvojena na dva jasno definisana dela: koru, koja predstavlja spoljašnji, tvrdi i tamniji deo hleba, i sredinu, koja čini unutrašnji, meki deo hleba. Nakon razdvajanja, delovi su zasebno tretirani prema utvrđenom protokolu koji je obuhvatao sušenje na sobnoj temperaturi u papirnim kesama, što

omogućava prirodno isparavanje vlage bez rizika od kontaminacije. Potom je sledilo mlevenje osušenih uzoraka do homogene konzistencije i homogenizacija uzoraka radi obezbeđivanja reprezentativnosti. Pripremljeni uzorci su pakovani u tamne staklene boce koje pružaju zaštitu od svetlosti koja može uticati na stabilnost uzoraka, nakon čega je usledilo skladištenje na -20 °C do analize, čime se obezbeđuje očuvanje hemijske stabilnosti uzoraka.

3.3. Ekstrakcija uzoraka i priprema za HILIC-MS/MS analizu

Nakon mlevenja i homogenizacije, 2 g uzorka odmereno je na tehničkoj vagi u polipropilensku ekstrakcionu epruvetu za centrifugiranje zapremine 50 mL (*Sarstedt*, Nümbrecht, Nemačka). Uzorku je dodato 100 µL internog standarda ($^{13}\text{C}_3$ -akrilamid), koncentracije 10 µg/mL. Nakon toga je dodato 5 mL *n*-heksana i smeša je energično, ručno mućkana u trajanju od jednog minuta. U sledećem koraku, uzorku je dodato 10 mL ultračiste vode i smeša je ponovo ručno mućkana jedan minut. Ekstrakcija je zatim nastavljena dodatkom 10 mL acetonitrila, uz dodatno snažno mućkanje u trajanju od jednog minuta. Nakon toga, dodata je komercijalna smeša soli (QuEChERS Mix I), epruveta je odmah zatvorena i sadržaj je intenzivno, ručno mućkan jedan minut. Ekstrakt je zatim podvrgnut centrifugiranju (Centrifuga Eppendorf 5702, *Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) na sobnoj temperaturi, na 3000 obrtaja (rpm) u minuti tokom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, gornji sloj (*n*-heksan) je pažljivo uklonjen i odbačen.

U cilju prečišćavanja ekstrakta, 4 mL acetonitrilnog ekstrakta preneto je u polipropilensku epruvetu za centrifugiranje zapremine 15 mL koja sadrži QuEChERS smešu soli za prečišćavanje (QuEChERS Mix VI). Smeša je ručno mućkana 30 sekundi i ponovo centrifugirana na 3000 rpm tokom 10 minuta. Dobijeni prečišćeni ekstrakt je zatim profiltriran kroz 0,2 µm PTFE membranski špic-filter (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US), direktno u bočicu namenjenu za instrumentalnu analizu. Svaki uzorak je pripreman u duplikatu. Šematski prikaz postupka ekstrakcije uzoraka za analizu prikazan je na **Slici 12**.



Slika 12. Šematski prikaz postupka ekstrakcije uzoraka.

3.4. Kvantifikacija akrilamida primenom HILIC-MS/MS metode

Za kvantitativnu analizu akrilamida u odabranim prehrambenim proizvodima korišćen je Dionex UltiMate 3000 HPLC sistem povezan sa TSQ Quantum Access Max trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, US), opremljenim elektrosprej jonskim izvorom, koji je radio u pozitivnom režimu jonizacije (ESI+) (**Slika 13**).



Slika 13. Dionex UltiMate 3000 HPLC-TSQ Quantum Access Max maseni spektrometar.

Hromatografsko razdvajanje akrilamida izvršeno je na analitičkoj koloni Accucore HILIC ($150 \times 2,1$ mm, $2,6 \mu\text{m}$, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US) pri konstantnoj temperaturi od 25°C . Za efikasno razdvajanje korišćen je izokratski režim eluiranja sa mobilnom fazom koja se sastojala od 10% vodenog rastvora 0,1% mravlje kiseline (mobilna faza A) i 90% acetonitrilnog rastvora 0,1% mravlje kiseline (mobilna faza B). Protok mobilne faze održavan je na $0,3 \text{ mL/min}$, dok je zapremina injektovanja uzorka iznosila $5 \mu\text{L}$. Temperatura autosamplera bila je postavljena na 20°C kako bi se obezbedila stabilnost uzoraka tokom analize. Pod ovim optimizovanim uslovima, ukupno vreme analize iznosilo je svega 5 minuta, pri čemu je akrilamid detektovan na retencionom vremenu (RT) od 1,64 minuta, a njegov izotopski obeležen analog, $^{13}\text{C}_3$ akrilamid, na 1,65 minuta.

Za detekciju akrilamida korišćen je trostruki kvadrupolni maseni spektrometar u ESI+ režimu rada jonskog izvora i MS/MS režimu praćenja višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) masenog analizatora.

Primenjeni su sledeći parametri jonskog izvora: napon elektrospreja od $3,5 \text{ kV}$, temperatura isparivača 250°C , temperatura jon-transfer tube 200°C . Protok glavnog gasa (eng. *Sheath gas*, azot) iznosio je 40 jedinica, dok je protok pomoćnog gasa (eng. *Auxiliary gas*, azot) bio 20 jedinica (proizvoljne jedinice). Kao kolizionni gas korišćen je argon.

Režim praćenja specifičnih prelaza masenog analizatora je bio sledeći: za kvantifikaciju akrilamida korišćen je prelaz $m/z 72,1 \rightarrow 55,4$ pri kolizionoj energiji od 11 eV , dok je za $^{13}\text{C}_3$ -akrilamid praćen prelaz $m/z 75,2 \rightarrow 58,3$ pri kolizionoj energiji od 10 eV (eng. *Collision energy*, CE). Pouzdana identifikacija analita obezbeđena je praćenjem dodatnih kvalifikacionih prelaza (tranzicija) za akrilamid $m/z 72,1 \rightarrow 54,3$ (CE 20 eV) i $m/z 72,1 \rightarrow 44,3$ (CE 22 eV), a za $^{13}\text{C}_3$ -akrilamid $m/z 75,2 \rightarrow 45,4$ (CE 20 eV) i $m/z 75,2 \rightarrow 29,6$ (CE 21 eV).

Kvantifikacija akrilamida je izvršena pomoću metode internog standarda, na osnovu odnosa površina pikova kvantifikacionih tranzicija analita i internog standarda ($^{13}\text{C}_3$ -akrilamid). Akrilamid je identifikovan direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima i kvantifikovan konstruisanjem kalibracione krive korišćenjem linearne kalibracije. Za dodatnu potvrdu prisustva jedinjenja korišćen je relativni odnos površina pikova tranzicije (eng. *Selected Reaction Monitoring*, SRM) koja je služila u svrhu kvantifikacije akrilamida (SRM-kvan) i tranzicija koje su služile za potvrdu prisustva akrilamida u uzorcima (SRM-kval). Podaci su prikupljeni i obrađeni pomoću softvera Trace Finder 3.2 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US). U **Tabeli 8** prikazani su hromatografski i MS/MS parametri identifikacije i kvantifikacije akrilamida i $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida.

Tabela 8. Hromatografski i MS/MS parametri identifikacije i kvantifikacije akrilamida i $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida.

Jedinjenje	RT (min.)	Jon prekursora <i>m/z</i>	Jon produkta <i>m/z</i>	Koliziona energija (eV)	Režim praćenja	Jonski odnos (%)
akrilamid	1,64	72,1	55,4	11	SRM-kvantifikacija	
			54,3	20	SRM-identifikacija	6,53
			44,3	22	SRM-identifikacija	5,1
$^{13}\text{C}_3$ -akrilamid	1,65	75,2	58,3	10	SRM-kvantifikacija	
			45,4	20	SRM-identifikacija	5,54
			29,6	21	SRM-identifikacija	3,85

3.5. Validacija HILIC-MS/MS analitičkog postupka

Jedan od osnovnih ciljeva doktorske disertacije je bila implementacija osjetljive, tačne i robustne metode namenjene za rutinsku analizu akrilamida u planiranim istraživanjima. Optimizovana analitička metoda evaluirana je kroz validacionu studiju koja je uključivala različite vrste matriksa (čips od povrća, hrana na bazi žitarica za ishranu odojčadi, hleb i hrskavi hleb). Za validaciju metode korišćeni su sertifikovani referentni materijali i kontrolni uzorci sa standardnim dodatkom navedeni u odeljku 3.3.2. Validacija HILIC-MS/MS analitičkog postupka obuhvatila je parametre prikazane u **Tabeli 9**. Za procenu adekvatnosti metode, svi parametri su razmatrani u odnosu na kriterijume definisane u direktivi SANTE/11312/2021v2 (European Commission, 2021) i aktuelnom nacionalnom pravilniku („Sl. glasnik RS" br. 73/2024 i 90/2024). Kriterijumi prihvatljivosti su prikazani u **Tabeli 9**. Ovaj pristup omogućio je sveobuhvatnu procenu pouzdanosti razvijene metode i njenu usklađenost sa regulatornim zahtevima za analizu sadržaja akrilamida u prehrambenim proizvodima.

Tabela 9. Parametri validacije i kriterijumi prihvatljivosti.

Parametar validacije	Opis parametara i eksperimenta	Kriterijum prihvatljivosti	Referenca
Linearnost	Odstupanje između teorijskih (nominalnih) i eksperimentalno izračunatih koncentracija kalibracionih standarda (rezidualna vrednost).	Devijacija $< \pm 20\%$	SANTE/11312/2021v2
Matrix efekat (ME)	Poređenje nagiba kalibracione krive konstruisane standardima u rastvaraču u odnosu na nagib krive konstruisane standardima u matriksu.	U slučaju da procenjeni ME odstupa od opsega $\pm 20\%$ neophodno je raditi kalibraciju u matriksu u cilju kvantifikacije analita od interesa	SANTE/11312/2021v2
Limit detekcije (LOD)	Najniža koncentracija analita koja se može detektovati uz ispunjavanje zadatih kriterijuma identifikacije.	3/10 od LOQ vrednosti	„Sl. glasnik RS“ br. 73/2024 i 90/2024; Eurahem (2014)
Limit kvantifikacije (LOQ)	Najniža koncentracija analita koja omogućava kvantifikaciju uz ispunjavanje propisanih kriterijuma za identifikaciju, rikaveri i preciznost.	Preciznost na LOQ nivou $\leq 20\%$ RSD Rikaveri na LOQ nivou 70-120% Odnos signal-šum (S/N) > 10 za svaku SRM tranziciju (SRM-kvan i SRM-kval)	SANTE/11312/2021v2; Eurahem (2014)
Specifičnost	Odsustvo signala za analizirani analit u blank kontrolnom uzorku.	$< 30\%$ LOQ nivoa koncentracije	SANTE/11312/2021v2
Rikaveri	Srednja vrednost rikaveri (eng. <i>Recovery</i>) testa za analizirane sertifikovane referentne uzorke i kontrolne uzorke sa standardnim dodatkom	Srednja vrednost % rikaveri 70-120%	SANTE/11312/2021v2
Preciznost	Preciznost u uslovima ponovljivosti (RSDr)	$\leq 20\%$ RSD	SANTE/11312/2021v2
	Preciznost u uslovima reproduktivnosti (RSDwr)	$\leq 20\%$ RSD	
Robustnost	Stabilnost metode kroz vreme i pri različitim laboratorijskim okolnostima. Praćenje srednjih vrednosti za rikaveri i preciznosti (RSDwr) kroz internu kontrolu kvaliteta metode	Srednja vrednost % rikaveri 70-120% Preciznost RSDwr $\leq 20\%$ RSD	SANTE/11312/2021v2
Identifikacija	Zahtev za potvrdu prisustva analita na osnovu poređenja sa kalibracionim standardima	MS/MS parametar minimum 2 produkt-jona sa jonskim odnosom $< \pm 30\%$ Hromatografski parametar apsolutna razlika u retencionom vremenu (ΔRT) $\pm 0,1$ min	SANTE/11312/2021v2

3.5.1. Procena linearnosti

Linearnost metode je procenjena konstruisanjem kalibracione krive u opsegu koncentracije 2-500 ng/mL, što odgovara kvantifikaciji akrilamida u opsegu 10-2500 µg/kg u realnim uzorcima hrane. Za konstruisanje kalibracione krive primenjen je odnos relativnih površina pikova akrilamida i internog standarda $^{13}\text{C}_3$ akrilamida, detektovanih praćenjem karakterističnih SRM tranzicija (m/z 72,1 → 55,4 za akrilamid i m/z 75,2 → 58,3 za $^{13}\text{C}_3$ akrilamid).

Kriterijum prihvatljivosti linearnosti, prema SANTE/11312/2021v2 smernicama (European Commission, 2021), podrazumeva da odstupanje između teorijskih (nominalnih) i eksperimentalno izračunatih koncentracija kalibracionih standarda (rezidualna vrednost) ne prelazi ±20%. Ovaj kriterijum je primenjen na svaku kalibracionu tačku kako bi se osigurala pouzdana kvantifikacija akrilamida u celom opsegu koncentracija.

3.5.2. Procena matriks efekta

Matriks efekat (ME) predstavlja uticaj komponenata matriksa na jonizaciju analita i bitan je parametar validacije analitičke metode, naročito u slučaju kompleksnih uzoraka kao što je hrana. Matriks efekat je procenjen na sledeći način:

- konstruisana je kalibraciona kriva za akrilamid analizom standardnih rastvora akrilamida pripremljenih u čistom rastvaraču (acetonitril);
- konstruisana je kalibraciona kriva za akrilamid analizom standardnih rastvora akrilamida pripremljenih u matriksu (odeljak 3.1.1.).
- Izračunat je procenat pojačanja ili supresije signala (ME%) prema sledećoj jednačini:

$$\text{ME \%} = \left(\frac{\text{Nagib kal. krive u matriksu} - \text{Nagib kal. krive u rastvaraču}}{\text{Nagib kal. krive u rastvaraču}} \right) \cdot 100\%$$

Kriterijumi za interpretaciju vrednosti matriks efekta su bili sledeći:

ME = 0%: nema matriks efekta;

ME > 0%: pojačanje signala usled uticaja matriksa;

ME < 0%: supresija signala usled uticaja matriksa.

U skladu sa smernicama SANTE/11312/2021v2, ukoliko procenjeni matriks efekat pri HILIC-MS/MS analizi akrilamida odstupa od opsega ±20%, to ukazuje na značajan uticaj matriksa na kvantifikaciju analita od interesa. U takvim slučajevima neophodno je primeniti metodu standardnog dodatka ili pripremiti kalibracionu krivu u matriksu, kako bi se dobili pouzdani rezultati kvantifikacije. Za procenu ovog parametra od posebnog značaja je bio uzorak hleba bez prisustva akrilamida (sadržaj <LOD), koji je poslužio kao osnova za pravljenje serije kalibracionih standarda u matriksu. Postupak pripreme blank uzorka hleba opisan u odeljku 3.2.2.

3.5.3. Procena limita detekcije i kvantifikacije

Limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) su određeni u skladu sa Eurahem (eng. *Eurachem*) smernicama (Magnusson i Örnemark, 2014). Za izračunavanje ovih parametara korišćeni

su blank uzorci hleba obogaćeni niskom koncentracijom akrilamida (10 µg/kg). Svaki uzorak je pripremljen prema proceduri opisanoj u odeljku 3.3. Za izračunavanje vrednosti za LOD i LOQ, korišćene su sledeće formule:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{\sqrt{n}}$$

gde je:

σ : standardna devijacija 10 ponovljenih merenja uzoraka obogaćenih sa 10 µg/kg akrilamida

n: broj ponovljenih merenja.

Nakon teorijskog izračunavanja LOQ vrednosti, izvršena je eksperimentalna potvrda da ova vrednost ispunjava sledeće osnovne kriterijume za pouzdanu kvantifikaciju akrilamida (**Tabela 9**):

- odnos signal-šum > 10 za pikove akrilamida za svaku SRM tranziciju (**Tabela 8**, odeljak 3.4.);
- preciznost na LOQ nivou < 20% RSD;
- rikaveri vrednost na LOQ nivou u opsegu 70-120%.

Svi navedeni kriterijumi su morali biti zadovoljeni kako bi se potvrdilo da je eksperimentalno određena vrednost LOQ validna za pouzdanu kvantifikaciju akrilamida u uzorcima hrane primenom razvijene HILIC-MS/MS metode.

3.5.4. Rikaveri i preciznost

Parametri validacije rikaveri i preciznost su eksperimentalno procenjeni analizom sertifikovanih referentnih materijala (CRM) koji su navedeni u odeljku 3.2.2., kao i analizom uzoraka blank-hleba (QC) obogaćenog akrilamidom poznate koncentracije i to na tri nivoa koncentracije (10, 50 i 1000 µg/kg).

Svaki uzorak je pripremljen u 6 ponavljanja prema proceduri opisanoj u odeljku 3.3. i analiziran.

Rikaveri vrednost je izračunata prema formuli:

$$\text{Rikaveri} = \left(\frac{C_{\text{eksperimentalno}}}{C_{\text{nominalno}}} \right) \cdot 100\%$$

gde su:

$C_{\text{eksperimentalno}}$: koncentracija analita eksperimentalno određena u sertifikovanom referentnom materijalu ili obogaćenom uzorku (µg/kg);

$C_{\text{nominalno}}$: sertifikovana koncentracija analita ili koncentracija analita kojom je obogaćen blank-uzorak (µg/kg).

Preciznost metode je izražena kao relativna standardna devijacija (% RSD) i procenjena je kroz:

- unutardnevnu preciznost (ponovljivost, RSD_r), šest ponovljenih merenja uzoraka u toku jednog dana ;
- međudnevnu preciznost (reproduktivnost, RSD_{wr}), ponovljena merenja uzoraka tokom tri različita dana.

3.5.5. Specifičnost

Specifičnost metode je procenjena analizom blank uzoraka hleba, pripremljenih prema postupku opisanom u odeljku 3.2.2. U cilju procene prisustva potencijalnih interferirajućih supstanci, analizirani su hromatogrami i odgovarajuće SRM tranzicije na očekivanom retencionom vremenu akrilamida. Prema kriterijumima SANTE/11312/2021v2, metoda se smatra specifičnom za određivanje sadržaja akrilamida ukoliko signal potencijalnih interferirajućih supstanci na retencionom vremenu analita od interesa iznosi $< 30\%$ LOQ nivoa. Ovaj kriterijum obezbeđuje da eventualne interferirajuće komponente prisutne u matriksu uzorka ne utiču značajno na pouzdanu detekciju i kvantifikaciju akrilamida.

3.5.6. Robustnost

Robustnost razvijene HILIC-MS/MS metode je procenjena kroz duži vremenski period (60 dana), pri čemu su praćeni ključni analitički parametri u različitim eksperimentalnim uslovima i za različite vrste uzoraka. Ispitivanje robustnosti obuhvatilo je više aspekata analitičkog postupka, uključujući stabilnost hromatografskih uslova, postojanost retencionog vremena i konzistentnost kvantifikacije. Tokom ispitivanja robustnosti korišćena su dva sertifikovana referentna materijala (CRM): hrana za odojčad (sertifikovana koncentracija $196 \mu\text{g/kg}$) i hrskavi hleb (sertifikovana koncentracija $52,9 \mu\text{g/kg}$) koji su analizirani tokom rutinske analize realnih uzoraka (nakon 5-10 uzoraka). Procenjeni su prosečna vrednost % rikaveri i preciznost (% RSD) i stabilnost retencionog vremena. Prema kriterijumima SANTE/11312/2021v2, metoda se smatra robustnom ukoliko je prosečna vrednost rikaveri u opsegu 70-120% sa preciznošću određivanja $\leq 20\%$ RSD. U okviru procene optimalnog vremena trajanja izokratskog eluiranja, praćena je i robustnost retencionog vremena.

3.5.7. Identifikacija

Potvrda identiteta akrilamida u analiziranim uzorcima zasnovana je na parametrima: retenciono vreme (eng. *Retention Time*, RT), prisustvu produkt-jona (minimum dva) i jonskog odnosa (eng. *Ion Ratio*, IR).

Retenciono vreme je procenjeno tokom izvođenja eksperimenata za procenu matriks efekta. U okviru ovih eksperimenata, za procenu stabilnosti retencionog vremena iskorišćene su vrednosti retencionih vremena akrilamida u standardnim rastvorima pripremljenim u čistom rastvaraču i u blank matriksu (odeljak 3.1.1.). Stabilnost retencionog vremena izražena je kao apsolutna razlika srednjih vrednosti retencionih vremena akrilamida u ova dva medijuma, prema sledećoj jednačini:

$$\Delta RT = |\overline{RT}(\text{matriks}) - \overline{RT}(\text{rastvarač})|$$

gde su :

ΔRT : apsolutna razlika u retencionom vremenu akrilamida (min);

$\overline{RT}(\text{matriks})$: srednja vrednost retencionog vremena akrilamida u standardnim rastvorima u matriksu (min);

$\overline{RT}(\text{rastvarač})$: srednja vrednost retencionog vremena akrilamida u standardnim rastvorima u rastvaraču (min).

Odnos jona ili jonski odnos (eng. *Ion Ratio*, IR) je parametar koji služi za dodatnu potvrdu prisustva analita u ispitivanom uzorku. Odnos površina pikova karakterističnih SRM tranzicija mora biti konstantan u okviru dozvoljenih odstupanja za dato jedinjenje. U slučaju akrilamida i njegovog izotopski obeleženog analoga u **Tabeli 8** (odeljak 3.4.) date su vrednosti jonskog odnosa za odgovarajuće kvalifikacione tranzicije, koje su eksperimentalno određene analizom standarda akrilamida u rastvaraču. Za pouzdanu identifikaciju analita, razlika u jonskom odnosu između uzorka i standarda ne sme biti veća od $\pm 30\%$. Ukoliko ova vrednost prelazi dozvoljeno odstupanje, dovodi se u pitanje pouzdanost identifikacije analita u uzorku. Odnos jona se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$\text{Jonski odnos} = \left(\frac{\text{Površina pika}_{\text{SRM kval}}}{\text{Površina pika}_{\text{SRM kvan}}} \right) \cdot 100\%$$

gde su:

Površina pika SRM kval : površina pika identifikacione tranzicije akrilamida (SRM-kval);

Površina pika SRM kvan : površina pika kvantifikacione tranzicije akrilamida (SRM-kvan).

3.6. Procena zdravstvenih rizika usled izloženosti akrilamidu putem ishrane

Procena zdravstvenih rizika usled izloženosti akrilamidu putem ishrane sprovedena je u četiri faze (Basaran i Sadighara, 2024). Prva faza obuhvatila je prikupljanje proizvoda sa tržišta Srbije u cilju određivanja koncentracija akrilamida. Sledeća faza bila je procena količina unete hrane kod odraslih i dece, na osnovu koje je izračunata procenjena dnevna izloženost (eng. *Estimated Daily Intake* – EDI). Ova procena predstavljala je rezultat treće faze. U četvrtoj fazi izvršena je procena zdravstvenih rizika na nivou izloženosti akrilamidu putem ishrane, kako bi se utvrdili toksikološki, nekarcinogeni, karcinogeni i mutageni rizici za stanovništvo Srbije na osnovu sadržaja akrilamida u prehrambenim proizvodima.

Prema najnovijem istraživanju o potrošnji domaćinstava iz 2023. godine u Srbiji (Republički zavod za statistiku, 2024), dnevni unos nehlebnih proizvoda kao što su keksi (svi tipovi) iznosi 20 g/dan, dok prosečna potrošnja hleba iznosi 170 g/dan. S obzirom na to da i odrasli i deca konzumiraju ove proizvode, u ovom istraživanju se pretpostavlja period konzumacije od 40 godina starosti. Korišćen je scenario hronične izloženosti u cilju realistične procene zdravstvenih rizika. Primenjena je prilagodljiva formula za procenu nekarcinogenih i karcinogenih rizika, koja obuhvata period deteta (prvih 6 godina života) i odrasli period (od 6 do 40 godine života) i koja uključuje različite stope unosa u detinjstvu i odraslom dobu (**Tabela 10**).

Tabela 10. Vrednosti parametara koje su korišćene za procenu zdravstvenih rizika.

	Dete (0-6 godina)		Odrasli (6-40 godina)	
	dete (0-2 godine) i (2-6 godina)		odrasli (6-16 godina) i (16-40 godina)	
	Keks	Tost hleb	Keks	Tost hleb
IR (g/dan)	10	85	20	170
IR _m * (g/dan)	10 i 10	85 i 85	20 i 20	170 i 170
EF (dan/godina)	250	350	250	350
BW (kg)		15		80
ED (godina)		6		34
ED*(godina)	2 i 6	2 i 6	10 i 24	10 i 24

*mutageni

Procenjeni dnevni unos akrilamida za nekarcinogene (EDI_{nc}) i karcinogene (EDI_c) kod keksa i hleba izračunata je primenom sledeće formule, koja uključuje dva konverzionu faktora ($CF1$ i $CF2$), prema smernicama američkog Ministarstva za energetiku (U.S. Department of Energy, 2024).

$$EDI_{nc} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg} \cdot \text{dan}} \right) = \frac{C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) \cdot IR_{adj} \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right)}{AT(ED_{ad}(40(\text{godina}) * 365 \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right))} * CF1 * CF2$$

$$EDI_c \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg} \cdot \text{dan}} \right) = \frac{C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) \cdot IR_{adj} \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right)}{AT(70(\text{godina}) * 365 \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right))} * CF1 * CF2$$

Pri čemu se prilagođena stopa unosa hrane (IR_{adj}) računa prema sledećoj formuli :

$$IR_{adj} \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{IR_{de} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED_{de}(6(\text{godina}))}{BW_{de}(\text{kg})} + \frac{IR_{od} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED((ED_{od} - ED_{de}(\text{godina})))}{BW_{od}(\text{kg})}$$

gde su:

C: koncentracija akrilamida u analiziranim uzorcima ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

IR_{adj} : prilagođena stopa unosa hrane (za decu do 6 godina, ova vrednost je polovina vrednosti navedenih u domaćem istraživanju budžeta domaćinstava za 2023. godinu, dok je za odrasle primenjena puna vrednost) (g/dan);

EF: učestalost izloženosti (350 dana/godina za hleb i 250 dana/godina za ne-hleb proizvode);

ED: trajanje izloženosti tokom perioda konzumiranja (6 godina za decu, 34 (40-6) godine za odrasle);

BW: telesna masa za decu (de) (15 kg) i odrasle (od) (80 kg), ove skraćenice se takođe koriste za označavanje različitih stopa ingestije između odraslih i dece;

AT: prosečno vreme trajanja izloženosti (dan);

$CF1$: faktor konverzije (kg/g);

$CF2$: faktor konverzije ($\text{mg}/\mu\text{g}$).

Zdravstveni rizici su procenjeni korišćenjem metodologija Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) i Američke agencije za zaštitu životne sredine (US EPA). Primenjena su dva pristupa u skladu sa MOE (eng. *Margin Of Exposure*) metodologijom koju preporučuje EFSA (2015) za ocenu bezbednosnih izazova u vezi sa prisustvom kontaminanata u hrani. Jedan pristup koristi prag bezbednosti za nekarcinogene supstance (MOE_{nc}), dok drugi obuhvata i genotoksične i karcinogene supstance za koje prag ne može biti utvrđen (MOE_c).

Granična doza sa donjom granicom pouzdanosti ($BMDL_{10nc}$), vrednost od 0,43 mg/kg telesne mase dnevno, odabrana je kao prag za nekarcinogene efekte akrilamida, prema preporukama EFSA (2015) za kontaminante u lancu ishrane (EFSA CONTAM Panel, 2015, Nur Hidayah *i sar.* 2024; Mollakhalili-Meybodi *i sar.* 2021). Za supstance sa pragom dejstva, minimalna MOE_{nc}

vrednost je tipično postavljena na 100 ili više. Ukoliko odnos padne ispod 100, to može ukazivati na zabrinutost za javno zdravlje. Ova vrednost od 100 izvedena je iz dva faktora nesigurnosti, svaki sa vrednošću 10. Jedan faktor nesigurnosti odnosi se na razlike između životinja i ljudi, dok drugi pokriva varijabilnost među ljudima.

Na osnovu podataka o pojavama adenokarcinoma i adenoma Harderianove (eng. *Harderian*) žlezde kod mužjaka miševa B6C3F1 izloženih akrilamidu tokom dve godine, EFSA (EFSA CONTAM Panel, 2015) je utvrdila najnižu BMDL_{10c} vrednost od 0,17 mg/kg telesne mase dnevno kao referentnu tačku za neoplastične efekte, tj. za genotoksične i karcinogene supstance (Nur Hidayah *i sar.* 2024; Mollakhalili-Meybodi *i sar.* 2021). U slučaju genotoksičnih i karcinogenih supstanci, margina izloženosti (MOE_c) postavljena je na 10.000 ili više, što ukazuje na nisku zabrinutost za javno zdravlje. Formula za izračunavanje MOE_{nc} i MOE_c je sledeća:

$$MOE_{(nc \text{ ili } c)} = \frac{BMDL_{10 \text{ (nc ili c)}}}{EDI_{nc \text{ ili } c}}$$

gde su:

BMDL_{10 (nc ili c)}: granična doza sa donjom granicom pouzdanosti (nc-nekarcinogeno, c-karcinogeno), (mg/kg telesne mase/dan);

EDI_{nc ili c}: procenjeni dnevni unos akrilamida (nc-nekarcinogeno, c-karcinogeno), (mg/kg telesne mase/dan).

Prema US EPA (2024), referentna doza (eng. *Reference Dose*, RfD) za akrilamid je 0,002 mg/kg telesne mase/dan, koja se koristi za izračunavanje koeficijenta opasnosti (eng. *Hazard Quotient*, HQ). Za vrednosti HQ < 1, rizik se smatra prihvatljivim. Formula za izračunavanje HQ je sledeća:

$$HQ = EDI_{nc}/RfD$$

gde su:

EDI_{nc}: procenjeni dnevni unos akrilamida za nekarcinogene efekte (mg/kg telesne mase/dan);

RfD: referentna doza (mg/kg telesne mase/dan).

Pored nekarcinogenog rizika, prema integrisanom sistemu informacija o rizicima (eng. *Integrated Risk Information System*, IRIS), akrilamid je karcinogen sa mutagenim načinom delovanja (Basaran i Sadighara, 2024; Gazi *i sar.* 2023; Nasiri Esfahani *i sar.* 2017; Oracz *i sar.* 2011; Tareke *i sar.* 2002). Faktori prilagođavanja zavisni od starosti primenjeni su na osnovu specifičnih podataka o izloženosti pri proceni rizika od raka, jer hemikalije koje su karcinogeni sa mutagenim načinom delovanja imaju povećanu osetljivost u ranom životnom dobu. Faktor nagiba krive kancera (CSF) od 0,5 po mg/kg telesne mase dnevno ne odražava pretpostavljenu ranu životnu osetljivost za ovu hemikaliju (US EPA, 2024).

Pošto su toksikokinetičke i toksikodinamičke razlike između dece i odraslih najveće tokom prve 2 godine života, primenjeno je 10-struko prilagođavanje. Trostruko prilagođavanje predstavlja srednji stepen prilagođavanja koji se koristi od 2 do 16 godine života (US EPA, 2005b). Ovi faktori prilagođavanja zavisni od starosti primenjeni su u ovom istraživanju, i pored nekarcinogenog rizika, izračunat je i mutageni rizik za sve analizirane uzorke hrane. Procenjeni dnevni unos mutagenih

supstanci (EDI_m) je izračunat prema sledećoj formuli:

$$EDI_m \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg} \cdot \text{dan}} \right) = \frac{C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} \right) \cdot IR_m \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right)}{AT(70_{\text{godina}} \cdot 365 \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right))} \cdot CF1 * CF2$$

gde su:

C: koncentracija akrilamida u analiziranim uzorcima (μg/kg);

IR_m: prilagođena stopa unosa hrane za izračunavanje mutagenog rizika (g/kg);

AT: prosečno vreme trajanja izloženosti (dan);

CF1: faktor konverzije (kg/g);

CF2: faktor konverzije (mg/μg).

Prilagođena stopa unosa hrane za izračunavanje mutagenog rizika (IR_m) je određena na osnovu sledeće četiri životne faze:

- od rođenja do 2 godine;
- od 2 do 6 godina (4 godine);
- od 6 do 16 godina (period puberteta; 10 godina);
- od 16 do 40 godina (24 godine).

Vrednost IR_m je izračunata prema sledećoj formuli:

$$IR_m \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{IR_{0-2 \text{ godina}} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED(2(\text{godina})) \cdot 10}{BW_{0-2 \text{ year}}(\text{kg})} + \frac{IR_{2-6 \text{ godina}} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED(4(\text{godina})) \cdot 3}{BW_{2-6 \text{ year}}(\text{kg})} + \frac{IR_{6-16 \text{ godina}} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED(10(\text{godina})) \cdot 3}{BW_{6-16 \text{ godina}}(\text{kg})} + \frac{IR_{16-40 \text{ godina}} \left(\frac{\text{g}}{\text{dan}} \right) \cdot EF \left(\frac{\text{dan}}{\text{godina}} \right) \cdot ED(24(\text{godina})) \cdot 1}{BW_{16-40 \text{ godina}}(\text{kg})}$$

gde su:

IR_i: stopa unosa hrane prilagođena za različite uzrasne grupe (g/kg);

EF: učestalost izloženosti (dan/godina);

ED: trajanje izloženosti tokom perioda konzumiranja za različite uzrasne grupe (godina);

BW: telesna masa za različite uzrasne grupe (kg).

Mutageni rizik (R_m) je izračunat prema sledećoj formuli:

$$R_m = EDI_m \cdot CSF$$

gde su:

EDI_m : procenjeni dnevni unos mutagenih supstanci (mg/kg telesne mase/dan);

CSF: faktor nagiba krive kancera.

Vrednosti $R_m < 1,00E-6$ smatraju se bezbednim, između $1,00E-6$ i $1,00E-4$ predstavljaju umereni rizik, dok su vrednosti iznad $1,00E-4$ signal značajnog zdravstvenog rizika (Basaran i Sadighara, 2024).

3.7. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka sprovedena je korišćenjem Microsoft Excel paketa (Analysis ToolPak). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD), uz navođenje minimalnih i maksimalnih vrednosti gde je to bilo relevantno.

Za poređenje nivoa akrilamida u različitim vrstama hleba i utvrđivanje statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$) između ispitivanih uzoraka primenjen je jednofaktorski ANOVA test (eng. *Analysis of Variance test*), praćen Tukijevim HSD post-hoc testom (eng. *Tukey's test*). Jednofaktorski ANOVA test zasniva se na poređenju varijanse između grupa sa varijansom unutar grupa kako bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika između tri ili više grupa uzoraka. Test analizira da li su razlike između grupa rezultat slučajnosti ili stvarnih razlika u ispitivanim parametrima. Tukijev HSD test - zasniva se na analizi homogenosti varijabiliteta između dva nezavisna skupa podataka, pri čemu zahteva da razlika između njihovih medijana nije značajno velika. Koristi se kao post-hoc test nakon ANOVA testa da bi se precizno utvrdilo između kojih specifičnih grupa postoje značajne razlike, istovremeno kontrolišući stopu greške prvog tipa pri višestrukim poređenjima.

Za poređenje razlika u sadržaju akrilamida u hlebovima sa i bez semenki korišćen je Velčov t-test (eng. *Welch t-test*) - modifikovana verzija t-testa koja ne pretpostavlja jednake varijanse između grupa, čime se postiže veća robustnost analize.

Za poređenje razlika u sadržaju akrilamida u sredini i kori hleba korišćen je zavisni (eng. *paired*) Student t-test, koji poredi razlike između parova povezanih uzoraka (kora i sredina istog hleba). Test uzima u obzir da su merenja izvršena na istim uzorcima pod različitim uslovima, analizirajući razlike unutar svakog para i testirajući da li je srednja vrednost tih razlika značajno različita od nule.

Za poređenje razlika u sadržaju akrilamida u industrijski i polu-industrijski proizvedenim hlebovima korišćen je nezavisni t-test sa nejednakim varijansama, koji omogućava poređenje srednjih vrednosti dve nezavisne grupe podataka bez pretpostavke da grupe imaju istu varijansu, što je pogodno za uzorke koji mogu imati inherentno različite nivoe varijabilnosti zbog različitih proizvodnih procesa.

Sve razlike sa vrednostima $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA AKRILAMIDA U HRANI

U prvom delu istraživanja, osnovni cilj je bio razvoj i validacija jednostavne, osetljive i robustne analitičke metode za određivanje akrilamida u širokom spektru prehrambenih proizvoda. Postupak razvoja metode podrazumevao je prevazilaženje složenih analitičkih izazova. Specifična priroda akrilamida kao molekula niske molekulske mase, izrazito polarnog ($\log P$: -0,67) sa izuzetnom rastvorljivošću u vodi, predstavljala je prvu prepreku u postizanju adekvatnog hromatografskog razdvajanja. Dodatni izazov predstavljala je značajna raznovrsnost i kompleksnost ispitivanih matriksa, s obzirom da se akrilamid javlja u širokom spektru prehrambenih proizvoda (od hleba i pekarskih proizvoda do prerađene hrane za odojčad). Svaki od ovih matriksa karakteriše specifičan hemijski sastav sa potencijalno ometajućim komponentama koje mogu značajno uticati na ekstrakciju, hromatografsko razdvajanje i detekciju ciljnog analita. Posebno problematičnim se pokazao nedostatak uzoraka hrane koji ne sadrže akrilamid, što je znatno otežalo procenu bitnih parametara validacije (matriks-efekat, efikasnost ekstrakcije, LOQ, LOD).

4.1.1. Optimizacija uslova tečne hromatografije

Prema literaturi konvencionalne reverzno-fazne HPLC kolone (RP-C8, RP-C18) pokazuju nedovoljnu interakciju sa hidrofilnim analitima kao što je akrilamid (Fan *i sar.* 2023). Problem slabog zadržavanja akrilamida u reverzno-faznim sistemima javlja se usled ostvarivanja intenzivnih polarnih interakcija između analita i polarne mobilne faze (uobičajeno voda i polarni organski rastvarač). Nasuprot tome, zbog odsustva polarnih grupa na površini stacionarne faze, polarne supstance bivaju eluirane sa kolone odmah nakon njihovog kontakta s mobilnom fazom. Ovakvo ponašanje akrilamida značajno povećava rizik od ko-eluiranja sa drugim polarnim komponentama matriksa i otežava njegovu kvantifikaciju. Dodatno, prisustvo polarnih ometajućih supstanci koje ko-eluiraju sa akrilamidom na početku hromatograma može dovesti do izraženog matriks efekta u jonskom izvoru masenog spektrometra i uslovima elektrosprej (ESI) jonizacije. Ovaj efekat se manifestuje kao supresija jonizacije analita, što direktno utiče na smanjenje osetljivosti i robustnosti metode (Tölgyesi i Sharma, 2020). U tom smislu glavni izazov u razvoju hromatografske metode za određivanje akrilamida bio je izbor odgovarajuće stacionarne faze.

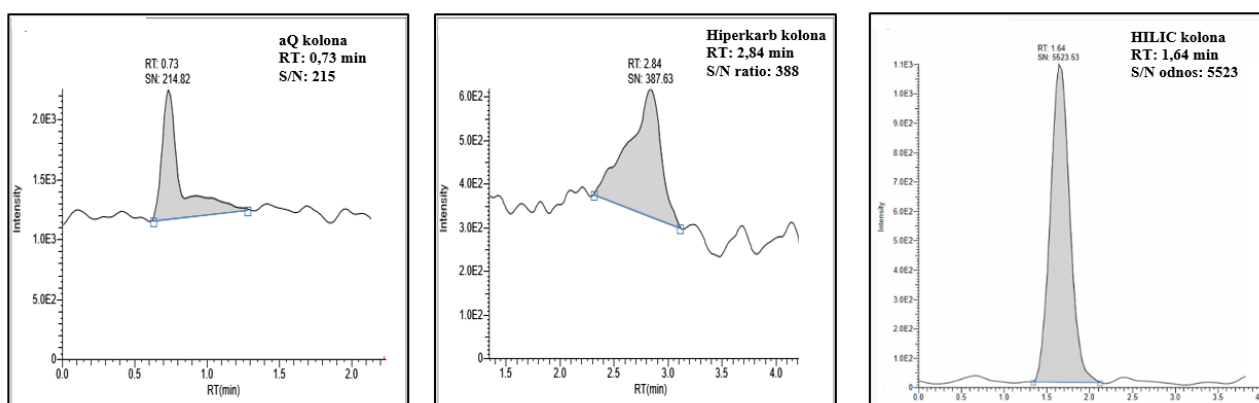
Za prevazilaženje ovih ograničenja, odabrana su tri različita tipa analitičkih HPLC kolona koje se uobičajeno koriste za analizu polarnih i hidrofilnih molekula:

- kolona sa hidrofilno modifikovanom reverzno-faznom stacionarnom fazom (aQ), (Accucore aQ, 100 x 2,1 mm, 2,6 μ m, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US);
- kolona sa poroznom grafitnom ugljeničnom stacionarnom fazom (Hipecarb), (Hypercarb, 50 x 2,1 mm, 5 μ m, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US);
- kolona sa stacionarnom fazom zasnovanom na hidrofilnim interakcijama (HILIC), (Accucore HILIC, 150 x 2,1 mm, 2,6 μ m, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, US).

Cilj sprovedenih eksperimenata bio je postizanje efikasnog hromatografskog razdvajanja akrilamida od ometajućih komponenti matriksa, čime bi se smanjila potreba za složenim i vremenski zahtevnim postupcima prečišćavanja tokom pripreme uzorka za analizu i istovremeno obezbedila veća osetljivost analitičkog postupka.

U cilju objektivne procene hromatografskih karakteristika odabranih kolona, za svaku od njih primenjeni su specifični eksperimentalni uslovi koji odgovaraju njihovim jedinstvenim mehanizmima razdvajanja i fizičko-hemijskim karakteristikama stacionarnih faza. Na sve tri ispitivane kolone poređeni su hromatografski parametri: retenciono vreme, oblik hromatografskog pika, kao i odnos signala prema šumu (eng. *Signal to Noise*, S/N) za akrilamid.

U početnoj fazi istraživanja, preliminarni eksperimenti su sprovedeni sa standardnim rastvorima akrilamida niskih koncentracija (2 ng/mL) pripremljenim u acetonitrilu. Hromatografska analiza na aQ i Hiperkarb kolonama dala je nezadovoljavajuće rezultate, koji su se manifestovali kroz nestabilnu baznu liniju, izražen šum i nepravilan oblik pika (**Slika 14**). Ovakvi nepovoljni analitički signali mogu se direktno povezati sa specifičnim eksperimentalnim uslovima koji su bili neophodni za postizanje zadovoljavajuće retencije akrilamida na ovim kolonama. Konkretno, za adekvatno zadržavanje akrilamida na aQ koloni bilo je potrebno koristiti mobilnu fazu sa veoma visokim udelom vode (H₂O /AcN 95/5 v/v), dok je za Hiperkarb kolonu bila neophodna čak 100% vodena mobilna faza. Mobilne faze sa visokim sadržajem vode takođe smanjuju efikasnost desolvacije u jonskom izvoru masenog spektrometra usled povećanog površinskog napona rastvarača, što negativno utiče na stabilnost elektrosprej jonizacije (Kearle, 2000). Ovi nepovoljni efekti direktno se odražavaju na kvalitet i ponovljivost analitičkog signala, što čini ove kolone manje efikasnim za pouzdanu kvantifikaciju akrilamida pri niskim koncentracijama (Tölgyesi i Sharma, 2020). Razdvajanje na aQ koloni je ukazalo na slabe interakcije stacionarne faze sa molekulom akrilamida, što je rezultiralo njegovim brzim eluiranjem sa kolone (retenciono vreme 0,73 minuta) zbog čega je ova kolona isključena iz daljih ispitivanja.



Slika 14. Hromatogrami akrilamida 2 ng/mL (10 µg/kg) u acetonitrilu, 5 µL injekciona zapremina (RT-retenciono vreme, S/N odnos signal-šum).

Hiperkarb kolona je pokazala znatno bolji afinitet prema akrilamidu (retenciono vreme 2,84 minuta) i odabrana je za dalje analize. HILIC kolona takođe je demonstrirala zadovoljavajuću interakciju sa akrilamidom (retenciono vreme 1,64 min), mada ne tako izraženu kao Hiperkarb kolona. Međutim, ono što je posebno značajno jeste da je HILIC kolona dala izuzetno dobar hromatografski odgovor sa aspekta odnosa signala i šuma (S/N 5523) i oblika pika u odnosu na druge dve kolone (aQ S/N 215; Hiperkarb S/N 288). Uzimajući u obzir sve navedene parametre, Hiperkarb i HILIC kolone su zadržane za dalja ispitivanja.

U cilju konačnog izbora optimalne kolone, sprovedena su uporedna ispitivanja karakteristika HILIC i Hiperkarb kolona analizom kalibracionih rastvora akrilamida rastvorenih u acetonitrilu i sertifikovanih referentnih materijala (hrskavi hleb, hrana za odojčad i čips od povrća), kako bi se procenili parametri: linearnost, limiti detekcije i kvantifikacije, retenciono vreme, rikaveri

i preciznosti. Sertifikovani referentni materijali (eng. *Certified Reference Materials*, CRM) su pripremljeni prema postupku opisanom u odeljku 3.2.5. (po šest priprema za svaki CRM) i paralelno analizirani na obe kolone. Za Hiperkarb kolonu primenjen je izokratski režim eluiranja sa mobilnom fazom koja se sastojala od vodenog rastvora 0,1% mravlje kiseline, pri protoku od 0,3 mL/min i temperaturi kolone od 25 °C. Zapremina injektovanja na obe kolone iznosila je 5 µL.

Iako je Hiperkarb kolona demonstrirala izraženiji afinitet prema akrilamidu (retenciono vreme $2,84 \pm 0,1$ min) u poređenju sa HILIC kolonom ($1,64 \pm 0,1$ min), HILIC kolona je pokazala superiornost u više analitičkih aspekata. Prema podacima prikazanim u **Tabeli 11**, HILIC kolona je omogućila širi linearan opseg (10–2500 µg/kg) u poređenju sa Hiperkarb kolonom (25–2500 µg/kg), kao i niže vrednosti limita detekcije (2,71 µg/kg) i limita kvantifikacije (9,02 µg/kg), što je od suštinske važnosti za analizu uzoraka sa niskim koncentracijama akrilamida. Dodatno, veća vrednost koeficijenta korelacije ($r^2 = 0,9992$) potvrđuje bolju linearnost odziva metode na HILIC koloni u odnosu na Hiperkarb ($r^2 = 0,9970$).

Tabela 11. Rezultati poređenje karakteristika Hiperkarb i HILIC kolona (linearan opseg, koeficijent korelacije, limiti detekcije i kvantifikacije, retenciono vreme).

Parametar ispitivanja	HILIC kolona	Hiperkarb kolona
Linearan opseg (µg/kg)	10-2500	25-2500
Koeficijent korelacije (r^2)	0,9992	0,9970
Limit detekcije (µg/kg)	2,71	6,50
Limit kvantifikacije (µg/kg)	9,02	21,66
Retenciono vreme (min)	$1,64 \pm 0,1$	$2,84 \pm 0,1$

Rezultati analize sertifikovanih referentnih materijala, na obe kolone dodatno potvrđuju bolje karakteristike HILIC kolone (**Tabela 12**). U pogledu vrednosti za rikaveri, HILIC kolona je ostvarila gotovo kvantitativni povraćaj analita u svim ispitivanim uzorcima (99,7% za hrskavi hleb, 98,9% za hranu za odojčad, 101,5% za čips od povrća), dok su vrednosti dobijene korišćenjem Hiperkarb kolone bile značajno niže, posebno za čips (75,59%). Takođe je postignuta bolja preciznost rezultata na HILIC koloni (3,8% RSD) u odnosu na Hiperkarb kolonu (9,32% RSD).

Tabela 12. Poređenje analitičkih karakteristika Hiperkarb i HILIC kolona (rikaveri i preciznost).

Uzorak (sertifikovana koncentracija akrilamida)	Rikaveri %		Preciznost % RSD	
	HILIC kolona	Hiperkarb kolona	HILIC kolona	Hiperkarb kolona
Hrskavi hleb (52,9 µg/kg)	99,7	93,13	3,80	9,32
Hrana za odojčad (196 µg/kg)	98,9	97,09	3,70	5,32
Čips od povrća (1035 µg/kg)	101,5	75,59	2,10	2,49

Pored kvantitativnih parametara, tokom analize uzoraka na Hiperkarb koloni zapažen je i nepravilan oblik hromatografskog pika akrilamida (**Slika 14**), što se može pripisati nekompatibilnosti između mobilne faze (100% voda) i ekstrakta uzorka (acetonitril). Ova razlika u eluotropskoj jačini vode i acetonitrila dovodi do formiranja lokalnog gradijenta na početku hromatografske kolone prilikom injektovanja uzorka, što rezultuje promenom retencionog ponašanja akrilamida i deformacijom pika (Loeser *i sar.* 2006). Uzimajući u obzir sve navedene faktore: bolji odnos signala i šuma (S/N 5523 kod HILIC kolone u poređenju sa S/N 288 kod Hiperkarb), niže vrednosti LOD i

LOQ, pravilniji oblik pika, kao i bolje vrednosti za preciznost i rikaveri, HILIC kolona je odabrana kao optimalno rešenje za dalji tok istraživanja.

Optimizacija HILIC hromatografskih uslova

Optimizacija HILIC hromatografskih uslova bila je usmerena na izbor odgovarajućeg režima eluiranja, procenu sastava i protoka mobilne faze, kao i kompatibilnost mobilne faze i rastvarača u kome se nalazi finalni ekstrakt uzorka. Posebna pažnja posvećena je njihovom uticaju na retenciono vreme, oblik pika i odnos signal-šum (S/N) za akrilamid. Pregled parametara i hromatografskih uslova koji su bili obuhvaćeni postupkom optimizacije dat je u **Tabeli 13**.

Tokom optimizacije HILIC hromatografskih uslova, uzete su u obzir sledeće činjenice i preporuke proizvođača kolone (Thermo Scientific, 2014):

- voda deluje kao snažno eluciono sredstvo u uslovima HILIC hromatografije;
- povećanjem procenta organskog rastvarača (posebno acetonitrila), jačaju interakcije između stacionarne faze i polarnih analita, ali mobilna faza treba da sadrži najmanje 3% vode;
- preporučuje se da ekstrakt uzorka sadrži >50% organskog rastvarača i to po mogućnosti onog koji čini mobilnu fazu;
- HILIC interakcije su kinetički sporije u poređenju sa reverzno-faznim sistemima, što zahteva duže vreme za uspostavljanje ravnoteže kolone (obično 2–4 puta duže nego u RP-HPLC).

Prema podacima iz literature, acetonitril je prepoznat kao pogodniji organski rastvarač za HILIC hromatografiju, u poređenju sa metanolom. Kao polarni aprotični rastvarač, acetonitril daje uže hromatografske pikove i efikasnije hromatografsko razdvajanje, dok metanol, kao polarni protični rastvarač, dovodi do šireg pika bez značajnog poboljšanja retencije (Bernal *i sar.* 2011).

Tabela 13. Pregled parametara i uslova obuhvaćenih u eksperimentima optimizacije HILIC uslova hromatografije.

Sastav mobilne faze	Mobilna faza A mravlja kiselina u acetonitrilu 0,1% (v/v)	Mobilna faza B mravlja kiselina u vodi 0,1% (v/v)
	95% 90%* 80%	5% 10%* 20%
Elucioni režim	Gradijentni Izokratski*	
Protok mobilne faze	0,1 mL/min 0,2 mL/min 0,3 mL/min*	
Injekciona zapremina	5 µL* 10 µL 15 µL	

*parametri i uslovi korišćeni za dalju optimizaciju HILIC-MS/MS metode

Iako je u početku razmatrano gradijentno eluiranje, tokom eksperimentalnog rada potvrđena je tvrdnja da su HILIC mehanizmi kinetički sporiji od uobičajenih mehanizama u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji (Nguyen i Schug, 2008). Ova činjenica je direktno uticala na vreme potrebno

za ponovno uspostavljanje početnih uslova, što je negativno uticalo na stabilnost i ponovljivost retencionog vremena za akrilamid. Iz tog razloga, dalja istraživanja su usmerena ka razvoju izokratskog režima eluiranja, u cilju povećanja robustnosti i ponovljivosti merenja.

Posebna pažnja posvećena je kompatibilnosti između sastava mobilne faze i rastvarača u kome je rastvoren ekstrakt uzorka. Poznato je da injektovanje ekstrakta u rastvaraču koji je eluotropski jači od mobilne faze može dovesti do deformacija hromatografskog pika, posebno za analite koji rano eluiraju poput akrilamida (González-Curbelo *i sar.* 2015). U tom kontekstu, optimizacija hromatografskih uslova bila je direktno povezana sa pripremom uzorka, što je bio jedan od razloga za izbor QuEChERS metode pripreme uzorka, koja daje finalni ekstrakt u acetonitrilu. Budući da je finalni ekstrakt dobijen QuEChERS metodom u acetonitrilu, mobilna faza je formulisana tako da sadrži visok procenat istog rastvarača, čime je obezbeđena kompatibilnost i stabilnost hromatografskog odziva.

Ispitivan je uticaj različitih sastava mobilne faze i protoka na hromatografska svojstva akrilamida (**Tabela P1**). Eksperimentalno su testirani sledeći sastavi mobilne faze sa 0,1% mravlje kiseline (HCOOH): AcN/H₂O 95/5, 90/10 i 80/20 (v/v), pri protocima od 0,1, 0,2 i 0,3 mL/min, kao i različite zapremine injektovanja (5, 10 i 15 µL). Kao što je prikazano u **Tabeli P1**, najveći odnos signal-šum (S/N) za akrilamid (943) dobijen je za sastav mobilne faze AcN/H₂O 90/10 (v/v) sa 0,1% HCOOH pri protoku od 0,3 mL/min. Iako povećanje procenta organskog rastvarača dovodi do povećanja retencije u HILIC hromatografiji, utvrđeni su optimalni uslovi za akrilamid pri srednjem udelu acetonitrila (90%). Mobilna faza sa 80% acetonitrila pokazala je značajno niži odnos signal-šum, dok je mobilna faza sa 95% acetonitrila dala nešto bolji oblik pika, ali uz manji S/N odnos u poređenju sa odabranim uslovima. Povećanje protoka sa 0,2 na 0,3 mL/min dovelo je do bržeg eluiranja akrilamida, ali je istovremeno rezultiralo značajnim poboljšanjem odnosa signal-šum. Ovo se može objasniti manjim difuzionim širenjem pika pri većim protocima, što dovodi do užih i viših pikova, a time i većeg S/N odnosa.

Pri odabranim optimalnim uslovima (mobilna faza AcN/ H₂O 90/10 (v/v) sa 0,1% HCOOH, protok 0,3 mL/min), retenciono vreme akrilamida iznosilo je 1,64 minuta, što je omogućilo brzu analizu. Za optimalno vreme izokratskog eluiranja određeno je trajanje od 5 minuta, pri čemu je robustnost i stabilnost ovog vremena ispitana kroz validaciju metode (sledi u odeljku-validacija metode). Tokom testiranja različitih zapremina injektovanja, nisu uočene značajne razlike u obliku pika, usvojena je injekciona zapremina od 5 µL u cilju minimiziranja matriks efekta u toku analize realnih uzoraka.

Jedna od značajnih prednosti korišćenja HILIC kolone u ovom istraživanju bio je relativno nizak povratni pritisak na HPLC pumpi, što je posledica niske viskoznosti mobilne faze sa visokim sadržajem organskog rastvarača u odnosu na vodu. Ovo pogoduje dugotrajnom radu HPLC sistema i omogućava veću robustnost metode.

Tokom analize realnih uzoraka, robustnost kolone je testirana injektovanjem jednog sertifikovanog kontrolnog uzorka (Hrana za odojčad, Infant Food-T30102QC, sertifikovana koncentracija akrilamida 196 µg/kg) iz iste viala (n = 6 injektovanja) nakon svakih deset injektovanja uzoraka. Dobijeno prosečno odstupanje od referentne vrednosti (bias) od -2,9% sa preciznošću od 2,9% RSD za kontrolni uzorak pokazalo je dobru stabilnost kolone. Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata, zaključeno je da tokom analize serije od 50 realnih uzoraka, nije potrebno dodatno ispiranje ili kondicioniranje kolone, čime je opravdano vreme trajanja analize od 5 minuta, kao i robustnost kolone.

Na kraju dnevnih operacija, kolona je ispirana 30 minuta smešom AcN/ H₂O (60/40, v/v). Nakon toga, re-ekvilibrirana je 30 minuta do početnih uslova (AcN/H₂O 90/10 (v/v) 0,1% HCOOH sa protokom 0,3 mL/min) kako bi bila pripremljena za dalji rad. Prema preporuci proizvođača, medijum 90/10 (v/v) AcN/H₂O smatra se pogodnim za dugoročno skladištenje (Thermo Scientific, 2014). Sve ovo pokazalo se kao dobra laboratorijska praksa, što potvrđuje činjenica da su svi predstavljeni rezultati u ovoj studiji dobijeni i sprovedeni na jednoj koloni koja i dalje pokazuje dobre karakteristike.

4.1.2. Optimizacija parametara masene spektrometrije

U cilju postizanja optimalne osetljivosti i selektivnosti, sprovedena je detaljna analiza parametara masene spektrometrije (MS parametri) korišćenjem pojedinačnih standardnih rastvora akrilamida i izotopski obeleženog analoga ¹³C₃-akrilamida koncentracije 1 mg/mL. Za optimizaciju MS/MS parametara primenjen je mod direktne infuzije standardnih rastvora u maseni spektrometar, zajedno sa mobilnom fazom. Ovakav pristup omogućava precizno podešavanje parametara bez uticaja hromatografskog razdvajanja, čime se postiže maksimalna osetljivost detekcije analita (Kumari *i sar.* 2023; Calbiani *i sar.* 2004). U režimu punog skeniranja (eng. *Full Scan Mode*, FS) identifikovani su najintenzivniji prekursor joni za akrilamid (m/z 72,1) i ¹³C₃-akrilamid (m/z 75,2), koji odgovaraju protonovanim molekulskim jonima [M+H]⁺. Korišćenje ESI+ jonizacionog moda pokazalo se kao optimalno za jonizaciju akrilamida, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Tölgyesi i Sharma, 2020).

Nakon selekcije prekursor jona, primenom MS/MS režima skeniranja (eng. *Selected Reaction Monitoring*, SRM) identifikovani su najintenzivniji produkt-joni prekursora za akrilamid (m/z 72,1) i ¹³C₃-akrilamid (m/z 75,2). Za akrilamid, dominantni produkt-jon 55,4 m/z , koji nastaje gubitkom -NH₃ grupe, odabran je za kvantifikaciju (SRM kvantifikacija). Ovaj mehanizam fragmentacije je karakterističan za akrilamid i doprinosi specifičnosti metode, što je u skladu sa literaturnim podacima (Elbashir *i sar.* 2014). Analogno tome, za interni standard ¹³C₃-akrilamid, jon 58,3 m/z pokazao je najveći intenzitet i izabran je za kvantifikaciju.

Za pouzdanu identifikaciju akrilamida neophodno je pratiti dodatne karakteristične produkt-jone (SRM identifikacija). Za akrilamid kao dodatni produkt-joni odabrani su m/z 54,3 i m/z 44,3, dok su za ¹³C₃-akrilamid m/z 45,4 i m/z 29,6. Korišćenje višestrukih tranzicija ili režima praćenja višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM) značajno povećava pouzdanost identifikacije i smanjuje mogućnost lažno pozitivnih rezultata, što je posebno važno kod kompleksnih matriksa hrane (Wenzl *i sar.* 2003). Za postizanje maksimalnog intenziteta signala produkt-jona izvršena je optimizacija kolizione energije (CE). Za kvantifikacione tranzicije, optimalne kolizione energije su određene na 11 eV za akrilamid i 10 eV za ¹³C₃-akrilamid, dok su za kvalifikacione tranzicije primenjene energije u opsegu 20-22 eV (**Tabela 8**, odeljak 3.4.).

Relativni odnosi intenziteta kvalifikacionih i kvantifikacionih tranzicija predstavljaju važan kriterijum za potvrdu identiteta analita. Kod akrilamida, određeni su relativni odnosi tranzicija (SRM kvalitativno/SRM kvantitativno) koji su dati u **Tabeli 8** (odeljak 3.4.). Ovi odnosi su korišćeni kao dodatni kriterijum identifikacije akrilamida u realnim uzorcima, čime se postiže visoka specifičnost metode u skladu sa preporukama za analizu tragova kontaminanata u hrani prema smernicama dokumenta SANTE/11312/2021v2 (European Commission, 2021).

Pored optimizacije parametara masenog spektrometra koji se odnose na maseni analizator, posebna pažnja je posvećena i optimizaciji parametara jonskog izvora. Utvrđeno je da napon

elektrospreja ima bitan uticaj na intenzitet signala akrilamida, što je u skladu sa karakteristikama ESI jonizacije. Optimalni napon elektrospreja od 3,5 kV obezbedio je maksimalni intenzitet signala, kako za akrilamid tako i za njegov izotopski obeležen analog. Temperatura isparivača (250 °C) i temperatura jon-transfer tube (200 °C) takođe su pažljivo optimizovane kako bi se obezbedila optimalna desolvatacija i stabilnost signala akrilamida. Više temperature mogu dovesti do termalne degradacije akrilamida, dok niže temperature mogu rezultirati nepotpunom desolvatacijom i smanjenjem osetljivosti detekcije (Rosén i Hellenäs, 2002).

4.1.3. Optimizacija postupka pripreme uzoraka za HILIC-MS/MS analizu

U ovom delu istraživanja optimizovan je postupak brze, jednostavne, ekonomične, efikasne i pouzdane ekstrakcije (eng. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*, QuEChERS) akrilamida, koji je izvorno razvijen za analizu pesticida ali je pokazao izuzetnu primenljivost i za druge kontaminante u hrani (Mastovska i Lehotay, 2006). Ova metoda je posebno pogodna za analizu akrilamida zbog svoje brzine, ekonomičnosti i kompatibilnosti finalnog ekstrakta (acetonitril) sa sastavom mobilne faze odabrane za dalji razvoj analitičkog postupka (**Tabela 13**, odeljak 4.1.1.). Tokom optimizacije pažnja je bila usmerena na sledeće parametre:

- masa uzorka za ekstrakciju;
- postupak ekstrakcije (različite kombinacije soli);
- postupak prečišćavanja ekstrakta.

Postupak optimizacije parametara pripreme uzorka je sproveden sa sertifikovanim referentnim materijalom hrskavi hleb (eng. *Crisp Bread*, QC-0194, sertifikovana koncentracija akrilamida 52,9 µg/kg). U cilju praćenja efekata optimizacije, za svaki parametar su pripremljena i analizirana po dva uzorka hrskavog hleba i procenjeni su parametri % rikaveri i preciznost (% RSD). Dodatno, za procenu efekata optimizacije parametara masa uzorka i prečišćavanja uzoraka praćen je odnos signal-šum (S/N) za akrilamid.

Rezultati predstavljeni u **Tabeli P2** pokazuju izrazitu zavisnost parametara kvaliteta analitičkog signala za akrilamid od primenjenog postupka pripreme uzorka. Uzorci pripremljeni bez prečišćavanja ekstrakta dali su najlošije rezultate analize u pogledu odnosa signal/šum (S/N 1196). Iako su ove vrednosti odnosa signal/šum zadovoljavajuće za detekciju akrilamida u uzorku, hromatogrami analiziranih uzoraka bez prečišćavanja pokazuju povišenu baznu liniju i prisustvo dodatnih pikova, što jasno ukazuje na prisustvo ometajućih komponenti iz matriksa. Uprkos dobrom rezultatu rikaveri testa (99,92%), preciznost ove metode nije bila zadovoljavajuća (8,00% RSD). Uvođenje prvog koraka prečišćavanja sa 5 mL *n*-heksana dovelo je do značajnog poboljšanja odnosa signal-šum, sa srednjom S/N vrednošću od 3904. Ovo poboljšanje se može objasniti efikasnim uklanjanjem nepolarnih lipidnih komponenti koje mogu ometati jonizaciju akrilamida (Mastovska i Lehotay, 2006). Hromatogrami ovih uzoraka pokazuju znatno čistiju baznu liniju i bolje definisan pik akrilamida u poređenju sa uzorcima bez prečišćavanja. Vrednost rikaveri od 89,32% sa preciznošću od 1,16% ukazivali su na određeni gubitak analita tokom postupka prečišćavanja, ali sa značajno poboljšanom preciznošću. Najbolji rezultati su postignuti kombinacijom prečišćavanja sa *n*-heksanom i postupkom disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi (dSPE) sa komercijalnom smešom sorbenata QuEChERS Mix VI (anhidrovani MgSO₄, PSA i C18). Ovaj postupak rezultirao je srednjom S/N vrednošću od 32654, što predstavlja poboljšanje od približno 27 puta u odnosu na uzorke bez prečišćavanja. Na hromatogramima ovako prečišćenih uzoraka uočena čista bazna linija sa jasno definisanim pikom akrilamida, što je ukazivalo na minimalne smetnje matriksa. Postignut rikaveri od 96,27% sa preciznošću od 0,12% RSD ukazuju na dobru efikasnost ekstrakcije i reproduktivnost uz minimalan gubitak analita. Efikasnost kombinovanog postupka prečišćavanja

može se objasniti komplementarnim mehanizmima uklanjanja različitih ometajućih komponenti. PSA sorbent efikasno adsorbira polarne supstance poput organskih kiselina, masnih kiselina i šećera formiranjem –NH–H veza, omogućavajući njihovo uklanjanje dok akrilamid ostaje u tečnoj fazi. C18 sorbent (oktadecil silika) dodatno uklanja lipide prisutne u matriksu, dok anhidrovani MgSO_4 efikasno smanjuje sadržaj vode u ekstraktu (Kumari *i sar.* 2023).

Rezultati pripreme sa različitim masama uzorka (2 g i 5 g) pokazuju da uprkos tome što veća masa uzorka (5g) teoretski omogućava veću apsolutnu količinu analita, u ovom slučaju manja masa (2 g) daje optimalnije rezultate za dati postupak pripreme, sa srednjim S/N odnosom od 32654 naspram 27303 za masu uzorka od 5 g. Uzorci mase 5 g pokazuju bolji rikaveri (109,21%), ali sa značajno lošijom preciznošću (6,00% RSD) u poređenju sa uzorcima mase 2 g (0,12% RSD). Ovo se može objasniti činjenicom da veća masa uzorka istovremeno znači i veću količinu potencijalno ometajućih komponenti matriksa, što može dovesti do pojačanog efekta supresije signala za akrilamid tokom jonizacije u jonskom izvoru (Petersson *i sar.* 2006).

Optimizacija postupka QuEChERS ekstrakcije

Nakon optimizacije postupka prečišćavanja i mase uzorka, dodatno su ispitana dva različita pristupa QuEChERS ekstrakcije, koji se razlikuju po kombinaciji soli za ekstrakciju, dok je postupak prečišćavanja ostao isti:

1. Pristup prema studiji Mastovska i Lehotay (2006) - ekstrakcija sa 4 g anhidrovanog MgSO_4 i 0,5 g NaCl, korišćenjem komercijalne smeše soli (QuEChERS-Acrylamide LLE Method, *Lab.Instruments S.R.L.*; Bari, Italy);
2. EN 15662 pristup - QuEChERS Mix I komercijalna smeša soli koja se koristi za multirezidualnu analizu pesticida prema standardnoj metodi EN 15662, a podrazumeva kombinaciju: 4 g anhidrovanog MgSO_4 , 1 g NaCl, 0,5 g dinatrijum-hidrogencitrata seskvihidrata i 1 g trinatrijum-citrata dihidrata.

Eksperimentalni rezultati su pokazali da oba pristupa daju uporedive rezultate, sa određenim prednostima za EN 15662 pristup. Uporedni rezultati za ove dve kombinacije soli pokazuju da oba pristupa imaju zadovoljavajuće rikaveri vrednosti, ali da postoji značajna razlika u preciznosti. Efikasnost ekstrakcije prema pristupu Mastovska i Lehotay (2006) dao je srednji rikaveri od 99,12% ali sa relativno visokom relativnom standardnom devijacijom (14,83% RSD), dok je EN 15662 pristup pokazao sličan srednji rikaveri od 98,48%, ali sa značajno boljom preciznošću (3,70% RSD). Ova značajno bolja preciznost EN 15662 pristupa može se pripisati prisustvu citratnih soli (dinatrijum-hidrogencitrat seskvihidrata i trinatrijum-citrat dihidrat, citratni pufer) u komercijalnoj smeši, koje doprinose boljem puferisanju ekstrakcionog medijuma i time stabilnijoj ekstrakciji akrilamida. Citratni pufer pomaže u stabilizaciji pH vrednosti tokom ekstrakcije, što obezbeđuje ujednačenije uslove ekstrakcije i posledično bolju ponovljivost rezultata.

Na osnovu predstavljenih rezultata, za dalja istraživanja usvojen je postupak ekstrakcije uzoraka koji podrazumeva odmerenu masu uzorka od 2 g, ekstrakciju zasnovanu na EN 15662 pristupu (QuEChERS Mix I smeša soli) i dvostepeno prečišćavanje ekstrakta sa 5 mL *n*-heksana (pre ekstrakcije) i dSPE sa PSA i C18 (nakon ekstrakcije) (**Slika 12**, odeljak 3.3.)

4.1.4. Rezultati validacije analitičkog postupka

Validacija optimizovane metode sprovedena je kroz tri međusobno povezane faze koje su omogućile sveobuhvatnu procenu karakteristika razvijenog analitičkog postupka.

U prvoj fazi validacije procenjeni su efikasnost ekstrakcije (% rikaveri) i preciznost (% RSD) analitičkog postupka korišćenjem sertifikovanih referentnih materijala (navedeno u odeljku 3.2.2.). Dobijeni rezultati su poslužili kao preliminarni pokazatelji pouzdanosti metode.

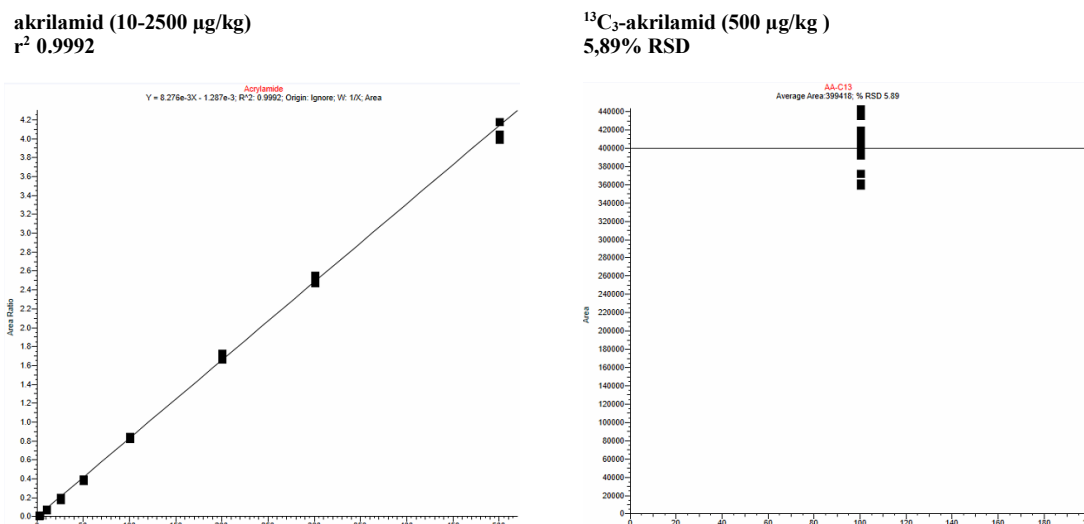
Druga faza validacije bila je usmerena na razvoj postupka za dobijanje hleba bez prisustva akrilamida (blank uzorak). Ovaj korak je bio od značaja, jer je poznato da svi proizvodi koji su predmet ovog istraživanja sadrže akrilamid, što znatno otežava validaciju metode, naročito procenu uticaja matriksa. Za pripremu blank uzorka korišćen je komercijalni proizvod enzima asparaginaze, Acrylaway (Novozymes; Danska), koji sprečava formiranje akrilamida kroz konverziju asparagina u aspartsku kiselinu. U prvoj fazi optimizacije, pripreme blank uzorka hleba primenjena je od strane proizvođača preporučena masa preparata enzima od 1 g na 1 kg brašna uz pečenje na 220 °C tokom 30 minuta, što je rezultiralo sadržajem akrilamida od 13,58 µg/kg. U drugoj fazi, zadržana je ista doza enzima ali je temperatura pečenja snižena na 150 °C, čime je koncentracija akrilamida smanjena na 7,52 µg/kg. Konačno, kombinovanjem povećane mase preparata enzima (5 g na 1 kg brašna) sa nižom temperaturom pečenja (150 °C tokom 40 minuta), uspešno je dobijen hleb bez detektibilnog prisustva akrilamida. Dobijeni rezultati bili su u skladu sa literaturnim podacima o značajnom uticaju temperature na formiranje akrilamida u pekarskim proizvodima i efikasnosti enzima asparaginaze u prevenciji nastanka ovog jedinjenja.

Dobijeni blank uzorak hleba predstavljao je osnovu za pripremu obogaćenih kontrolnih uzoraka sa poznatim koncentracijama akrilamida, koji su korišćeni u trećoj, finalnoj fazi validacije za detaljnu procenu analitičkih parametara metode: limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ) i matriks efekat.

Validacija analitičkog postupka je sprovedena u skladu sa smernicama dokumenta SANTE/11312/2021v2 (European Commission, 2021) i nacionalnim pravilnikom („Sl. glasnik RS“ br. 73/2024 i 90/2024), uz procenu svih relevantnih parametara validacije navedenih u **Tabeli 9** (odeljak 3.5.) i prema postupku opisanom u eksperimentalnom delu u odeljku 3.5. Rezultati validacije optimizovane HILIC-MS/MS metode prikazani su u **Tabeli P3**.

Linearnost i opseg metode

Metoda je pokazala visok stepen linearnosti u opsegu koncentracija 10-2500 µg/kg, sa koeficijentom korelacije $r^2 = 0,9992$ (**Slika 15**). Rezidualne vrednosti za sve kalibracione tačke bile su manje od 10%, što je znatno ispod maksimalno dozvoljene granice od 20% prema kriterijumima SANTE/11312/2021v2. Dobijeni visok koeficijent korelacije i niske rezidualne vrednosti potvrđuju pouzdanost kvantifikacije akrilamida u širokom opsegu koncentracija relevantnih za analizu realnih uzoraka hrane. Relativna standardna devijacija (% RSD) za 500 µg/kg $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida iznosila je 5,89% (**Slika 15**), što potvrđuje stabilnost odziva internog standarda tokom analize. U okviru procene linearnosti ispitan je i potencijalni prenos analita (eng. *Carryover*) nakon injektovanja najviše tačke kalibracije (2500 µg/kg) injektovanjem rastvarača (acetonitril), pri čemu akrilamid nije detektovan. Ovaj rezultat potvrđuje da nema značajnog zadržavanja akrilamida u sistemu, što je važno za pouzdanost uzastopnih analiza bez rizika od lažno pozitivnih rezultata ili kontaminacije uzoraka.



Slika 15. Kalibraciona kriva za akrilamid (10-2500 µg/kg) i ponovljivost internog standarda $^{13}\text{C}_3$ -akrilamida (500 µg/kg).

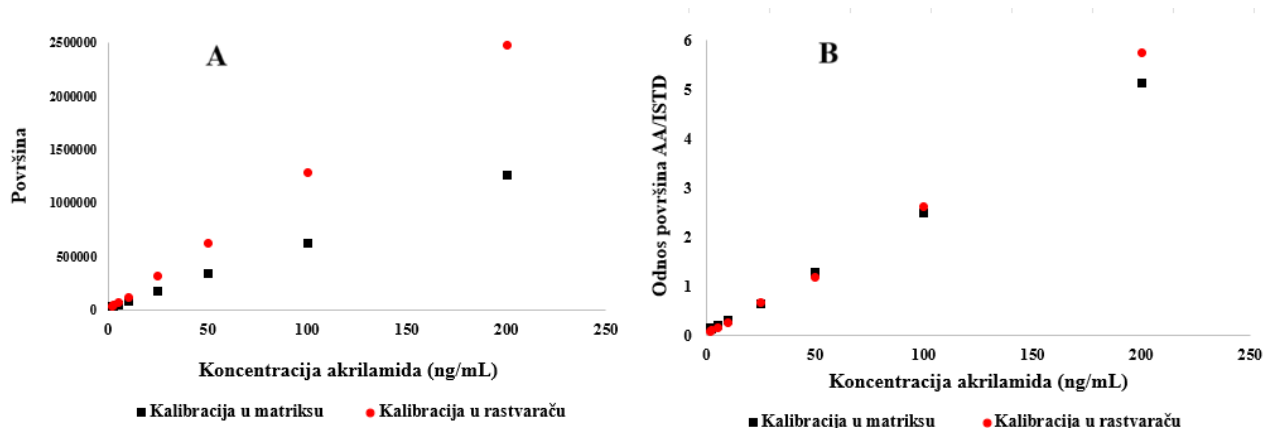
Limiti detekcije i kvantifikacije

Teorijski procenjena vrednost limita detekcije (LOD) iznosila je 2,71 µg/kg, a limita kvantifikacije (LOQ) 9,02 µg/kg, dok je eksperimentalno potvrđena vrednost LOQ zaokružena na 10 µg/kg. Validacija LOQ vrednosti sprovedena je eksperimentalno analizom blank uzorka hleba obogaćenog akrilamidom na nivou koncentracije 10 µg/kg, pri čemu su zadovoljeni svi kriterijumi prihvatljivosti: odnos signal-šum > 10 za sve SRM tranzicije, preciznost < 20% RSD (izmerena vrednost 3,60% RSD) i rikaveri u opsegu 70-120% (izmerena vrednost 102,80%).

Postignute vrednosti LOD i LOQ ukazuju na visoku osetljivost razvijene metode, koja omogućava pouzdanu kvantifikaciju akrilamida na koncentracijama koje su relevantne za procenu bezbednosti hrane i usklađene sa aktuelnim regulatornim zahtevima prikazanim u **Tabeli 6** (odjeljak 2.9.4.) Eksperimentalno dobijena vrednost LOQ od 10 µg/kg značajno je niža od propisanih nivoa referentnih vrednosti akrilamida u hrani u Republici Srbiji (RS) i Evropskoj uniji (EU), što potvrđuje primenljivost metode za regulatornu kontrolu sadržaja akrilamida u prehrambenim proizvodima.

Matriks efekat

Ispitivanje matriks efekta pokazalo je značajnu razliku između kalibracije sa internim standardom (12%) i eksternim standardom (50%). Niži nagib kalibracione krive akrilamida u matriksu u poređenju sa kalibracionom krivom u rastvaraču ukazivao je na supresiju jonizacije akrilamida (**Slika 16**). Dobijeni rezultati su potvrdili neophodnost primene izotopski obeleženog internog standarda ($^{13}\text{C}_3$ -akrilamid) u analizi akrilamida HILIC-MS/MS metodom. Upotreba internog standarda efikasno je kompenzovala uticaj matriksa, čime je matriks efekat smanjen sa 50% na prihvatljivih 12%, što je unutar kriterijuma prihvatljivosti od $\pm 20\%$ prema smernicama dokumenta SANTE/11312/2021v2 (European Commission, 2021). Ovo je omogućilo primenu kalibracione krive u rastvaraču za kvantifikaciju akrilamida u različitim uzorcima hrane, što je značajno pojednostavilo analitički postupak i povećalo efikasnost metode.



Slika 16. Matriks efekat: poređenje kalibracionih krivih za određivanje akrilamida u matriksu i rastvaraču: (A) eksterni standard kalibracija, (B) kalibracija sa internim standardom (ISTD) u matriksu i acetonitrilu.

Rikaveri i preciznost

Rezultati rikaveri testa za sertifikovane referentne materijale bili su u skladu sa postavljenim kriterijumima, sa vrednostima u opsegu od 97,30% do 102,80% za različite tipove uzoraka i nivoa koncentracija. Za hrskavi hleb (52,9 $\mu\text{g/kg}$) rikaveri je iznosio 99,70%, za hranu za odojčad (196 $\mu\text{g/kg}$) 98,90%, a za čips od povrća (1035 $\mu\text{g/kg}$) 101,50%. Slični rezultati dobijeni su i za obogaćene blank uzorke hleba na tri nivoa koncentracije (10, 50 i 1000 $\mu\text{g/kg}$). Dobijene eksperimentalne vrednosti su bile u okviru kriterijuma prihvatljivosti (70-120%). Preciznost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (% RSD), zadovoljila je postavljene kriterijume kako za unutardnevnu tako i za međudnevnu preciznost, sa vrednostima ispod maksimalno dozvoljene granice od 20% RSD. Vrednost unutardnevne preciznosti za CRM uzorke bile su opsegu od 2,10% do 3,80%, dok je za obogaćene blank uzorke hleba bila u opsegu od 2,80% do 3,60%. Međudnevna preciznost je bila u opsegu od 3,00% do 4,00%, što je ukazivalo na zadovoljavajuću ponovljivost i reproduktivnost metode.

Specifičnost

Hromatogrami blank uzoraka nisu pokazali prisustvo interferirajućih signala na retencionom vremenu akrilamida (1,64 min) ni za jednu od praćenih SRM tranzicija. Intenzitet eventualnih signala na retencionom vremenu akrilamida bio je značajno ispod 30% LOQ nivoa, čime je zadovoljen kriterijum specifičnosti prema SANTE/11312/2021v2 smernicama (European Commission, 2021). Ovaj rezultat potvrđuje da komponente matriksa ne utiču na detekciju i kvantifikaciju akrilamida, čime je obezbeđena visoka selektivnost metode.

Robustnost metode

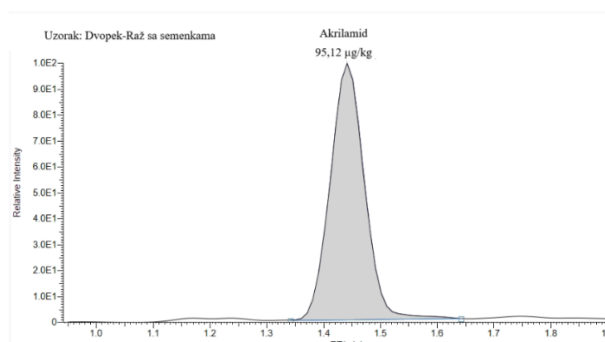
Robustnost razvijene HILIC-MS/MS metode sistematski je procenjena kroz dugoročno praćenje njenih performansi tokom perioda od 60 dana, kroz internu kontrolu kvaliteta. Sertifikovani referentni materijal hrskavog hleba korišćen je kao kontrolni standard za verifikaciju performansi metode, pri čemu je utvrđen prosečan rikaveri od 95,0% uz preciznost od 3,7% RSD. Kontinuirano

ispitivanje ovog referentnog materijala tokom analize realnih uzoraka obezbedilo je dodatni nivo kontrole kvaliteta i potvrdilo konzistentnost razvijenog analitičkog postupka u rutinskim laboratorijskim uslovima. S obzirom da je optimizovana analiza akrilamida podrazumevala kratko vreme hromatografskog razdvajanja (5 minuta) pod izokratskim uslovima eluiranja, robustnost kolone dodatno je testirana sistematskim injektovanjem sertifikovanog referentnog materijala uzorka hrane za odojčad (196 $\mu\text{g/kg}$) nakon svakih 10 analiziranih uzoraka. Dobijeni rezultati pokazali su stabilnost metode, sa prosečnim rikaverijem od 97,1% i preciznošću od 2,9% RSD kroz celokupnu seriju analiza. Nije zabeleženo značajno odstupanje u retencionom vremenu ili intenzitetu signala, što je nedvosmisleno potvrdilo da je izokratsko eluiranje u trajanju od 5 minuta optimalno i dovoljno robustno za kompletnu analizu akrilamida. Na osnovu ovih rezultata, ustanovljeno je da tokom analize serije od 30 realnih uzoraka nije potrebno dodatno ispiranje ili kondicioniranje kolone, što značajno povećava efikasnost analitičkog procesa. Za dugoročno održavanje performansi sistema, nakon dnevnih operacija i serije od 60 injektovanja, kolona je ispirana 30 minuta smešom AcN/H₂O 60/40 (v/v), a zatim ponovno uravnotežena 30 minuta na početne uslove (AcN/ H₂O 90/10 v/v sa protokom od 0,3 mL/min), u skladu sa preporukama proizvođača za pripremu kolone za dalji rad i dugotrajno skladištenje (Thermo Scientific, 2014). Značajno je istaći da su svi predstavljeni rezultati u ovoj studiji dobijeni korišćenjem samo jedne HILIC kolone koja je i nakon svih sprovedenih analiza zadržala optimalne performanse, što dodatno potvrđuje robustnost razvijene metode. Ova sveobuhvatna procena robustnosti dokazuje da je optimizovana HILIC-MS/MS metoda izuzetno pouzdana i pogodna za rutinsku primenu u analizi akrilamida u različitim vrstama prehrambenih proizvoda, obezbeđujući konzistentne i pouzdane rezultate tokom dužeg vremenskog perioda.

4.2. ANALIZA REALNIH UZORAKA

4.2.1. Sadržaj akrilamida u uzorcima hleba

Analiza sadržaja akrilamida u različitim vrstama hleba dostupnih na srpskom tržištu pokazala je značajne varijacije u zavisnosti od sirovinskog sastava, prisustva semenki i tehnoloških uslova proizvodnje. Svi relevantni podaci o sadržaju akrilamida, klasifikaciji tipova hleba, metodama proizvodnje i srpskim regulatornim referentnim vrednostima prikazani su u **Tabeli P4**. Prosečan sadržaj akrilamida u svim analiziranim uzorcima hleba iznosio je 26,03 $\mu\text{g/kg}$, pri čemu je u hlebu na bazi pšenice prosečna vrednost iznosila 26,88 $\mu\text{g/kg}$, a u hlebu koji nije na bazi pšenice 23,99 $\mu\text{g/kg}$. Sadržaj akrilamida u uzorcima hleba kretao se od 2,78 $\mu\text{g/kg}$ do 95,12 $\mu\text{g/kg}$, sa statistički značajnom razlikom koja je uočena između različitih tipova hleba ($F = 3,42$, $p = 0,012$). Najviša koncentracija akrilamida 95,12 $\mu\text{g/kg}$ je pronađena u uzorku hrskavog ražanog hleba sa čija semenkama (**Slika 17**), dok su ražani hlebovi generalno pokazali najniži prosečan sadržaj akrilamida (10,69 $\mu\text{g/kg}$), uprkos tome što sadrže semenke.



Slika 17. Hromatogram akrilamida u uzorku hrskavog ražanog hleba sa čija semenkama (DR) sa najvišom detektovanom koncentracijom akrilamida (95,12 $\mu\text{g/kg}$).

Integralni pšenični hlebovi pokazali su najvišu srednju koncentraciju akrilamida ($43,15 \pm 19,69 \mu\text{g/kg}$) u poređenju sa mekim pšeničnim ($14,93 \pm 9,87 \mu\text{g/kg}$) i ražanim hlebovima ($10,69 \pm 0,52 \mu\text{g/kg}$), sa statistički značajnom razlikom ($p < 0,05$). Hrskavi hlebovi pokazali su povišene prosečne vrednosti akrilamida ($40,94 \pm 36,28 \mu\text{g/kg}$) u poređenju sa mekim pšeničnim, ražanim i višezrnim pšenično-ražanim hlebovima ($17,09 \pm 6,30 \mu\text{g/kg}$), takođe sa statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$). Uprkos kombinaciji brojnih faktora koji mogu uticati na formiranje akrilamida u hlebu, dva glavna faktora su sastav prekursora i uslovi prerade (temperatura, vreme, vlažnost). Granby i saradnici (2008) su naglasili da sadržaj asparagina, pre nego samih redukujućih šećera, igra ključnu ulogu u formiranju akrilamida u pekarskim proizvodima na bazi žitarica. Surdyk i saradnici (2004) su potvrdili da čak i umereno pečenje hleba može dovesti do merljivih nivoa akrilamida ($<100 \mu\text{g/kg}$), dok agresivnije pečenje, posebno kod hlebova napravljenih sa brašnom od krompira, može generisati mnogo više koncentracije (do $600 \mu\text{g/kg}$) zbog prirodno višeg sadržaja asparagina. U kontekstu ovih nalaza, značajno više koncentracije akrilamida uočene u integralnim pšeničnim hlebovima, u poređenju sa mekim pšeničnim i ražanim hlebovima, mogu se pripisati različitoj zastupljenosti asparagina, glavnog prekursora akrilamida u proizvodima od žitarica. Utvrđeno je da slobodni asparagin u pšenici iznosi 55,5, 1,48 i 0,17 g/kg u frakciji klice, mekinja i brašna, respektivno (Gündüz i Cengiz, 2015). Ovo objašnjava zašto integralni proizvodi koji sadrže sve delove zrna pokazuju povišene nivoe akrilamida u poređenju sa onima napravljenim od rafinisanog brašna, gde su ovi spoljni slojevi zrna uklonjeni (meki pšenični hleb). Različita distribucija vode tokom pečenja takođe doprinosi povećanom formiranju akrilamida u integralnim pšeničnim hlebovima (Mollakhalili-Meybodi i sar. 2021). Značajno povišen sadržaj akrilamida uočen u hrskavim hlebovima (dvopek), u poređenju sa mekim pšeničnim, ražanim i mešanim pšenično-ražanim, posledica je dužeg vremena pečenja i nižih nivoa vlage, faktora za koje je poznato da favorizuju Majlardovu reakciju (Gündüz i Cengiz, 2015; Lemos i sar. 2023). Prisustvo semenki identifikovano je takođe kao značajan faktor koji utiče na formiranje akrilamida. Uzorci hleba sa semenkama ($n = 15$) imali su značajno više koncentracije akrilamida ($36,70 \pm 26,33 \mu\text{g/kg}$) u poređenju sa uzorcima bez semenki ($n = 19$) ($17,60 \pm 8,05 \mu\text{g/kg}$), što je potvrđeno nezavisnim t-testom ($t = 2,71, p = 0,015$). Ova korelacija bila je posebno izražena u integralnim tipovima hleba, gde su analizirani uzorci sa semenkama pokazali približno 2,5 puta više nivoe akrilamida u poređenju sa njihovim analogima bez semenki. Uticaj semenki u hlebu na formiranje akrilamida može se povezati sa njihovim visokim sadržajem lipida, koji služe kao prekursori za proces lipid-oksidacije koji doprinosi formiranju akrilamida tokom pečenja (Galluzzo i sar. 2021; Hidalgo i sar. 2010; Hölzle i sar. 2025). Dalja analiza je sprovedena kako bi se procenilo da li način proizvodnje (industrijska naspram polu-industrijske) ima statistički značajan uticaj na sadržaj akrilamida. Rezultati su pokazali da razlika između srednjih vrednosti nivoa akrilamida industrijskih hlebova ($24,61 \mu\text{g/kg}$) i polu-industrijskih hlebova ($28,06 \mu\text{g/kg}$) nije bila statistički značajna ($t = -0,51, p = 0,61$). Iako je primećena nešto viša srednja vrednost u polu-industrijskim hlebovima, ovaj trend nije podržan statističkim dokazima. Većina analiziranih uzoraka (91%) bila je usklađena sa propisanim nivoima referentnih vrednosti akrilamida u Republici Srbiji („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024), što ukazuje na generalno efikasno upravljanje akrilamidom u srpskoj industriji hleba. Prekoračenja su se pojavila u tri integralna hleba koja sadrže semenke, sugerišući da prisustvo semenki u hlebu može predstavljati značajan faktor rizika koji zahteva ciljano praćenje i optimizaciju procesa, sa naglaskom na sadržaj semenki.

4.2.2. Sadržaj akrilamida u kori i sredini hleba

Kvantifikovan je i sadržaj akrilamida u specifičnim delovima hleba, konkretno u kori i sredini. Kao što je prikazano u **Tabeli P5**, koncentracije akrilamida bile su konzistentno više u kori nego u sredini kod svih varijeteta hleba, sa statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$), osim kod uzorka kukuruzno-pirinčanog hleba sa semenkama (KP-S).

Najizraženija razlika primećena je kod integralnog hleba sa semenkama (I-S-1), gde su nivoi akrilamida u kori (K-I-S-1) i sredini (SR-I-S-1) bili 79,18 µg/kg i 22,01 µg/kg, respektivno, sa visoko statistički značajnom razlikom ($p = 0,005$). Slična tendencija uočena je i kod drugog uzorka integralnog hleba sa semenkama I-S-2, gde je kora (K-I-S-2) sadržala 51,96 µg/kg akrilamida naspram 4,58 µg/kg u sredini (SR-I-S-2), što predstavlja statistički značajnu razliku ($p = 0,001$). Pšenični meki hleb (MH) pokazao je izraženu distribuciju akrilamida, sa koncentracijom od 8,43 µg/kg u kori (K-MH) dok je sadržaj akrilamida u sredini (SR-MH) bio ispod limita detekcije. Još izraženija razlika uočena je kod mekog hleba sa semenkama (MH-S), gde je kora (K-MH-S) sadržala 54,54 µg/kg akrilamida, dok u sredini (SR-MH-S) nije detektovan akrilamid. Među mešanim hlebovima, pšenično-ražani hlebovi pokazali su značajne varijacije. Uzorak PR-1 imao je koncentraciju akrilamida od 26,75 µg/kg u kori (K-PR-1) naspram 3,51 µg/kg u sredini (SR-PR-1) sa statistički značajnom razlikom ($p = 0,010$). Uzorak PR-2 pokazao je sličan trend sa 43,49 µg/kg u kori (K-PR-2) i 11,46 µg/kg u sredini (SR-PR-2), mada razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,060$). Pšenično-ražani hlebovi sa semenkama pokazali su još izraženije razlike. Uzorak PR-S-1 imao je najizraženiju razliku sa 62,83 µg/kg akrilamida u kori (K-PR-S-1) naspram samo 5,24 µg/kg u sredini (SR-PR-S-1), sa statistički značajnom razlikom ($p = 0,010$). Uzorak PR-S-2 takođe je pokazao značajnu razliku ($p = 0,010$) između kore (K-PR-S-2; 14,55 µg/kg) i sredine (SR-PR-S-2; 2,89 µg/kg). Kukuruzno-pirinčani hleb (KP) pokazao je umerenu razliku sa 19,17 µg/kg u kori (K-KP) i 10,52 µg/kg u sredini (SR-KP), što je statistički značajno ($p = 0,003$). Međutim, kukuruzno-pirinčani hleb sa semenkama (KP-S) bio je jedini uzorak koja nije pokazala statistički značajnu razliku ($p = 0,300$) između kore (K-KP-S; 12,47 µg/kg) i sredine (SR-KP-S; 13,04 µg/kg). Ražani integralni hleb sa semenkama (IR-S) pokazao je statistički značajnu razliku ($p = 0,030$) između kore (K-IR-S; 23,09 µg/kg) i sredine (SR-IR-S; 8,92 µg/kg). Povišene koncentracije akrilamida u kori u odnosu na sredinu hleba mogu se pripisati uslovima tokom pečenja. Kora je izložena višim temperaturama (često preko 200 °C) i nižoj aktivnosti vode, što predstavlja kritične faktore u formiranju akrilamida putem Majlardove reakcije (Liu *i sar.* 2018). Nasuprot tome, sredina hleba ostaje na značajno nižim temperaturama (ispod 100 °C) i zadržava viši sadržaj vlage, što smanjuje formiranje akrilamida (Forstova *i sar.* 2014). Kao rezultat, kora akumulira mnogo više nivoa akrilamida u poređenju sa sredinom. Surdyk i saradnici (2004) su prijavili da je preko 99% akrilamida u hlebu lokalizovano u kori, i da uklanjanje potamnele površine tamno pečenog hleba može značajno smanjiti unošenje akrilamida tokom konzumiranja. U ovom kontekstu, visoke koncentracije akrilamida u kori mekog hleba sa semenkama (K-MH-S; 54,54 µg/kg), integralnih hlebova sa semenkama (79,18 µg/kg i 51,96 µg/kg), kao i pšenično-ražanog hleba sa semenkama (K-PR-S-1; 62,83 µg/kg) su u skladu sa pomenutim literaturnim podacima. Prisustvo semenki na površini kore u analiziranim uzorcima dodatno doprinosi formiranju akrilamida, s obzirom da su semenke bogate lipidima koji su prekursori za nastajanje procesa lipid-oksidacije, što predstavlja jedan od puteva formiranja akrilamida u uslovima visoke temperature (Galluzzo *i sar.* 2021; Hidalgo *i sar.* 2010). Ovo objašnjava zašto uzorci sa semenkama (MH-S, I-S-1, I-S-2, PR-S-1, PR-S-2) generalno pokazuju više koncentracije akrilamida u kori u poređenju sa uzorcima bez semenki. Jedini izuzetak predstavlja kukuruzno-pirinčani hleb sa semenkama (KP-S), gde nije primećena značajna razlika u nivoima akrilamida između kore i sredine. Ovo se verovatno može objasniti unutrašnjom distribucijom semenki u sredini umesto na površini kore. Budući da semenke inkorporirane u sredinu hleba nisu bile direktno izložene visokim temperaturama tokom pečenja, njihov doprinos formiranju akrilamida mogao je biti minimalan. Ovaj uzorak hleba je sadržao nešto više nivoa akrilamida u sredini (SR-KP-S; 13,04 µg/kg) u odnosu na koru (K-KP-S; 12,47 µg/kg), dodatno potvrđujući važnost kako direktne izloženosti toploti tako i pozicioniranja semenki na površini u formiranju akrilamida. Analiza udela kore i sredine u ukupnoj masi hleba pokazala je da kora čini 30-50% ukupne mase uzorka, dok sredina čini 50-70%. Ovi podaci su bili važni za procenu ukupnog unosa akrilamida prilikom konzumiranja hleba, jer su omogućili kalkulaciju prosečne izloženosti na osnovu uobičajenih načina konzumiranja.

4.2.3. Uticaj vremena tostiranja na formiranje akrilamida u hlebu

Ovaj eksperiment (opisan u odeljku 3.2.4.) je sproveden tako da simulira tipičnu potrošačku praksu i proceni implikacije tostiranja na formiranje akrilamida u hlebu. Dobijeni rezultati pokazuju da sa povećanim vremenom tostiranja od 1 do 15 minuta, koncentracija akrilamida raste, krećući se od 21,66 µg/kg (netostirani) do 244,24 µg/kg (15-minuta tostiran) kao što je prikazano u **Tabeli P6**. Step en tamnjenja na površini hleba kretao se od minimalne promene boje do tamno braon sa po crnelim područjima, što je ukazivalo na intenziviranje Majlardove reakcije tokom vremena (**Tabela P6**). Kako tostiranje napreduje pod uslovima visoke temperature i niske vlažnosti, ova reakcija napreduje kroz višestruke puteve, od kojih je jedan odgovoran za formiranje braon pigmenata (melanoidina), a drugi za nastajanje akrilamida. Istovremeni porast površinskog tamnjenja i nivoa akrilamida naglašava važnost kontrolisanog tostiranja u cilju smanjenja potencijalnih zdravstvenih rizika. Ova zapažanja su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja prijavljuju direktnu korelaciju između intenziteta tostiranja i akumulacije akrilamida (Granby *i sar.* 2008; Mencin *i sar.* 2020; Sáez-Hernández *i sar.* 2022).

4.2.4. Sadržaj akrilamida u finim pekarskim proizvodima, čipsu i dečijoj hrani

Pored uzoraka hleba, na sadržaj akrilamida analizirane su i druge namirnice široke potrošnje poput finih pekarskih proizvoda (keks, grisine), čipsevi na bazi krompira, dečija hrana na bazi cerealija. Ove namirnice predstavljaju značajan deo svakodnevne ishrane stanovništva i mogu biti važan izvor izloženosti akrilamidu, posebno kod dece koja često konzumiraju fine pekarske proizvode i čips. Dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 14**. Koncentracije akrilamida u uzorcima keksa bile su u opsegu od 26,19 do 222,20 µg/kg, sa srednjom vrednošću od 115,67±92,71 µg/kg. Širok opseg koncentracija ukazuje na značajnu varijabilnost u sadržaju akrilamida među različitim proizvodima, što može biti posledica različitih tehnoloških procesa proizvodnje, sastava sirovine, temperature pečenja i vremena izloženosti visokim temperaturama tokom procesa proizvodnje. Uzorci grisina pokazali su koncentracije između 61,09 i 271,80 µg/kg, sa srednjom vrednošću od 131,43±121,57 µg/kg. Maksimalna koncentracija od 271,80 µg/kg zabeležena u uzorku grisina 2 ukazuje na to da pojedini proizvodi mogu imati relativno visok sadržaj akrilamida, što je verovatno povezano sa intenzivnijim procesom pečenja potrebnim za postizanje karakteristične hrskave teksture. Za čips na bazi krompira, koncentracije akrilamida bile su u opsegu od 294,62 do 670,43 µg/kg, sa srednjom vrednošću od 543,68±215,71 µg/kg. Ovi rezultati su u skladu sa očekivanjima, s obzirom na to da su proizvodi na bazi krompira poznati kao namirnice sa visokim sadržajem akrilamida zbog visokog sadržaja redukujućih šećera i asparagina u krompiru, kao i visokih temperatura tokom procesa prženja. Posebno ohrabrujući rezultati dobijeni su za dečiju hranu na bazi cerealija, gde su svi analizirani uzorci pokazali koncentracije akrilamida ispod limita kvantifikacije (<10 µg/kg). Ovakvi rezultati ukazuju na efikasnu primenu mera kontrole kvaliteta i tehnoloških postupaka koji minimizuju formiranje akrilamida tokom proizvodnje dečije hrane, što je od kritičnog značaja s obzirom na povećanu osetljivost dece na potencijalno štetne supstance. Sadržaj akrilamida u svim analiziranim uzorcima bio je ispod referentnih nivoa utvrđenih aktuelnim pravilnikom Republike Srbije („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024), što ukazuje da analizirani proizvodi odgovaraju standardima zdravstvene bezbednosti i da su u skladu sa regulatornim zahtevima.

Tabela 14. Sadržaj akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) u različitim tipovima namirnica na tržištu Republike Srbije sa propisanim nivoima referentnih vrednosti akrilamida u Republici Srbiji.

Oznaka uzorka		Akrilamid ($\mu\text{g/kg}$)	Srednja vrednost $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Min. ($\mu\text{g/kg}$)	Max. ($\mu\text{g/kg}$)	Referentna koncentracija ($\mu\text{g/kg}$)*
Keks	uzorak 1	32,44	115,67 $\pm$ 92,71	26,19	222,20	350
Keks	uzorak 2	26,19				
Keks	uzorak 3	94,40				
Keks	uzorak 4	222,00				
Keks	uzorak 5	203,00				
Grisine	uzorak 1	61,40	131,43 $\pm$ 121,57	61,09	271,80	300
Grisine	uzorak 2	271,80				
Grisine	uzorak 3	61,09				
Čips	uzorak 1	670,43	543,68 $\pm$ 215,71	294,62	670,43	750
Čips	uzorak 2	294,62				
Čips	uzorak 3	666,00				
Dečija hrana	uzorak 1	<10 (LOQ)	-	-	-	40
Dečija hrana	uzorak 2	<10 (LOQ)				
Dečija hrana	uzorak 3	<10 (LOQ)				
Dečija hrana	uzorak 4	<10 (LOQ)				
Dečija hrana	uzorak 5	<10 (LOQ)				

SD-standardna devijacija; Min, Maks-minimalna i maksimalna koncentracija; LOQ-limit kvantifikacije; *, „Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024.

Dobijeni rezultati u ovoj studiji mogu se uporediti sa rezultatima sličnih istraživanja sprovedenih u različitim zemljama (**Tabela 15**). Rezultati ove studije se generalno uklapaju u opseg vrednosti prijavljenih u literaturi. Dobijene koncentracije za akrilamid u keksu i čipsu su najusklađenije sa istraživanjem Tölgyesi and Sharma (2020) sprovedenim u Mađarskoj, dok su za slane grickalice najbliži rezultatima istraživanja takođe sprovedenog u Republici Srbiji (Žilić *i sar.* 2024).

Tabela 15. Pregled sadržaja akrilamida u finim pekarskim proizvodima i čipsu-poređenje sa literaturnim podacima.

Poreklo	Analitička metoda	Opseg ($\mu\text{g/kg}$)	Srednja vrednost ($\mu\text{g/kg}$)	Referenca
Keks i vafli				
EU			201	EFSA CONTAM Panel, 2015
Srbija	LC-MS/MS	26,19-222,20	115,67	Ova studija
Mađarska	LC-MS/MS	20-342	/	Tölgyesi and Sharma, 2020
Rumunija	GC-MS/MS	8,55-548,80	/	Mihai <i>i sar.</i> 2020
Slovenija	GC-MS	312,2-468,2	384,5	Mencin <i>i sar.</i> 2020
Slane grickalice				
EU			231	EFSA CONTAM Panel, 2015
Srbija	LC-MS/MS	61,09-271,80	131,43	Ova studija
Srbija	LC-MS/MS	129-486	/	Žilić <i>i sar.</i> 2024
Mađarska	LC-MS/MS	20-216	/	Tölgyesi and Sharma, 2020
Slovenija	GC-MS	20,5-3439,4	858,6	Mencin <i>i sar.</i> 2020
Čips na bazi krompira				
EU			389	EFSA CONTAM Panel, 2015
Srbija	LC-MS/MS	294,62-670,43	543,68	Ova studija
Mađarska	LC-MS/MS	520-590	/	Tölgyesi and Sharma, 2020
Turska	LC-MS/MS	256-7423	3578	Basaran and Sadighara, 2024
Rumunija	LC-MS/MS	82-266	133	Pogurschi <i>i sar.</i> 2021
Slovenija	GC-MS		858,6	Mencin <i>i sar.</i> 2020

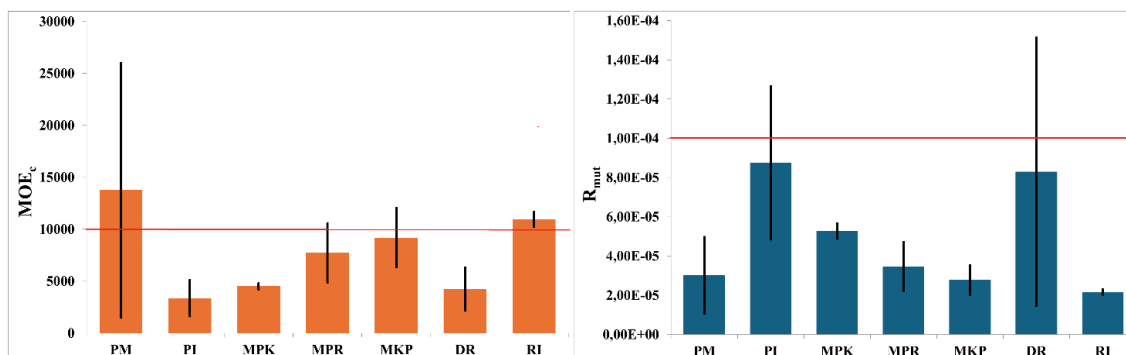
Varijabilnost rezultata između različitih studija može se objasniti razlikama u tehnološkim procesima proizvodnje, kvalitetu i poreklu sirovina, analitičkim metodama korišćenim za određivanje akrilamida, vrsti i broju analiziranih uzoraka, kao i geografskim i klimatskim faktorima koji utiču na sastav sirovina.

4.3. PROCENA RIZIKA PO ZDRAVLJE STANOVNIŠTVA SRBIJE USLED IZLOŽENOSTI AKRILAMIDU U HRANI

Procena rizika po zdravlje stanovništva Srbije usled izloženosti akrilamidu kroz konzumiranje hleba i odabranih prehrambenih proizvoda sprovedena je primenom metodologija opisanih u odeljku 3.6. Analiza je obuhvatila procenu nekarcinogenih, karcinogenih i mutagenih rizika, uzimajući u obzir specifične navike ishrane srpske populacije i različite starosne grupe.

4.3.1. Procena rizika za uzorke hleba

Rezultati dobijeni analizom uzoraka hleba sa tržišta Srbije ukazuju na to da je margina izloženosti akrilamidu kod svih uzoraka značajno veća od 100, dok su vrednosti koeficijenta opasnosti (HQ) ispod 0,1, pri čemu je najveća prosečna vrednost zabeležena za uzorak Dvopek-Raž (DR) sa $HQ = 0,096$. Ovi rezultati jasno ukazuju na to da ne postoji nekarcinogeni rizik za ljudsku populaciju u Srbiji usled izloženosti akrilamidu kroz konzumaciju hleba (**Tabela 16**). Međutim, procene karcinogenog i mutagenog rizika po zdravlje ukazuju na potencijalne probleme. Vrednosti mutagenog rizika (R_m) su kod svih analiziranih uzoraka premašile graničnu vrednost od $1E-6$. Posebno su visoke vrednosti zabeležene kod uzoraka integralnog pšeničnog hleba PI-3 ($R_m=1,46E-04$), PI-5 ($R_m=1,45E-04$) i PI-9 ($R_m=1,05E-04$), kao i hrskavog ražanog hleba (sa oznakom DR, $R_m=1,93E-04$), što ukazuje na značajan zdravstveni rizik po kriterijumima US EPA (Basaran and Sadighara, 2024; Nur Hidayah *i sar.* 2024). Iako je 91% ispitanih uzoraka hleba imalo nivoa akrilamida ispod zakonski dozvoljene granice važećim srpskim propisima („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024), samo nekoliko uzoraka pokazalo je karcinogene margine izloženosti (MOE_c) iznad 10.000, što ih svrstava u kategoriju bezbednih za konzumiranje: Pšenični-Meki-1 (PM-1, $MOE_c=16.977$), Pšenični-Meki-2 (PM-2, $MOE_c=15.651$), Pšenični-Meki-3 (PM-3, $MOE_c=15.219$), Pšenični-Meki-6 (PM-6, $MOE_c=42.015$), Mešani Pšenica-Raž-3 (MPR-3, $MOE_c=11.708$), Mešani Kukuruz-Pirinač-3 (MKP-3, $MOE_c=13.538$), Ražani-integralni-1 (RI-1, $MOE_c=10.572$) i Ražani-integralni-2 (RI-2, $MOE_c=11.358$). Preostali uzorci predstavljaju zdravstvena pitanja koja zahtevaju dodatnu pažnju i eventualne korektivne mere, s obzirom na niže vrednosti MOE_c i povišene vrednosti R_m (**Slika 18**).



Slika 18. Karcinogena margina izloženosti (MOE_c) i mutageni rizik (R_m) na osnovu sadržaja akrilamida u uzorcima hleba sa srpskog tržišta (PM – Pšenični-Meki; PI – Pšenični-Integralni; MPK – Mešani Pšenica-Kukuruz; MPR – Mešani Pšenica-Raž; MKP – Mešani Kukuruz-Pirinač; DR – Dvopek-Raž; RI – Ražani-integralni).

Tabela 16. Nekarcinogena i karcinogena margina izloženosti (MOE_{nc} i MOE_c) sa koeficijentom opasnosti (HQ) i mutagenim rizikom (R_m) analiziranih uzoraka hleba.

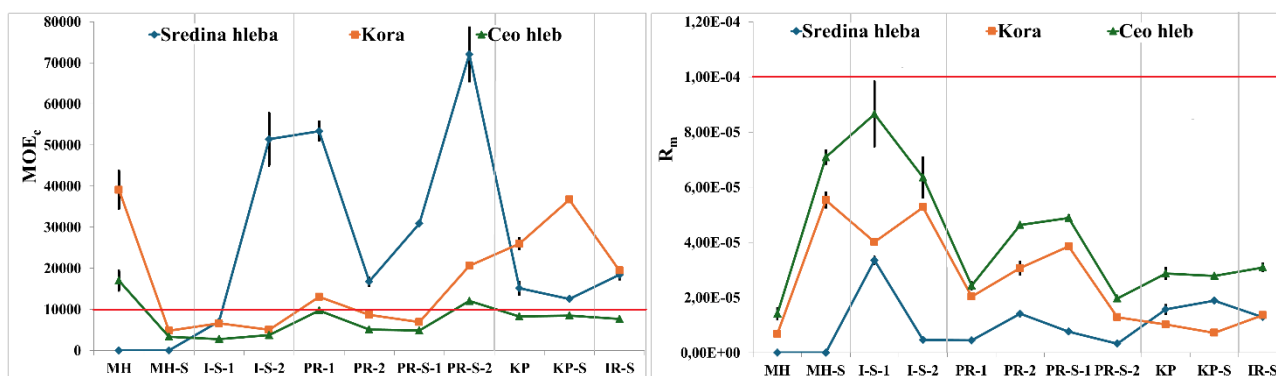
Uzorak	MOE_{nc}		HQ		MOE_c		R_m	
	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD
Pšenični-Meki hleb								
PM-1	24539	3478	0,009	0,001	16977	2406	1,41E-05	2,00E-06
PM-2	31006	11490	0,007	0,003	15651	255	1,51E-05	2,47E-07
PM-3	30415	12546	0,008	0,003	15219	443	1,56E-05	4,53E-07
PM-4	11258	3512	0,020	0,006	5752	451	4,13E-05	3,24E-06
PM-5	9722	3269	0,023	0,008	4942	261	4,80E-05	2,54E-06
PM-6	84253	36109	0,003	0,001	42015	1964	5,64E-06	2,64E-07
PM-7	11388	5082	0,021	0,009	5658	375	4,20E-05	2,78E-06
PM-8	7835	3278	0,030	0,013	3915	139	6,05E-05	2,15E-06
Pšenični-Integralni hleb								
PI-1	6745	3027	0,035	0,016	3349	231	7,09E-05	4,89E-06
PI-2	7570	3554	0,032	0,015	3743	345	6,36E-05	5,85E-06
PI-3	3237	1349	0,073	0,030	1618	55	1,46E-04	4,95E-06
PI-4	5576	2665	0,044	0,021	2752	280	8,65E-05	8,79E-06
PI-5	3276	1348	0,072	0,030	1640	46	1,45E-04	4,06E-06
PI-6	4951	1703	0,046	0,016	2513	112	9,44E-05	4,22E-06
PI-7	11681	4339	0,020	0,007	5895	90	4,02E-05	6,17E-07
PI-8	12713	3580	0,018	0,005	6536	720	3,65E-05	4,02E-06
PI-9	4453	1410	0,051	0,016	2273	167	1,05E-04	7,67E-06
Mešani hleb								
MPK-1	5836	1552	0,024	0,009	4768	41	4,97E-05	4,3E-07
MPK-2	5239	1603	0,027	0,009	4257	215	5,57E-05	2,81E-06
MPR-1	6197	647	0,024	0,012	5172	803	4,64E-05	7,2E-06
MPR-2	12108	4269	0,012	0,003	9778	973	2,43E-05	2,42E-06
MPR-3	14466	4860	0,010	0,003	11708	959	2,03E-05	1,66E-06
MPR-4	5998	1975	0,024	0,007	4859	363	4,89E-05	3,66E-06
MPR-5	8751	2659	0,016	0,006	7113	343	3,33E-05	1,61E-06
MKP-1	10197	3611	0,014	0,004	8233	833	2,89E-05	2,93E-06
MKP-2	10365	3066	0,014	0,005	8434	336	2,81E-05	1,12E-06
MKP-3	16579	4467	0,009	0,003	13538	166	1,75E-05	2,15E-07
MKP-4	8049	2694	0,018	0,005	6515	525	3,65E-05	2,94E-06
Dvopek								
DR	1497	353	0,096	0,039	1228	28	1,93E-04	4,33E-06
DP	5763	1109	0,025	0,011	4754	317	4,99E-05	3,33E-06
DKP-1	8015	2767	0,018	0,005	6479	595	3,67E-05	3,37E-06
DKP-2	5569	1767	0,026	0,008	4518	281	5,25E-05	3,27E-06
Ražani hleb								
RI-1	12961	3594	0,011	0,004	10572	216	2,24E-05	4,59E-07
RI-2	14036	4738	0,010	0,003	11358	949	2,09E-05	1,75E-06

SD-standardna devijacija dva određivanja

4.3.2. Procena rizika za koru i sredinu hleba

Za detaljniju procenu rizika po zdravlje, analizirani su različiti delovi hleba (kora i sredina), s obzirom na činjenicu da i odrasli i deca često konzumiraju samo jedan deo hleba nego celu krišku. Da bi se preciznije odredile stope unosa ovih delova hleba, korišćeni su maseni odnosi kore i sredine iz uzoraka u odnosu na masu celog hleba. Ovi odnosi su se kretali od 0,30 do 0,50 za koru i od 0,70 do 0,50 za sredinu (**Tabela P5**). Primenom korigovanih stopa unosa (51-85 g/dan za koru, odnosno 119-85 g/dan za sredinu kod odraslih), izračunati su EDI_m , EDI_c i EDI_{nc} za različite delove hleba, dok su stope unosa za decu bile polovina navedenih vrednosti, u skladu sa međunarodnim smernicama (U.S. Department of Energy, 2024).

U pogledu nekarcinogenog rizika, sve vrednosti HQ bile su ispod 0,1, dok su vrednosti MOE_{nc} značajno više od 100, što ukazuje da konzumiranje analiziranih delova hleba ne predstavlja značajan zdravstveni rizik za odrasle i decu (**Tabela P7**). Vezano za uzorke pšeničnog hleba, meki hleb (MH) sadrži nivoe akrilamida i u kori (K-MH) i u celom uzorku hleba koji rezultiraju vrednostima MOE_c većim od 10.000 (39.070 ± 4.617 za koru i 16.977 ± 2.406 za celi hleb) (**Slika 19**). Sadržaj akrilamida u sredini (SR-MH) bio je ispod LOD za ovaj uzorak. Međutim, vrednosti MOE_c za koru (K-MH-S) i celi uzorak mekog hleba sa semenkama (MH-S) su manje od 10.000 (4.800 za koru i 3.343 za ceo hleb), što ukazuje na povišen karcinogeni rizik. Što se tiče integralnih hlebova sa semenkama, sredina integralnog hleba sa semenkama-2 (SR-I-S-2) smatra se bezbednom za konzumiranje sa MOE_c od 51.409. Nasuprot tome, ceo uzorak hleba, uključujući i sredinu i koru, integralnog hleba sa semenkama-1 (I-S-1) smatra se neprikladnim za konzumiranje zbog nivoa akrilamida koji rezultira vrednostima $MOE_c < 10.000$ (2.763 za ceo hleb).



Slika 19. Karcinogena margina izloženosti (MOE_c) i mutageni rizik (R_m) na osnovu sadržaja akrilamida u sredini, kori i celom hlebu sa srpskog tržišta (MH – Meki hleb; MH-S – Meki hleb sa semenkama; I-S-1 – Integralni sa semenkama-1; I-S-2 – Integralni sa semenkama-2; PR-1 – Pšenično-ražani-1; PR-2 – Pšenično-ražani-2; PR-S-1 – Pšenično-ražani sa semenkama-1; PR-S-2 – Pšenično-ražani sa semenkama-2; KP – Kukuruzno-pirinčani; KP-S – Kukuruzno-pirinčani sa semenkama; IR-S – Integralni-ražani sa semenkama).

Među uzorcima mešanih hlebova, samo pšenično-ražani hleb sa semenkama-2 (PR-S-2) pokazuje vrednosti MOE_c veće od 10.000 za sva tri segmenta hleba: sredinu (SR-PR-S-2; 72.066), koru (K-PR-S-2; 20.626) i celi uzorak hleba (12.059). Za preostale uzorke u grupi pšenično-ražanih hlebova, samo je sredina bezbedna za konzumiranje, kao i kora pšenično-ražanog hleba-1 (K-PR-1). U slučaju kukuruzno-pirinčanog hleba (KP) i kukuruzno-pirinčanog hleba sa semenkama (KP-S), kao i integralnog ražanog hleba sa semenkama (IR-S), kora ima više vrednosti MOE_c u odnosu na sredinu. Međutim, konzumiranje celih kriški ovih hlebova se ne smatra bezbednim jer su vrednosti MOE_c za cele hlebove < 10.000 .

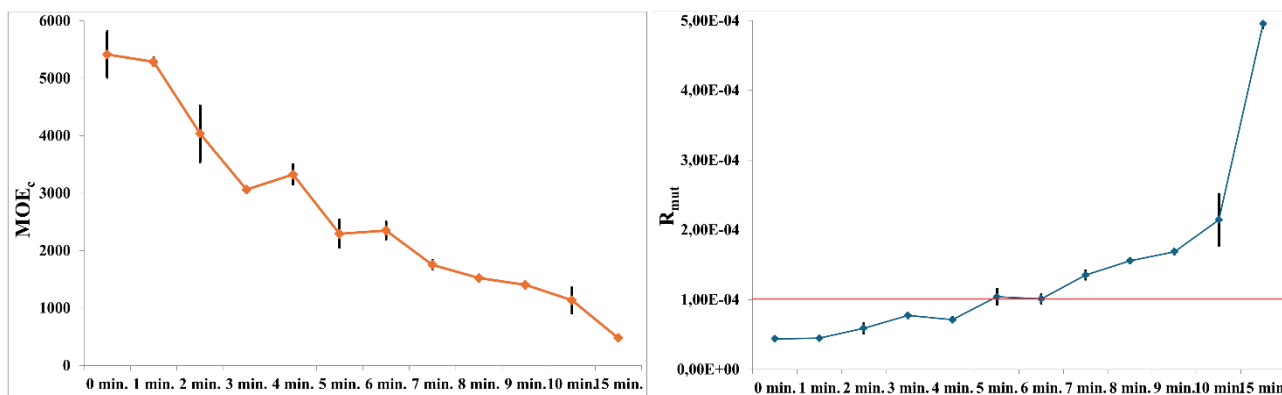
Što se tiče mutagenog rizika, za sve delove uzoraka hleba vrednosti R_m su iznad $1,00E-6$, pri čemu uzorak integralnog hleba sa semenkama-1 (I-S-1) pokazuje najviše vrednosti R_m ($8,65E-05$ za ceo hleb). Najniže vrednosti R_m primećene su u sredini analiziranih uzoraka hleba, osim za kukuruzno-pirinčane hlebove (KP i KP-S) i integralni ražani hleb sa semenkama (IR-S), gde je kora bezbednija za konzumiranje. Za pšenične hlebove (MH, MH-S, I-S-1, I-S-2, PR-1, PR-2, PR-S-1 i PR-S-2), koncentracija akrilamida u kori i celom uzorku hleba daje relativno malu razliku u vrednosti mutagenog rizika u poređenju sa razlikom izračunatom iz sadržaja akrilamida u sredini i celom uzorku hleba. Nasuprot tome, vrednosti R_m zasnovane na koncentracijama akrilamida u sredini i celom uzorku hleba razlikuju se manje u slučaju kukuruzno-pirinčanih hlebova (KP, KP-S) i integralnog ražanog hleba sa semenkama (IR-S). Sa aspekta bezbednosnih preporuka, na osnovu rezultata procene mutagenog rizika, za pšenične hlebove se preporučuje konzumiranje sredine hleba, za kukuruzno-pirinčane hlebove bezbednije je konzumiranje kore, dok kod integralnog ražanog hleba sa semenkama ne postoji značajna razlika u bezbednosti između različitih delova hleba.

Ovi eksperimentalni rezultati pružaju vredne informacije za proizvođače hleba kako bi razmotrili i potencijalno optimizovali svoje proizvodne procese, posebno u vezi sa višim koncentracijama akrilamida primećenim u kori hleba i prisustvu semenki. Na osnovu analize sadržaja akrilamida u različitim delovima hleba i procene rizika, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Semenke na površini značajno povećavaju rizik, što zahteva pažljivu kontrolu procesa pečenja;
- Kora hleba je generalno rizičnija od sredine zbog direktne izloženosti višim temperaturama tokom pečenja;
- Integralni hlebovi sa semenkama predstavljaju najveći rizik i zahtevaju posebnu pažnju u proizvodnji;
- Pozicioniranje semenki (površina ili unutrašnjost hleba) značajno utiče na formiranje akrilamida.

4.3.3. Procena rizika za tostirani hleb

Analiza uticaja vremena tostiranja na formiranje akrilamida i povezane zdravstvene rizike pokazala je da se sa povećanjem vremena tostiranja vrednosti MOE_c smanjuju, udaljavajući se dalje od granične vrednosti od 10.000 (**Slika 20**). Iz perspektive MOE_c , beli tostirani hleb ne ispunjava standarde bezbednosti za konzumiranje, bilo netostiran ili tostiran, bez obzira na trajanje tostiranja.



Slika 20. Karcinogena margina izloženosti (MOE_c) i mutageni rizik (R_m) na osnovu sadržaja akrilamida u uzorcima tostiranog hleba u odnosu na različita vremena tostiranja.

Vrednost mutagenog rizika prelazi $1,00E-4$ nakon 5 minuta tostiranja, na osnovu nivoa akrilamida i nastavlja da raste sa dužim trajanjem tostiranja (**Slika 20**). Za do 5 minuta, vrednosti se kreću od $4,39E-5$ do $7,74E-5$, što ukazuje na verovatni i značajan zdravstveni rizik. Najniža prosečna vrednost MOE_{nc} utvrđena je u uzorcima tostiranog hleba tostiranim 15 minuta, sa vrednošću iznad 100 ($MOE_{nc}=691$). Nasuprot tome, najviša vrednost HQ dobijena je iz istih uzoraka tostiranog hleba, neznatno premašujući 0,3. Vremena tostiranja u rasponu od 8 do 15 minuta rezultiraju količinama akrilamida koje daju vrednosti HQ oko i iznad 0,1 (**Tabela 17**).

Uzimajući u obzir nekarcinogeni rizik zajedno sa vrednostima MOE_{nc} i HQ koje su dobijene, nema dokaza da konzumiranje ispitivanih delova tostiranog hleba predstavlja značajan negativan efekat na zdravlje odraslih ili dece. Sve vrednosti HQ su ispod 0,1, dok su vrednosti MOE_{nc} značajno više od 100 (**Tabela 17**).

Tabela 17. Nekarcinogena i karcinogena izloženost (MOE_{nc} i MOE_c) sa koeficijentom opasnosti (HQ) i mutagenim rizikom (R_m) u netostiranim i tostiranim uzorcima hleba.

Vreme tostiranja	MOE_{nc}		HQ		MOE_c		R_m	
	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD
0 min	7825	577	0,028	0,002	5414	399	$4,39E-05$	$3,23E-06$
1 min	7639	99	0,028	0,000	5285	68	$4,48E-05$	$5,81E-07$
2 min	5832	707	0,037	0,004	4035	489	$5,91E-05$	$7,17E-06$
3 min	4423	23	0,049	0,000	3060	16	$7,74E-05$	$4,02E-07$
4 min	4807	246	0,045	0,002	3326	170	$7,13E-05$	$3,66E-06$
5 min	2664	764	0,046	0,011	2292	237	$1,04E-04$	$1,09E-05$
6 min	2692	506	0,046	0,015	2352	158	$1,01E-04$	$6,73E-06$
7 min	2533	115	0,085	0,004	1752	79	$1,35E-04$	$6,12E-06$
8 min	2199	47	0,098	0,002	1522	33	$1,56E-04$	$3,35E-06$
9 min	2027	19	0,106	0,001	1403	13	$1,69E-04$	$1,58E-06$
10 min	1285	238	0,098	0,040	1135	216	$2,14E-04$	$3,66E-05$
15 min	691	8	0,311	0,004	478	6	$4,95E-04$	$5,78E-06$

4.3.4. Procena rizika za fine pekarske proizvode, čips i dečiju hranu

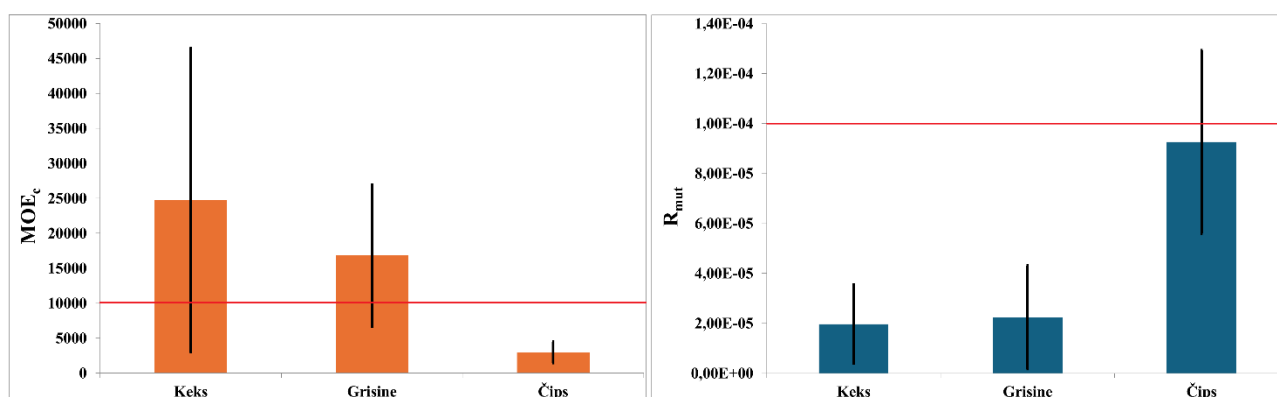
Analiza finih pekarskih proizvoda, čipseva i dečije hrane pokazala je drugačiju sliku rizika u odnosu na hleb. Uzimajući u obzir MOE za nekarcinogeni efekat (MOE_{nc}) akrilamida, sve vrednosti su iznad 100, a vrednosti HQ ispod 0,1 (**Tabela 18**), što ukazuje da je konzumacija ovih proizvoda bezbedna sa aspekta nekarcinogenih efekata.

Za karcinogene efekte, MOE_c za neke uzorke koji nisu hleb su ispod 10.000. Konkretno, šest od jedanaest analiziranih uzoraka (55%) pokazuje vrednosti ispod kritične granice, što ukazuje da izloženost akrilamidu kroz ove prehrambene uzorke može predstavljati rizik za javno zdravlje, kako za mlađu tako i za odraslu populaciju u Srbiji, na osnovu prilagođenog scenarija izloženosti. Ovaj trend je u skladu sa nekim objavljenim studijama (Fan *i sar.* 2023; Nur Hidayah *i sar.* 2024).

Tabela 18. Nekarcinogena (MOE_{nc} i HQ), karcinogena i mutageni (MOE_c i R_m) procena sadržaja akrilamida u uzorcima koji nisu hleb (keks, grisine i čips od krompira).

Oznaka uzorka	HQ	MOE_{nc}	R_m	MOE_c
Keks uzorak 1	0,003±0,000	61938±475	5,53E-06±4,24E-8	42852±329
Keks uzorak 2	0,003±0,000	76725±1338	4,46E-06±7,78E-8	53083±926
Keks uzorak 3	0,010±0,000	21290±606	1,61E-05±4,58E-7	14730±419
Keks uzorak 4	0,024±0,000	9042±78	3,79E-05±3,25E-7	6255±54
Keks uzorak 5	0,022±0,000	9901±435	3,46E-05±1,52E-6	6850±301
Grisine uzorak 1	0,007±0,000	32732±816	1,05E-05±2,61E-7	22646±564
Grisine uzorak 2	0,029±0,001	7399±339	4,63E-05±2,12E-6	5119±235
Grisine uzorak 3	0,007±0,000	32893±762	1,04E-05±2,41E-7	22758±527
Čips uzorak 1	0,072±0,001	2997±46	1,14E-04±1,77E-6	2073±32
Čips uzorak 2	0,032±0,000	6819±20	5,02E-05±1,47E-7	4718±14
Čips uzorak 3	0,071±0,002	3018±88	1,13E-04±3,30E-6	2088±61

Uzimajući u obzir EFSA marginu izloženosti, tri uzorka keksa i dva uzorka grisina imaju vrednost MOE_c iznad 10.000 (**Tabela 18**), što ih čini bezbednim za konzumiranje sa aspekta karcinogenog rizika. Međutim, najrizičniji su čipsevi sa MOE_c vrednostima od 2.073 ± 32 do 4.718 ± 14 , što je 2-5 puta niže od preporučenog nivoa bezbednosti (**Slika 21**). Kada se analizira mutageni rizik (R_m), svi uzorci su imali vrednosti iznad $1,00E-6$, što ukazuje na mogući i značajan rizik, dok su dva uzorka čipsa pokazala mutageni rizik iznad $1,00E-4$ (**Tabela 18**, **Slika 21**), što predstavlja značajnu pretnju javnom zdravlju u Srbiji prema US EPA klasifikaciji. Najniži mutageni rizik pokazao je uzorak keksa 2 sa vrednošću od $4,46E-06\pm7,78E-8$.



Slika 21. Karcinogena margina izloženosti (MOE_c) i mutageni rizik (R_m) na osnovu sadržaja akrilamida u uzorcima keksa, grisina i čipsa sa srpskog tržišta.

Poređenjem MOE_c i R_m vrednosti, u pet uzoraka MOE_c je iznad 10.000, dok se može videti da svi uzorci koji nisu hleb pokazuju određeni mutageni potencijal ($R_m > 1,00E-6$). Ovakvi rezultati imaju nekoliko važnih implikacija za javno zdravlje u Srbiji. Visok procenat uzoraka sa neprihvatljivim karcinogenim rizikom (55%) ukazuje na potrebu za pojačanim regulatornim nadzorom i mogućim ograničenjima konzumacije određenih proizvoda. Jasno rangiranje proizvoda prema riziku može pomoći potrošačima u donošenju informisanih izbora, sa preporukom ograničavanja konzumacije čipseva. Značajne varijacije unutar kategorija proizvoda ukazuju na potrebu za kontinuiranim praćenjem i identifikovanjem proizvođača sa boljim proizvodnim praksama.

4.3.5. Sveukupna procena rizika i implikacije za javno zdravlje

Rezultati procene rizika po zdravlje stanovništva Srbije usled izloženosti akrilamidu kroz hranu pokazuju složenu sliku koja zahteva diferencirani pristup različitim kategorijama prehrambenih proizvoda. Dok nekarcinogeni rizici generalno ne predstavljaju zabrinutost, karcinogeni i mutageni rizici zahtevaju pažnju, posebno za određene kategorije proizvoda i načine pripreme.

Posebno je važno istaći da su čipsevi od krompira pokazali najveći rizik, sa vrednostima mutagenog rizika iznad kritičnog praga od $1,00E-4$. Ovo je u skladu sa međunarodnim nalazima koji identifikuju čipseve kao jedan od glavnih izvora akrilamida u ishrani (EFSA CONTAM Panel, 2015).

Rezultati ovog istraživanja pružaju naučnu osnovu za:

- razvoj ciljanih strategija smanjenja akrilamida u hrani;
- informisanje potrošača o bezbednijim načinima pripreme hrane;
- usmeravanje regulatornih aktivnosti prema kategorijama proizvoda sa najvećim rizikom;
- dalji monitoring i kontrolu sadržaja akrilamida u hrani na srpskom tržištu.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije uspešno je razvijena i validovana analitička metoda bazirana na primeni tačne hromatografije zasnovane na hidrofilnim interakcijama spregnute sa tandemna masenom spektrometrijom (HILIC-MS/MS) za određivanje akrilamida u različitim vrstama hrane, nakon čega je sprovedena sistematska procena zdravstvenih rizika po stanovništvo Srbije usled izloženosti akrilamidu putem ishrane. Disertacija je strukturirana u dve komplementarne istraživačke celine, čiji rezultati pružaju značajan doprinos razumevanju prisustva akrilamida u hrani na tržištu Srbije i potencijalnih zdravstvenih implikacija.

U prvoj celini istraživanja razvijena je jednostavna, brza i robustna HILIC-MS/MS metoda za kvantitativno određivanje niskih koncentracija akrilamida u pekarskim proizvodima, proizvodima na bazi krompira i dečijoj hrani na bazi cerealijske. Postignute su dobre analitičke performanse sa granicom detekcije (LOD) od 2,71 µg/kg i granicom kvantifikacije (LOQ) od 10,00 µg/kg, što je niže od referentnih vrednosti propisanih regulativom Evropske unije i Republike Srbije. Validovana procedura se odlikuje rikaveri vrednostima u opsegu 98,9-102,8%, preciznošću 2,1-4,0% RSD i linearnim odzivom u širokom opsegu koncentracije (10-2500 µg/kg, $r^2 > 0,9992$). Rezultati validacije potvrdili su da razvijena metoda ispunjava sve zahtevane kriterijume validacije u pogledu osetljivosti, linearnosti, specifičnosti, rikaveri, preciznosti i robustnosti, u skladu sa regulatornim zahtevima definisanim u SANTE/11312/2021v2 smernicama i nacionalnom pravilniku. Korišćenje izotopski obeleženog internog standarda ($^{13}\text{C}_3$ -akrilamid), male zapremine injektovanja (5 µL) i HILIC metodologije omogućili su minimizovanje matriks efekta (-12%), čime je postignuta pouzdana i tačna kvantifikacija akrilamida jednostavnom kalibracijom u rastvaraču.

Značajan metodološki doprinos predstavlja primena enzima asparaginaze (Novozymes' Acrylaway) za pripremu laboratorijskih kontrolnih uzoraka hleba sa sadržajem akrilamida ispod granice detekcije, čime je prevaziđen nedostatak matriksa bez akrilamida kao jedan od izazova u analitici akrilamida za razvoj i validaciju metode. Implementacija optimizovane QuEChERS metodologije povećala je efikasnost analize uz istovremeno smanjenje utroška organskih rastvarača i pojednostavljenje analitičkog postupka.

U drugoj celini istraživanja sprovedena je sistematska procena izloženosti stanovništva Srbije akrilamidu, analizom različitih vrsta hleba, finih pekarskih proizvoda (keks, griscine), čipseva i dečije hrane na bazi cerealijske. Prosečan sadržaj akrilamida u analiziranim uzorcima hleba iznosio je 26,03 µg/kg, pri čemu je 91% uzoraka bilo u skladu sa referentnim vrednostima propisanim regulativom Republike Srbije. Ustanovljena je statistički značajna razlika između različitih tipova hleba ($F = 3,42$, $p = 0,012$), pri čemu su integralni pšenični hlebovi pokazali najviše prosečne koncentracije ($43,15 \pm 19,69$ µg/kg).

Posebno vredan doprinos ove disertacije predstavlja detaljna analiza distribucije akrilamida u različitim delovima hleba, koja je pokazala statistički značajno više koncentracije u korici u poređenju sa sredinom hleba ($p < 0,05$) u većini slučajeva. Najizraženija razlika zabeležena je kod integralnog pšeničnog hleba sa semenkama, gde je sadržaj akrilamida u korici iznosio 79,18 µg/kg, a u sredini 22,01 µg/kg ($p = 0,001$). Ustanovljeno je da prisustvo semenki statistički značajno doprinosi formiranju akrilamida, sa koncentracijama u hlebu sa semenkama ($36,70 \pm 26,33$ µg/kg) u poređenju sa hlebom bez semenki ($17,60 \pm 8,05$ µg/kg, $p = 0,015$).

Eksperimentalno je potvrđena direktna korelacija između dužine tostiranja hleba i formiranja akrilamida, pri čemu je zabeležen porast koncentracije sa 21,66 µg/kg u netostiranom, do 244,24 µg/kg u hlebu tostiranom 15 minuta. Među ostalim analiziranim prehrambenim proizvodima, najviše koncentracije akrilamida određene su u uzorcima čipsa ($294,62\text{--}670,43$ µg/kg). Uzorci keksa

sadržavali su akrilamid u opsegu koncentracija od 26,19 do 222,20 $\mu\text{g/kg}$, dok su u grisinama određene vrednosti u rasponu od 61,09 do 271,80 $\mu\text{g/kg}$. Dečija hrana na bazi cerealijskih proizvoda pokazala je koncentracije ispod limita kvantifikacije ($<10 \mu\text{g/kg}$), što ukazuje na uspešnu primenu mera kontrole u ovoj važnoj kategoriji proizvoda.

Sveobuhvatna procena zdravstvenih rizika sprovedena prema EFSA i US EPA metodologijama pokazala je složenu sliku. Nekarcinogeni rizici ne predstavljaju značajnu zabrinutost - sve vrednosti margine izloženosti (MOE_{nc}) bile su veće od 100, a koeficijenti opasnosti (HQ) ispod 0,1. Međutim, karcinogeni i mutageni rizici zahtevaju pažnju.

Procena karcinogenog rizika pokazala je da je čak i za netostirani hleb margina izloženosti (MOE_{c}) ispod preporučene vrednosti od 10.000, sa daljim smanjenjem pri produženom tostiranju. Vrednosti mutagenog rizika (R_{m}) prelaze $1,00\text{E-}6$ za sve analizirane uzorke, dok za čipseve i hleb tostiran duže od 5 minuta vrednosti R_{m} prelaze $1,00\text{E-}4$, što ukazuje na značajan zdravstveni rizik. Od svih analiziranih prehrambenih proizvoda, čipsevi su pokazali najviše koncentracije akrilamida i konsekvatno najviši stepen zdravstvenog rizika. Prema vrednostima MOE_{c} , samo specifične vrste hleba (meki pšenični, mešani pšenično-ražani, ražani integralni), tri uzorka keksa i dva uzorka grisine pokazali su zadovoljavajući nivo bezbednosti ($\text{MOE}_{\text{c}} > 10.000$).

Rezultati ove disertacije pružaju vredne informacije proizvođačima hrane i nadležnim institucijama u Srbiji za razvoj efikasnih strategija za smanjenje sadržaja akrilamida u prehrambenim proizvodima. Praktične preporuke za potrošače koje proizilaze iz ovog istraživanja uključuju: umereno tostiranje hleba (maksimalno 5 minuta), uklanjanje potamnjelih površinskih slojeva tostiranog hleba, izbegavanje kore sa semenkama i ograničavanje konzumacije visokorizičnih proizvoda poput čipsa. Regulatornim telima se preporučuje uspostavljanje jasnijih, proizvodno-specifičnih bezbednosnih smernica i unapređenje sistema monitoringa, za fine pekarske proizvode. Zdravstvene institucije trebalo bi da prioritizuju kampanje za podizanje svesti i promovisanje bezbednih praksi pripreme hrane zasnovane na naučnim dokazima.

Ova disertacija predstavlja značajan doprinos razumevanju prisustva akrilamida u hrani na tržištu Srbije i potencijalnih zdravstvenih rizika, pružajući naučnu osnovu za zaštitu javnog zdravlja i poboljšanje bezbednosti hrane. Razvijena analitička metoda i preporuke za smanjenje izloženosti akrilamidu predstavljaju praktične alate za implementaciju u sistemima kontrole kvaliteta i bezbednosti hrane u Srbiji. Rezultati omogućavaju procenu potencijalnih zdravstvenih rizika vezano za izloženost akrilamidu kroz konzumiranje hleba, finih pekarskih proizvoda (keks, grisine), čipseva i dečije hrane na bazi cerealijskih proizvoda u srpskoj populaciji, kao i poređenje sa aktuelnim referentnim nivoima.

6. LITERATURA

- Adimas, M. A., Abera, B. D., Adimas, Z. T., Woldemariam, H. W., & Delele, M. A. (2024). Traditional food processing and Acrylamide formation: A review. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30258>
- Adani G, Filippini T, Wise LA, Halldorsson TI, Blaha L, Vinceti M. (2020) Dietary Intake of Acrylamide and Risk of Breast, Endometrial, and Ovarian Cancers: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 29(6):1095-1106. doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-1628
- Aguas P.C., Fitzhenry M.J., Giannikopoulos G. and Varelis P. (2006). Analysis of acrylamide in coffee and cocoa by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385(8), 1526-1531.
- Ahmed Z.A. and Mohammed N.K. (2024). Investigating influencing factors on acrylamide content in fried potatoes and mitigating measures: a review, *Food Production, Processing and Nutrition* 6(1), 212-6.
- Ahn J.S., Castle L., Clarke D.B., Lloyd A.S., Philo M.R. and Speck D.R. (2002). Verification of the findings of acrylamide in heated foods, *Food Additives and Contaminants* 19(12), 1116-1124.
- Akgün B., Arıcı M., Çavuş F., Karataş A.B., Ekşi Karaağaç H. and Uçurum H.Ö. (2021). Application of l-asparaginase to produce high-quality Turkish coffee and the role of precursors in acrylamide formation, *Journal of Food Processing and Preservation* 45(6), 15486.
- Aktaş I.G., Hamzalıoğlu A., Kocadağlı T. and Gökmen V. (2022). Dietary exposure to acrylamide: A critical appraisal on the conversion of disregarded intermediates into acrylamide and possible reactions during digestion, *Current Research in Food Science* 5, 1118-1126.
- Alves R.C., Soares C., Casal S., Fernandes J.O. and Oliveira M.B.P.P. (2010). Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length, *Food Chemistry* 119(3), 929-934.
- Amrein T.M., Andres L., Manzardo G.G.G. and Amadò R. (2006). Investigations on the promoting effect of ammonium hydrogencarbonate on the formation of acrylamide in model systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(26), 10253-10261.
- Amrein T.M., Schönbächler B., Rohner F., Lukac H., Schneider H., Keiser A., Escher F. and Amadò R. (2004). Potential for acrylamide formation in potatoes: Data from the 2003 harvest, *European Food Research and Technology* 219(6), 572-578.
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D. and Schenck F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC International* 86(2), 412-431.
- Andačić, I. M., Tot, A., Ivešić, M., Krivohlavek, A., Thirumdas, R., Barba, F. J., Sabolović, M. B., Kljusurić, J. G., & Brnčić, S. R. (2020). Exposure of the Croatian adult population to acrylamide

through bread and bakery products. *Food Chemistry*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126771>

AOAC Official Method 2007.01 (2007) Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.

Atabati, H., Abouhamzeh, B., Abdollahifar, M. A., Sadat Javadinia, S., Gharibian Bajestani, S., Atamaleki, A., Raoofi, A., Fakhri, Y., Oliveira, C. A. F., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). The association between high oral intake of acrylamide and risk of breast cancer: An updated systematic review and meta-analysis. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 100, pp. 155–163). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.006>

Aydin Y. (2018). Acrylamide and its metabolite glycidamide can affect antioxidant defenses and steroidogenesis in Leydig and Sertoli cells, *Toxicology and Environmental Chemistry* 100, 247-257.

Basaran B. and Sadighara P. (2024). The level, human exposure, and health risk assessment of acrylamide in chips and breakfast cereals: A study from Türkiye, *Journal of Food Composition and Analysis* 134, 106584.

Başaran B., Aydın F. and Kaban G. (2020). The determination of acrylamide content in brewed coffee samples marketed in Turkey, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 37(2), 280-287.

Başaran B., Çuvalcı B. and Kaban G. (2023). Dietary Acrylamide Exposure and Cancer Risk: A Systematic Approach to Human Epidemiological Studies, *Foods* 12(2), 346.

Batuwita B.K.H.H., Jayasinghe J.M.J.K., Marapana R.A.U.J., Jayasinghe C.V.L. and Jinadasa B.K.K.K. (2024). Reduction of Asparagine and Reducing Sugar Content, and Utilization of Alternative Food Processing Strategies in Mitigating Acrylamide Formation--A Review, *Food and Bioprocess Technology* 17, 3565.

Becalski A., Brady B., Feng S., Gauthier B.R. and Zhao T. (2011). Formation of acrylamide at temperatures lower than 100°C: The case of prunes and a model study, *Food Additives and Contaminants - Part A* 28(6), 726-730.

Becalski A., Lau B.P.Y., Lewis D. and Seaman S.W. (2003). Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3), 802-808.

Bent G.A., Maragh P. and Dasgupta T. (2012). Acrylamide in Caribbean foods - Residual levels and their relation to reducing sugar and asparagine content, *Food Chemistry* 133(2), 451-457.

Berk E., Hamzalloglu A. and Gökmen V. (2019). Investigations on the Maillard Reaction in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Seeds Induced by Roasting, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(17), 4923-4930.

Bernal J., Ares A.M., Pól J. and Wiedmer S.K. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A* 1218, 7438-7452.

- Bertuzzi T., Martinelli E., Mulazzi A. and Rastelli S. (2020). Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars, *Food Chemistry* 303, 125372.
- Biedermann M., Mändli H. and Zurich E. (2002). Two GC-MS Methods for the Analysis of Acrylamide in Foodstuffs, *Research Gate Publication* 267778800.
- Blank I., Robert F., Goldmann T., Pollien P., Varga N., Devaud S., Saucy F., Huynh-Ba T. and Stadler R.H. (2005). Mechanisms of acrylamide formation: Maillard-induced transformation of asparagine, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 561, 171-189.
- Boyaci Gunduz C.P. (2023). Formulation and Processing Strategies to Reduce Acrylamide in Thermally Processed Cereal-Based Foods, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20(13), 6272.
- Branciarri R., Roila R., Ranucci D., Altissimi M.S., Mercuri M.L. and Haouet N.M. (2020). Estimation of acrylamide exposure in Italian schoolchildren consuming a canteen menu: health concern in three age groups, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 71(1), 122-131.
- Bråthen E. and Knutsen S.H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread, *Food Chemistry* 92(4), 693-700.
- Buszewski B. and Noga S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(1), 231-247.
- CAC/RCP 67-2009 (2009). Code of Practice for the Reduction of Acrylamide in Foods, *Codex Alimentarius Commission*.
- Calabrese M., de Luca L., Basile G., Sorrentino G., Esposito M., Pizzolongo F., Verde G. and Romano R. (2024). Reducing the acrylamide concentration in homemade bread processed with L-asparaginase, *LWT* 209, 116770.
- Calbiani F., Careri M., Elviri L., Mangia A. and Zagnoni I. (2004). Development and single-laboratory validation of a reversed-phase liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for identification and determination of acrylamide in foods, *Journal of AOAC International* 87(1), 107-115.
- Capuano E. and Fogliano V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies, *LWT* 44(4), 793-810.
- Casado F.J., Sánchez A.H. and Montaña A. (2010). Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives, *Food Chemistry* 119(1), 161-166.
- Cheng W.C., Hsiao S.W., Chou S.S., Sun-Hwang L., Lu T.J. and Yeh A.I. (2006). Determination of acrylamide in Chinese foods by GC-Ion Trap MS using 2-bromopropenamide and 2-bromopropenamide-13C3, *Journal of Food and Drug Analysis* 14(2), 207-214.

- Chu S. and Metcalfe C.D. (2007). Analysis of acrylamide in water using a coevaporation preparative step and isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 79(13), 5093-5096.
- Claus A., Mongili M., Weisz G., Schieber A. and Carle R. (2008). Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls, *Journal of Cereal Science* 47(3), 546-554.
- Constantinou C. and Koutsidis G. (2016). Investigations on the effect of antioxidant type and concentration and model system matrix on acrylamide formation in model Maillard reaction systems, *Food Chemistry* 197, 769-775.
- Cossu M., Sanna A., Ledda G., Chessa G. and Mangano G. (2024). Development and method validation for determination of acrylamide in food by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis, *Journal of Food Composition and Analysis* 135, 106698.
- Curtis T.Y. and Halford N.G. (2016). Reducing the acrylamide-forming potential of wheat, *Food and Energy Security* 5(3), 153-164.
- da Cunha M.C., dos Santos Aguilar J.G., de Melo R.R., Nagamatsu S.T., Ali F., de Castro R.J.S. and Sato H.H. (2019). Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications, *Food Research International* 126, 108658.
- Da Costa G.G., Churchwell M.I., Hamilton L.P., Von Tungeln L.S., Beland F.A., Marques M.M. and Doerge D.R. (2003). DNA Adduct Formation from Acrylamide via Conversion To Glycidamide in Adult and Neonatal Mice, *Chemical Research in Toxicology* 16, 1328-1337.
- Daniali G., Jinap S., Sanny M. and Tan C.P. (2018). Effect of amino acids and frequency of reuse frying oils at different temperature on acrylamide formation in palm olein and soy bean oils via modeling system, *Food Chemistry* 245, 1-6.
- Daughlon C.G. (1988). Quantitation of Acrylamide (and Polyacrylamide): Critical Review of Methods for Trace Determination/Formulation Analysis & Future-Research Recommendations, *California Public Health Foundation* Final Report No. CGD-02/88.
- De Boni A., Pasqualone A., Roma R. and Acciani C. (2019). Traditions, health and environment as bread purchase drivers: A choice experiment on high-quality artisanal Italian bread, *Journal of Cleaner Production* 221, 249-260.
- De Paola E.L., Montevercchi G., Masino F., Garbini D., Barbanera M. and Antonelli A. (2017). Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection, *Food Chemistry* 217, 191-195.
- Delgado-Andrade C., Mesías M., Morales F.J., Seiquer I. and Navarro M.P. (2012). Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11-14 years consuming a traditional and balanced diet, *LWT* 46(1), 16-22.

- Delatour T., Desmarchelier A. and Stadler R.H. (2022). Challenges in the measurement of acrylamide in food by confirmatory methods, *Current Opinion in Food Science* 48, 100951.
- Delatour T., Périsset A., Goldmann T., Riediker S. and Stadler R.H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(15), 4625-4631.
- Desmarchelier A., Bebius A., Reding F., Griffin A., Ahijado Fernandez M., Beasley J., Clauzier E. and Delatour T. (2022). Towards a consensus LC-MS/MS method for the determination of acrylamide in food that prevents overestimation due to interferences, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 39(4), 653-665.
- Desmarchelier A., Hamel J. and Delatour T. (2020). Sources of overestimation in the analysis of acrylamide-in coffee by liquid chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1610, 460566.
- Di Francesco A., Mari M., Ugolini L., Parisi B., Genovese J., Lazzeri L. and Baraldi E. (2019). Reduction of acrylamide formation in fried potato chips by *Aureobasidium pullulans* L1 strain, *International Journal of Food Microbiology* 289, 168-173.
- Djekic I., Udovicki B., Kljusurić J.G., Papageorgiou M., Jovanovic J., Giotsas C., Djugum J., Tomic N. and Rajkovic A. (2019). Exposure assessment of adult consumers in Serbia, Greece and Croatia to deoxynivalenol and zearalenone through consumption of major wheat-based products, *World Mycotoxin Journal* 12(4), 431-442.
- EFSA CONTAM Panel (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food, *EFSA Journal* 13(6), 4104.
- El-Zakhem Naous G., Merhi A., Abboud M.I., Mroueh M. and Taleb R.I. (2018). Carcinogenic and neurotoxic risks of acrylamide consumed through caffeinated beverages among the lebanese population, *Chemosphere* 208, 352-357.
- Elbashir A.A., Omar M.M.A., Ibrahim W.A.W., Schmitz O.J. and Aboul-Enein H.Y. (2014). Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 44(2), 107-141.
- Elmore S.J., Koutsidis G., Dodson A.T., Mottram D.S. and Wedzicha B.L. (2005). Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4), 1286-1293.
- EN 15662 (2018). Foods of plant origin - Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method, *European Committee for Standardization*.
- EN 16618 (2015). Food analysis- Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS), *European Committee for Standardization*.
- Epa U. and Risk Information System Division I. (n.d.). Acrylamide (CASRN 79-06-1), *IRIS US EPA*.

- Erickson B.E. (2004). AC Detective: Finding acrylamide, *Analytical Chemistry* 76(13), 247A-248A.
- Erkekoglu P. and Baydar T. (2014). Acrylamide neurotoxicity, *Nutritional Neuroscience* 17(2), 49-57.
- Erkekoğlu P. and Baydar T. (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods, *Nutrition Research Reviews* 23(2), 323-333.
- Eslamizad S., Kobarfard F., Tsitsimpikou C., Tsatsakis A., Tabib K. and Yazdanpanah H. (2019). Health risk assessment of acrylamide in bread in Iran using LC-MS/MS, *Food and Chemical Toxicology* 126, 162-168.
- European Commission (2017). Commission Regulation (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food, *Official Journal of the European Union* C/2017/7658.
- European Commission (2021). Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE/11312/2021v2, *European Union Reference Laboratory for Pesticides*.
- Fan M., Xu X., Lang W., Wang W., Wang X., Xin A., Zhou F., Ding Z., Ye X. and Zhu B. (2023). Toxicity, formation, contamination, determination and mitigation of acrylamide in thermally processed plant-based foods and herbal medicines: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 260, 115059.
- Fennell T.R. and Friedman M.A. (2005). Comparison of Acrylamide Metabolism in Humans and Rodents BT - Chemistry and Safety of Acrylamide in Food, *Springer US* Boston, 109-116.
- Fennell T.R., Sumner S.C.J., Snyder R.W., Burgess J. and Friedman M.A. (2006). Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans, *Toxicological Sciences* 93, 256-267.
- Fernandes J.O. and Soares C. (2007). Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips, *Journal of Chromatography A* 1175(1), 1-6.
- Filippini T., Halldorsson T.I., Capitão C., Martins R., Giannakou K., Hogervorst J., Vinceti M., Åkesson A., Leander K., Katsonouri A., Santos O., Virgolino A. and Laguzzi F. (2022). Dietary Acrylamide Exposure and Risk of Site-Specific Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Epidemiological Studies, *Frontiers in Nutrition* 9, 875607.
- FoodDrinkEurope (2019). Acrylamide Toolbox 2019, *Food and Drink Europe*. <https://www.fooddrinkeurope.eu/resource/acrylamide-toolbox/>
- Forstova V., Belkova B., Riddelova K., Vaclavik L., Prihoda J. and Hajslova J. (2014). Acrylamide formation in traditional Czech leavened wheat-rye breads and wheat rolls, *Food Control* 38(1), 221-226.
- Friedman M. (2003). Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16), 4504-4526.

- Fu Y., Li Q., Chen J., Wang L., Li R., Zhou G. and Liu Z. (2011). Rapid detection of acrylamide residue in heated food by enzyme linked immunosorbent assay, *China Brewing* 5, 77-79.
- Galluzzo F.G., Cammilleri G., Pantano L., lo Cascio G., Pulvirenti A., Macaluso A., Vella A. and Ferrantelli V. (2021). Acrylamide assessment of wheat bread incorporating chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by LC-MS/MS, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 38(3), 388-395.
- García-Ríos D., Alvaro J.E., Zuñiga M.E., Campos D., Aguilar-Galvez A., Mariotti-Celis M.S., Pedreschi F. and Pedreschi R. (2023). Targeted Primary and Secondary Metabolite Analysis of Colored Potato "Michuñe Negra" Grown in Soilless Culture and during Prolonged Cold Storage: Implications in Acrylamide Formation during Frying, *Agronomy* 13(5), 1209.
- Gazi S., Göncüoğlu Taş N., Görgülü A. and Gökmen V. (2023). Effectiveness of asparaginase on reducing acrylamide formation in bakery products according to their dough type and properties, *Food Chemistry* 402, 134224.
- Goldmann T., Perisset A., Bertholet M.C., Stadler R.H., Petersson E.v. and Hellenäs K.E. (2006). Impact of extraction conditions on the content of acrylamide in model systems and food, *Food Additives and Contaminants* 23(5), 437-445.
- González-Curbelo M., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.v., González-Sálamo J., Hernández-Borges J. and Rodríguez-Delgado M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 71, 169-185.
- Gökmen V. and Palazoğlu T.K. (2008). Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying, *Food and Bioprocess Technology* 1(1), 35-42.
- Gökmen V., Kocadağlı T., Göncüoğlu N. and Mogol B.A. (2012). Model studies on the role of 5-hydroxymethyl-2-furfural in acrylamide formation from asparagine, *Food Chemistry* 132(1), 168-174.
- Gökmen V., Şenyuva H.Z., Acar J. and Sarioğlu K. (2005). Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1088(1-2), 193-199.
- Govindaraju I., Sana M., Chakraborty I., Rahman M.H., Biswas R. and Mazumder N. (2024). Dietary Acrylamide: A Detailed Review on Formation, Detection, Mitigation, and Its Health Impacts, *Foods* 13(4), 556.
- Granby K., Nielsen N.J., Hedegaard R.v., Christensen T., Kann M. and Skibsted L.H. (2008). Acrylamide-asparagine relationship in baked/toasted wheat and rye breads, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 25(8), 921-929.
- Granvogl M. and Schieberle P. (2007). Quantification of 3-aminopropionamide in cocoa, coffee and cereal products: Correlation with acrylamide concentrations determined by an improved clean-up method for complex matrices, *European Food Research and Technology* 225(5-6), 857-863.

- Granvogl M., Jezussek M., Koehler P. and Schieberle P. (2004). Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes - A minor but potent precursor in acrylamide formation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(15), 4751-4757.
- Gündüz C.P.B. and Cengiz M.F. (2015). Acrylamide Contents of Commonly Consumed Bread Types in Turkey, *International Journal of Food Properties* 18, 833-841.
- Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumaru N., Postles J. and Mottram D.S. (2011). Sugars in crop plants, *Annals of Applied Biology* 158(1), 1-25.
- Halford N.G., Raffan S. and Oddy J. (2022). Progress towards the production of potatoes and cereals with low acrylamide-forming potential, *Current Opinion in Food Science* 47, 100887.
- Hamzalıoğlu A. and Gökmen V. (2012). Role of bioactive carbonyl compounds on the conversion of asparagine into acrylamide during heating, *European Food Research and Technology* 235(6), 1093-1099.
- Hidalgo F.J., Delgado R.M., Navarro J.L. and Zamora R. (2010). Asparagine decarboxylation by lipid oxidation products in model systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(19), 10512-10517.
- Hodge J.E. (1953). Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1(15), 928-943.
- Hölzle E., Breitling-Utzmann C., Blumberg O., Klass N., Remezov A., Schödl S., Sischka A., Tränkle K., Steliopoulos P. and Oellig C. (2025). Influence of chia and flaxseeds on acrylamide formation in sweet bakery products, *Food Chemistry* 463, 141344.
- Hu Q., Xu X., Fu Y. and Li Y. (2015). Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review, *Food Control* 56, 135-146.
- Nur Hidayah J., Abdul Razis A.F., Jambari N.N., Chai L.C., You L. and Sanny M. (2024). Dietary exposure to acrylamide among the Malaysian adult population, *Food and Chemical Toxicology* 185, 114502.
- IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1986). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some Chemicals Used in Plastics and Elastomers, Vol. 39, *World Health Organization*.
- IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans (1994). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some industrial chemicals Vol. 60, *World Health Organization*.
- IRIS (2012). Acrylamide; CASRN 79-06-1, *IRIS Assessment* 1-33.
- Jackson L.S. and Al-Taher F. (2005). Effects of consumer food preparation on acrylamide formation, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 561, 447-465.

- Jozinović, A., Šarkanj, B., Ačkar, D., Balentić, J. P., Šubarić, D., Cvetković, T., Ranilović, J., Guberac, S., & Babić, J. (2019). Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS method. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101971>
- Kalaivani M., Saleena U.V., Kamath Katapadi K.G., Praveen Kumar Y., Nayak D. and Nilima (2018). Effect of acrylamide ingestion on reproductive organs of adult male wistar rats, *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 12(11), 38170.
- Kebarle P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 35, 804-817.
- Keramat J., LeBail A., Prost C. and Jafari M. (2011). Acrylamide in Baking Products: A Review Article, *Food and Bioprocess Technology* 4(4), 530-543.
- Khorshidian N., Yousefi M., Shadnoush M., Siadat S.D., Mohammadi M. and Mortazavian A.M. (2020). Using probiotics for mitigation of acrylamide in food products: a mini review, *Current Opinion in Food Science* 32, 67-75.
- Khoshnam F., Zargar B., Pourreza N. and Parham H. (2010). Iranian Chemical Society Acetone Extraction and HPLC Determination of Acrylamide in Potato Chips, *Journal of the Iranian Chemical Society* 7(4), 944-951.
- Korićanac V., Janković S., Vranić D., Stanković I., Nikolić D., Petrović Z. and Milicević D. (2021). The presence of acrylamide in various type of food products from the Serbian market, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 854(1), 012045.
- Koutsidis G., de La Fuente A., Dimitriou C., Kakoulli A., Wedzicha B.L. and Mottram D.S. (2008). Acrylamide and pyrazine formation in model systems containing asparagine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15), 6105-6112.
- Kumar J., Das S. and Teoh S.L. (2018). Dietary Acrylamide and the Risks of Developing Cancer: Facts to Ponder, *Frontiers in Nutrition* 5, 14.
- Kumari A., Bhattacharya B., Agarwal T., Paul V., Maurya V.K., Chakkaravarthi S. and Simal-Gandara J. (2023). Method development and validation for acrylamide in potato cutlet by UHPLC-MS/MS, *Food Control* 151, 109817.
- Lambert M., Inthavong C., Hommet F., Leblanc J.C., Hulin M. and Guérin T. (2018). Levels of acrylamide in foods included in 'the first French total diet study on infants and toddlers', *Food Chemistry* 240, 997-1004.
- Ledl F., Schleicher E., Translated and Nursten H.E. (1990). New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body, *Vol. 29*.
- Lemos A.C., Borba V.S., Burkert J.F.M., Scaglioni P.T. and Badiale-Furlong E. (2023). Role of white bread matrix components and processing parameters on 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and acrylamide formation, *Food Control* 145, 109407.

- Li YL, Tang LJ, Yu JL (2019) Determination of acrylamide in potato chips and biscuits by hydrophilic interaction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Food Saf Qual* 10:4417–4423
- Liu C., Luo F., Chen D., Qiu B., Tang X., Ke H. and Chen X. (2014). Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods, *Talanta* 123, 95-100.
- Liu J., Liu X., Man Y. and Liu Y. (2018). Reduction of acrylamide content in bread crust by starch coating, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(1), 336-345.
- Liu J., Zhao G., Yuan Y., Chen F. and Hu X. (2008). Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 108(2), 760-767.
- Loeser E. and Drumm P. (2006). Using strong injection solvents with 100% aqueous mobile phase in RP-LC, *Journal of Separation Science* 29(18), 2847-2852.
- Magnusson B. and Örnemark U. (eds.) (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., *Eurachem*.
- Maillard L.C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoïdines par voie methodique, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 154, 66-68.
- Martín-Vertedor D., Fernández A., Mesías M., Martíne M., Díaz M. and Martín-Tornero E. (2020). Industrial strategies to reduce acrylamide formation in californian-style green ripe olives, *Foods* 9(9), 1202.
- Marzouk A.M., Shendy A.H., Aboelhassan A.E.F.A., Gomaa A.M. and El-Shahat M.F. (2023). Development and Validation of a Modified QuEChERS protocol Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Rapid and Accurate Determination of Acrylamide in Cereal-Based Baby Foods, *Journal of AOAC International* 106(4), 899-908.
- Mastovska K. and Lehotay S.J. (2006). Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(19), 7001-7008.
- Matoso V., Bargi-Souza P., Ivanski F., Romano M.A. and Romano R.M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept, *Food Chemistry* 283, 422-430.
- Mencin M., Abramovič H., Vidrih R. and Schreiner M. (2020). Acrylamide levels in food products on the Slovenian market, *Food Control* 114, 107267.
- Mesias M., Delgado-Andrade C. and Morales F.J. (2022). An updated view of acrylamide in cereal products, *Current Opinion in Food Science* 46, 100847.

- Mihai A.L., Negoită M. and Horneț G.A. (2020). Assessment of the acrylamide level of cereal-based products from Romania market in accordance with Commission Regulation (EU) 2017/2158, *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology* 44(1), 104-117.
- Mollakhalili-Meybodi N., Khorshidian N., Nematollahi A. and Arab M. (2021). Acrylamide in bread: a review on formation, health risk assessment, and determination by analytical techniques, *Environmental Science and Pollution Research* 28, 15627-15645.
- Mottram D.S., Wedzicha B.L. and Dodson A.T. (2002). Acrylamide is Formed in the Maillard Reaction, *Nature* 419, 448-449.
- Mousavi Khaneghah A., Fakhri Y., Nematollahi A., Seilani F. and Vasseghian Y. (2022). The Concentration of Acrylamide in Different Food Products: A Global Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression, *Food Reviews International* 38, 1-19.
- Murugan P.M., D S.A. and K S.G. (2016). A Review on Acrylamide Mitigation Strategies in Various Processed Foods, *International Journal of Advanced Research* 4(7), 1025-1040.
- Napolitano A., Morales F., Sacchi R. and Fogliano V. (2008). Relationship between virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(6), 2034-2040.
- Nasiri Esfahani B., Kadivar M., Shahedi M. and Soleimani-Zad S. (2017). Reduction of acrylamide in whole-wheat bread by combining lactobacilli and yeast fermentation, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 34(11), 1904-1914.
- Negoită M. and Culețu A. (2016). Application of an accurate and validated method for identification and quantification of acrylamide in bread, biscuits and other bakery products using GC-MS/MS System, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27(10), 1782-1791.
- Nematollahi A., Kamankesh M., Hosseini H., Ghasemi J., Hosseini-Esfahani F. and Mohammadi A. (2019). Investigation and determination of acrylamide in the main group of cereal products using advanced microextraction method coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Cereal Science* 87, 157-164.
- Nematollahi A., Kamankesh M., Hosseini H., Ghasemi J., Hosseini-Esfahani F., Mohammadi A. and Mousavi Khaneghah A. (2020). Acrylamide content of collected food products from Tehran's market: a risk assessment study, *Environmental Science and Pollution Research* 27(24), 30558-30570.
- Nguyen H.P. and Schug K.A. (2008). The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *Journal of Separation Science* 31(9), 1465-1480.
- Nielsen, N. J., Granby, K., Hedegaard, R. v., & Skibsted, L. H. (2006). A liquid chromatography - Tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.077>

- Notardonato I., Avino P., Centola A., Cinelli G. and Russo M.V. (2013). Validation of a novel derivatization method for GC-ECD determination of acrylamide in food, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(18), 6137-6141.
- Oracz J., Nebesny E. and Zyzelewicz D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products, *Talanta* 86, 23-34.
- Pacetti D., Gil E., Frega N.G., Álvarez L., Dueñas P., Garzón A. and Lucci P. (2015). Acrylamide levels in selected Colombian foods, *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 8(2), 99-105.
- Pan M., Liu K., Yang J., Hong L., Xie X. and Wang S. (2020). Review of research into the determination of acrylamide in foods, *Foods* 9(4), 524.
- Park J., Kamendulis L.M., Friedman M.A. and Klaunig J.E. (2002). Acrylamide-induced cellular transformation, *Toxicological Sciences* 65, 177-183.
- Pedersen J.R. and Olsson J.O. (2003). Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips, *Analyst* 128(4), 332-334.
- Pedreschi F., Mariotti M.S. and Granby K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: Formation, mitigation and risk assessment, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(1), 9-20.
- Peivasteh-Roudsari, L., Karami, M., Barzegar-Bafrouei, R., Samiee, S., Karami, H., Tajdar-Oranj, B., Mahdavi, V., Alizadeh, A. M., Sadighara, P., Oliveri Conti, G., & Mousavi Khaneghah, A. (2024). Toxicity, metabolism, and mitigation strategies of acrylamide: a comprehensive review. In *International Journal of Environmental Health Research* (Vol. 34, Issue 1, pp. 1–29). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2123907>
- Petersson E.v., Rosén J., Turner C., Danielsson R. and Hellenäs K.E. (2006). Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: An optimisation study, *Analytica Chimica Acta* 557(1-2), 287-295.
- Pogurschi, E. N., Zugravu, C. A., Ranga, I. N., Trifunsi, S., Munteanu, M. F., Popa, D. C., Tudorache, M., & Custura, I. (2021). Determination of acrylamide in selected foods from the Romanian market. *Foods*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092110>
- Powers S.J., Mottram D.S., Curtis A. and Halford N.G. (2017). Acrylamide levels in potato crisps in Europe from 2002 to 2016, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 34(12), 2085-2100.
- Prata R., Vargas Pérez M., Godoy H.T., Frenich A.G. and Romero-González R. (2023). Determination of acrylamide in commercial baby foods by LC-QqQ-MS/MS: a simple method for routine analyses, *Research Square preprint*.
- Pravilnik o maksimalno dovoljenim koncentracijama određenih kontaminenata u hrani (2019). *Službeni glasnik RS* br. 73/2024 i 90/2024.

- Preston A., Fodey T. and Elliott C. (2008). Development of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis, *Analytica Chimica Acta* 608(2), 178-185.
- Pundir C.S., Yadav N. and Chhillar A.K. (2019). Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review, *Trends in Food Science and Technology* 85, 211-225.
- Raffan S. and Halford N.G. (2019). Acrylamide in food: Progress in and prospects for genetic and agronomic solutions, *Annals of Applied Biology* 175(3), 259-281.
- Rafferty, J. L., Siepmann, J. I., & Schure, M. R. (2008). Molecular-level comparison of alkylsilane and polar-embedded reversed-phase liquid chromatography systems. *Analytical Chemistry*, 80(16), 6214–6221. <https://doi.org/10.1021/ac8005473>
- Recio L., Friedman M., Marroni D., Maynor T. and Chepelev N.L. (2017). Impact of Acrylamide on Calcium Signaling and Cytoskeletal Filaments in Testes from F344 Rat, *International Journal of Toxicology* 36(2), 124-132.
- Republički zavod za statistiku, <https://www.stat.gov.rs/>
- Rifai L. and Saleh F.A. (2020). A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies, *International Journal of Toxicology* 39(2), 93-102.
- Roach J.A.G., Andrzejewski D., Gay M.L., Nortrup D. and Musser S.M. (2003). Rugged LC-MS/MS Survey Analysis for Acrylamide in Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(26), 7547-7554.
- Rosén J. and Hellenäs K.E. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analyst* 127(7), 880-882.
- Rosén J., Nyman A. and Hellenäs K.E. (2007). Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for food analysis, *Journal of Chromatography A* 1172(1), 19-24.
- Roszkó, M. Ł., Szczepańska, M., Szymczyk, K., & Rzepkowska, M. (2020). Dietary risk evaluation of acrylamide intake with bread in Poland, determined by two comparable cleanup procedures. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1666924>
- Sá, A. G. A. and House J.D. (2024). Adding pulse flours to cereal-based snacks and bakery products: An overview of free asparagine quantification methods and mitigation strategies of acrylamide formation in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1), 1-20, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13260>
- Sáez-Hernández R., Ruiz P., Mauri-Aucejo A.R., Yusa V. and Cervera M.L. (2022). Determination of acrylamide in toasts using digital image colorimetry by smartphone, *Food Control* 141, 109163.

- Schouten M.A., Santanatoglia A., Angeloni S., Ricciutelli M., Acquaticci L., Caprioli G., Vittori S. and Romani S. (2024). Effects of Nuts, Dried Fruits, Dried Seeds and Black Olives as Enrichment Ingredients on Acrylamide Concentrations in Sweet and Savoury Biscuits, *Food and Bioprocess Technology* 17(6), 1525-1538.
- Semla M., Goc Z., Martiniaková M., Omelka R. and Formicki G. (2017). Acrylamide: A common food toxin related to physiological functions and health, *Physiological Research* 66(2), 205-217.
- Şenyuva H.Z. and Gökmen V. (2006). Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method, *Food Chemistry* 97(3), 539-545.
- Sirot V., Hommet F., Tard A. and Leblanc J.C. (2012). Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study, *Food and Chemical Toxicology* 50(3-4), 889-894.
- Smith E.A., Oehme F.W. and Oehme F.W. (1991). Acrylamide and Polyacrylamide: A Review of Production, Use, Environmental Fate and Neurotoxicity, *Reviews on Environmental Health* 9(4), 215-228.
- Soares C.M.D., Alves R.C. and Oliveira M.B.P.P. (2015). Acrylamide in Coffee: Influence of Processing, *Processing and Impact on Active Components in Food* 575-582.
- SRPS EN 16618 (2015). Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), *Institut za standardizaciju Srbije*.
- Stadler R.H. (2019). Food process contaminants, *ACS Symposium Series* 1306, 1-13.
- Stadler R.H. and Studer A. (2016). Acrylamide Formation Mechanisms, *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects* 1-17.
- Stadler R.H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P.A., Robert M.C. and Riedecker S. (2002). Acrylamide from Maillard Reaction Products, *Nature* 419, 449-450.
- Stadler R.H., Robert F., Riediker S., Varga N., Davidek T., Devaud S., Goldmann T., Hau J. and Blank I. (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the maillard reaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(17), 5550-5558.
- Statement on summary report on Acrylamide in food of the 64th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives by the Scientific Panel on contaminants in the food chain (CONTAM) (2005). *EFSA Journal* 3(4), 619.
- Suman M., Generotti S., Cirlini M. and Dall'asta C. (2019). Acrylamide reduction strategy in combination with deoxynivalenol mitigation in industrial biscuits production, *Toxins* 11(9), 499.
- Surdyk N, Rosén J, Andersson R, Åman P. (2004). Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(7):2047-2051. doi:10.1021/jf034999w

- Granby Surma M., Sadowska-Rociak A. and Cieřlik E. (2018). Assessment of thermal processing contaminant levels in dried and smoked fruits, *European Food Research and Technology* 244(9), 1533-1543.
- Surma M., Sadowska-Rociak A., Cieřlik E. and Sznajder-Katarzyńska K. (2017). Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes, *Microchemical Journal* 131, 98-102.
- Szafrańska A., Podolska G., Świder O., Kotyrba D., Aleksandrowicz E., Podolska-Charlery A. and Roszko M. (2024). Factors Influencing the Accumulation of Free Asparagine in Wheat Grain and the Acrylamide Formation in Bread, *Agriculture* 14(2), 207.
- Takatsuki S., Nemoto S., Sasaki K. and Maitani T. (2003). Determination of Acrylamide in Processed Foods by LC/MS Using Column Switching, *Journal of Food Hygiene Society of Japan* 44, 89-95.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S. and Törnqvist M. (2000). Acrylamide: A cooking carcinogen?, *Chemical Research in Toxicology* 13(6), 517-522.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S. and Törnqvist M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(17), 4998-5006.
- Tekkeli S.E.K., 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.
- Thermo Scientific (2014). HILIC Separations A Practical Guide to HILIC Mechanisms, Method Development and Troubleshooting, *Thermo Fisher Scientific*.
- Tölgyesi Á. and Sharma V.K. (2020). Determination of acrylamide in gingerbread and other food samples by HILIC-MS/MS: A dilute-and-shoot method, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1136, 121933.
- U.S. Department of Energy (2024). RAIS Chemical Risk Calculator User's Guide, *Oak Ridge National Laboratory*.
- U.S. EPA (2005a). Guidelines for carcinogen risk assessment, *Environmental Protection Agency*.
- U.S. EPA (2005b). Supplemental Guidance for Assessing Susceptibility from Early-Life Exposure to Carcinogens, *Environmental Protection Agency* EPA/630/R-03/003F.
- U.S. EPA (2012). Benchmark Dose Technical Guidance, *Environmental Protection Agency* EPA/100/R-12/001.
- U.S. EPA (2024). Regional Screening Level (RSL) Summary Table (TR=1E-06, HQ=1) November 2024, *Environmental Protection Agency*.
- United Nations Development Programme (2025). The SDGs in action, *United Nations Development Programme*.

- Varmira K., Abdi O., Gholivand M.-B., Goicoechea H.C. and Jalalvand A.R. (2018). Intellectual modifying a bare glassy carbon electrode to fabricate a novel and ultrasensitive electrochemical biosensor: application to determination of acrylamide in food samples, *Talanta* 176, 509-517.
- Wang H., Lee A.W.M., Shuang S. and Choi M.M.F. (2008). SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods, *Microchemical Journal* 89(2), 90-97.
- Weisshaar R. (2004). Acrylamide in heated potato products - Analytics and formation routes, *European Journal of Lipid Science and Technology* 106(11), 786-792.
- Wenzl T., de la Calle M.B. and Anklam E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: A review, *Food Additives and Contaminants* 20(10), 885-902.
- Xu, F., Oruna-Concha, M. J., & Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. In *Food Chemistry* (Vol. 210, pp. 163–171). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.105>
- Yangping L., Yuxiang L., Hongjing C., Wenting Z. and Yan Y. (2023). General method for detecting acrylamide in foods and comprehensive survey of acrylamide in foods sold in Southeast China, *Analytical Methods* 15, 2275-2283.
- Yasuhara A., Tanaka Y., Hengel M. and Shibamoto T. (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(14), 3999-4003.
- Yaylayan V.A., Wnorowski A. and Perez Locas C. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6), 1753-1757.
- Yu W.Z., Shen P., Lim I., Shi R.R.S., Cai M., Chin Y.S., Tay A.J., Ang W.M., Er J.C., Lim G.S., Wu Y., Li A., Aung K.T. and Chan S.H. (2023). Occurrence and Dietary Exposure to Acrylamide from Foods Consumed within and outside Main Meals in Singapore, *Foods* 12(16), 3022.
- Zhang Y. and Ren Y. (2009). New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Mitigation Recipes, *Chemical Reviews* 109(9), 4375-4397.
- Zhang Y., Huang M., Zhuang P., Jiao J., Chen X., Wang J. and Wu Y. (2018). Exposure to acrylamide and the risk of cardiovascular diseases in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006, *Environment International* 117, 154-163.
- Zhivagui M., Ng A.W.T., Ardin M., Churchwell M.I., Pandey M., Renard C., Villar S., Cahais V., Robitaille A., Bouaoun L., Heguy A., Guyton K.Z., Stampfer M.R., McKay J., Hollstein M., Olivier M., Rozen S.G., Beland F.A., Korenjak M. and Zavadil J. (2019). Experimental and pan-cancer genome analyses reveal widespread contribution of acrylamide exposure to carcinogenesis in humans, *Genome Research* 29(4), 521-531.
- Žilić, S., Aktağ, I. G., Dodig, D., Filipović, M., & Gökmen, V. (2020). Acrylamide formation in biscuits made of different wholegrain flours depending on their free asparagine content and baking conditions. *Food Research International*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109109>

Žilić S., Dodig D., Basić Z., Vančetović J., Titan P., Đurić N. and Tolimir N. (2017). Free asparagine and sugars profile of cereal species: the potential of cereals for acrylamide formation in foods, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 34(5), 705-713.

Žilić S., Sarić B., Mogol B.A., Kravić N., Hamzaloğlu A., Simić M., Nikolić V. and Gökmen V. (2024). Assessment of acrylamide content in corn-based snack products marketed in Serbia, *Journal of Food Composition and Analysis* 135, 106652.

Zyzak D.V., Sanders R.A., Stojanovic M., Tallmadge D.H., Eberhart B.L., Ewald D.K., Gruber D.C., Morsch T.R., Strothers M.A., Rizzi G.P. and Villagran M.D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16), 4782-4787.

7. PRILOG

Tabela P1. Uticaj sastava i protoka mobilne faze na oblik pika akrilamida, retenciono vreme (RT) i odnos signal-šum (S/N).

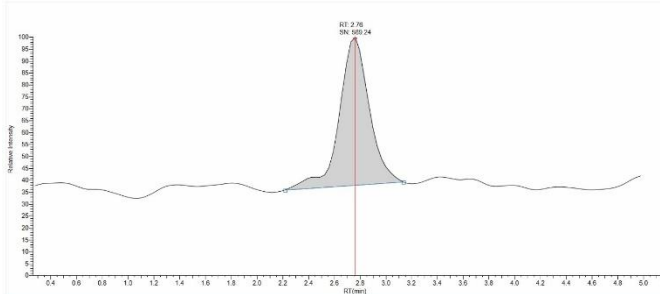
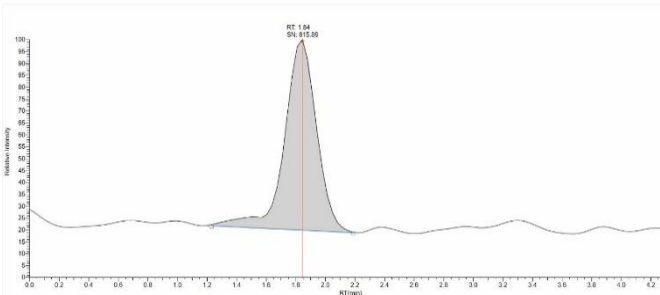
Hromatografski uslovi	Retenciono vreme (min)	Odnos Signal-šum (S/N)	Hromatogram (akrilamid 50 ng/mL u acetonitrilu)
<u>Sastav mobilne faze:</u> AcN/H ₂ O 95/5 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok:</u> 0,2 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 64 bar	2,76	589	
<u>Sastav mobilne faze:</u> AcN/H ₂ O 95/5 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok:</u> 0,3 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 98 bar	1,84	816	

Tabela P1. Nastavak.

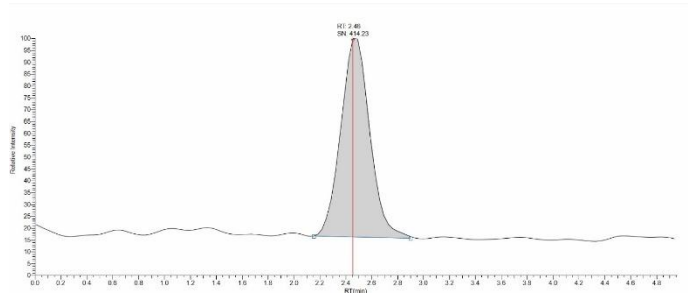
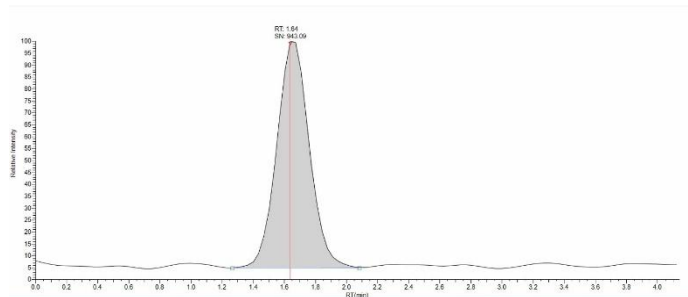
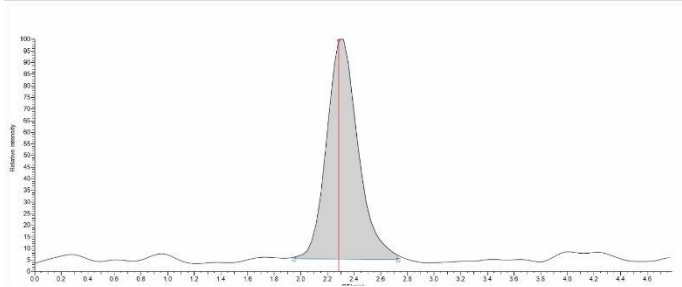
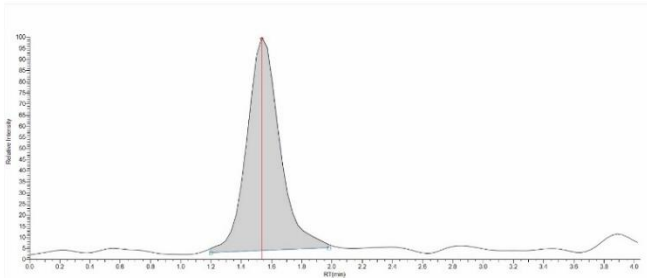
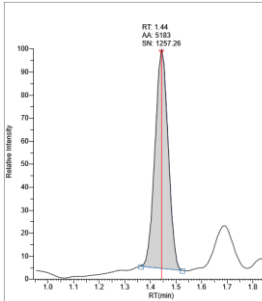
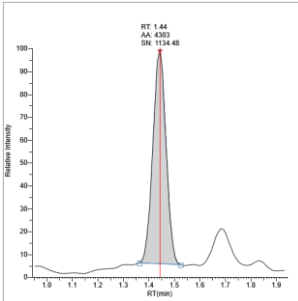
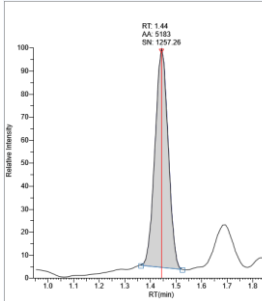
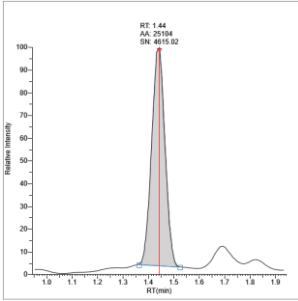
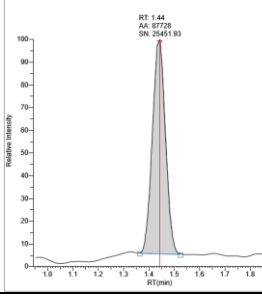
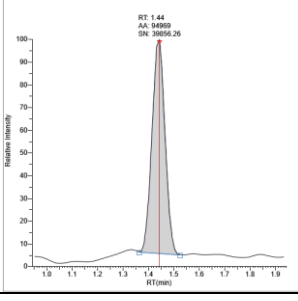
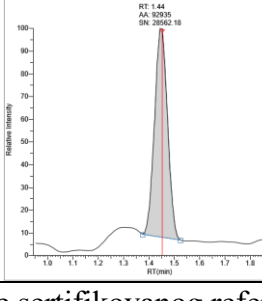
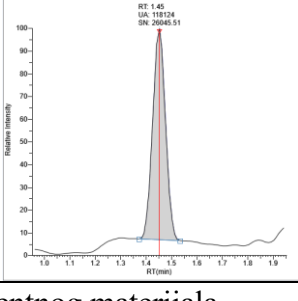
Hromatografski uslovi	Retenciono vreme (min)	Odnos Signal-šum (S/N)	Hromatogram (akrilamid 50 ng/mL u acetonitrilu)
<u>Sastav mobilne faze:</u> AcN/H ₂ O 90/10 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok:</u> 0,2 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 72 bar	2,46	414	
<u>Sastav mobilne faze*:</u> AcN/H ₂ O 90/10 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok*:</u> 0,3 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 107 bar	1,64	943	

Tabela P1. Nastavak.

Hromatografski uslovi	Retenciono vreme (min)	Odnos Signal-šum (S/N)	Hromatogram (akrilamid 50 ng/mL u acetonitrilu)
<u>Sastav mobilne faze:</u> AcN/H ₂ O 80/20 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok:</u> 0,2 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 89 bar	2,29	220	
<u>Sastav mobilne faze:</u> AcN/H ₂ O 80/20 (v/v) 0,1 %HCOOH <u>Protok:</u> 0,3 mL/min <u>Pritisak HPLC pumpe:</u> 132 bar	1,54	272	

* parametri korišćeni za dalju optimizaciju HILIC-MS/MS metode

Tabela P2. Rezultati postupka optimizacije pripreme uzorka.

Postupak ekstrakcije/rezultat	Rikaveri (preciznost)*	Hromatogram uzorka-hrskavi hleb (sertifikovana koncentracija 52.9 µg/kg)	
		Priprema 1. S/N 1257	Priprema 2. S/N 1134
2g uzorka Ekstrakcija: QuEChERS Mix I**	99,92%		
Prečišćavanja ekstrakta: bez prečišćavanja	(8,00% RSD)		
2g uzorka Ekstrakcija: QuEChERS Mix I**	89,32%		
Prečišćavanja ekstrakta: 5 mL <i>n</i> -heksan	(1,16% RSD)		
2g uzorka Ekstrakcija: QuEChERS Mix I**	96,27%		
Prečišćavanja ekstrakta: 5 mL <i>n</i> -heksan dSPE QuEChERS Mix VI*** (PSA i C18)	(0,12% RSD)		
5g uzorka Ekstrakcija: QuEChERS Mix I**	109,21%		
Prečišćavanja ekstrakta: 5 mL <i>n</i> -heksan dSPE QuEChERS Mix VI*** (PSA i C18)	(6,00% RSD)		

* Rikaveri – srednja vrednost dve nezavisne pripreme sertifikovanog referentnog materijala,
preciznost % RSD za dve nezavisne pripreme sertifikovanog referentnog materijala

**QuEChERS Mix I: komercijalna smeša soli 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 0,5 g dinatrijum
hidrogencitrata seskvihidrata, 1 g trinatrijum-citrat dihidrat

*** QuEChERS Mix VI: komercijalna smeša soli 0,15 g PSA, 0,9 g MgSO₄, 0,15 g C18

Tabela P3. Rezultati validacije HILIC-MS/MS analitičkog postupka za određivanje sadržaja akrilamida u hrani.

Parametar validacije	Rezultati
Koeficijent korelacije r^2	0,9991
Linearnost	10-2500 $\mu\text{g/kg}$ (< 10% odstupanje svake tačke kalibracije od nominalne vrednosti)
LOD $\mu\text{g/kg}$	2,71 $\mu\text{g/kg}$ (procenjeno)
LOQ $\mu\text{g/kg}$	9,02 $\mu\text{g/kg}$ (procenjeno) 10 $\mu\text{g/kg}$ (eksperimentalno potvrđeno)
Retention vreme (min)	1,64 $\pm$ 0,1
Matrks efekat	12% (ISTD-kalibracija); 50% (ESTD-kalibracija)
% rikaveri	CRM-Hrskavi hleb (52,9 $\mu\text{g/kg}$) 99,70%
	CRM-Hrana za odojčad (196 $\mu\text{g/kg}$) 98,90%
	CRM-Čips od povrća (1035 $\mu\text{g/kg}$) 101,50%
	QC-Hleb-10 (10 $\mu\text{g/kg}$) 102,80%
	QC-Hleb-50 (50 $\mu\text{g/kg}$) 100,80%
	QC-Hleb-1000 (1000 $\mu\text{g/kg}$) 97,30%
Preciznost-unutardnevna (% RSD)	CRM-Hrskavi hleb (52,9 $\mu\text{g/kg}$) 3,80%
	CRM-Hrana za odojčad (196 $\mu\text{g/kg}$) 3,70%
	CRM-Čips od povrća (1035 $\mu\text{g/kg}$) 2,10%
	QC-Hleb-10 (10 $\mu\text{g/kg}$) 3,60%
	QC-Hleb-50 (50 $\mu\text{g/kg}$) 2,90%
	QC-Hleb-1000 (1000 $\mu\text{g/kg}$) 2,80%
Preciznost-međudnevna (% RSD)	QC-Hleb-10 (10 $\mu\text{g/kg}$) 4,00%
	QC-Hleb-50 (50 $\mu\text{g/kg}$) 3,30%
	QC-Hleb-1000 (1000 $\mu\text{g/kg}$) 3,00%

ISTD-interni standard; ESTD-eksterni standard; QC-obogaćeni kontrolni uzorak; CRM-sertifikovani referentni materijal.

Tabela P4. Sadržaj akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) u različitim tipovima hleba na tržištu Republike Srbije sa propisanim nivoima referentnih vrednosti akrilamida u Republici Srbiji.

Tip hleba				Akrilamid (µg/kg)	Srednja vrednost ± SD (µg/kg)	Min. (µg/kg)	Maks. (µg/kg)	Ref. konc. (µg/kg)*
Uzorak	Oznaka uzorka	Sa semenkama (da/ne)	Način proizvodnje					
1. Pšenični hleb								
Pšenični-Meki-1	(PM-1)	ne	industrijski	6,95	14,93 ± 9,87	2,78	29,85	50
Pšenični-Meki-2	(PM-2)	ne	industrijski	7,46				
Pšenični-Meki-3	(PM-3)	ne	industrijski	7,68				
Pšenični-Meki-4	(PM-4)	ne	industrijski	20,37				
Pšenični-Meki-5	(PM-5)	ne	industrijski	23,67				
Pšenični-Meki-6	(PM-6)	ne	industrijski	2,78				
Pšenični-Meki-7	(PM-7)	ne	polu-industrijski	20,69				
Pšenični-Meki-8	(PM-8)	ne	polu-industrijski	29,85				
Pšenični-Integralni-1	(PI-1)	da	polu-industrijski	34,96	43,15 ± 19,69	17,98	72,23	50
Pšenični-Integralni-2	(PI-2)	da	polu-industrijski	31,34				
Pšenični-Integralni-3	(PI-3)	da	polu-industrijski	72,23				
Pšenični-Integralni-4	(PI-4)	da	industrijski	42,67				
Pšenični-Integralni-5	(PI-5)	da	industrijski	71,27				
Pšenični-Integralni-6	(PI-6)	da	polu-industrijski	46,53				
Pšenični-Integralni-7	(PI-7)	ne	polu-industrijski	19,82				
Pšenični-Integralni-8	(PI-8)	da	industrijski	17,98				
Pšenični-Integralni-9	(PI-9)	da	industrijski	51,54				

SD-standardna devijacija dva merenja; Min, Maks-minimalna i maksimalna koncentracija akrilamida;

* Ref. konc.- referentnih vrednosti akrilamida u Republici Srbiji („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024).

Tabela P4. Nastavak.

Tip hleba				Akrilamid (µg/kg)	Srednja vrednost ± SD (µg/kg)	Min. (µg/kg)	Maks. (µg/kg)	Ref. konc. (µg/kg)*
Uzorak	Oznaka uzorka	Sa semenkama (da/ne)	Način proizvodnje					
2. Mešani hleb								
Mešani Pšenica-Kukuruz-1	(MPK-1)	ne	polu-industrijski	24,50	25,99 ± 2,10	24,50	27,47	50
Mešani Pšenica-Kukuruz-2	(MPK-2)	ne	polu-industrijski	27,47				
Mešani Pšenica-Raž-1	(MPR-1)	ne	polu-industrijski	22,86	17,09 ± 6,30	10,01	24,11	50
Mešani Pšenica-Raž-2	(MPR-2)	da	polu-industrijski	12,01				
Mešani Pšenica-Raž-3	(MPR-3)	da	polu-industrijski	10,01				
Mešani Pšenica-Raž-4	(MPR-4)	ne	polu-industrijski	24,11				
Mešani Pšenica-Raž-5	(MPR-5)	ne	industrijski	16,44				
Mešani Kukuruz-Pirinač-1	(MKP-1)	da	industrijski	14,26	13,69 ± 3,85	8,63	17,99	100
Mešani Kukuruz-Pirinač-2	(MKP-2)	ne	industrijski	13,86				
Mešani Kukuruz-Pirinač-3	(MKP-3)	da	industrijski	8,63				
Mešani Kukuruz-Pirinač-4	(MKP-4)	ne	polu-industrijski	17,99				
3. Dvopek								
Dvopek-Raž	(DR)	da	industrijski	95,12	40,94 ± 36,28	18,11	95,12	350
Dvopek-Pšenica	(DP)	ne	industrijski	24,62				
Dvopek-Kukuruz-Pirinač-1	(DKP-1)	ne	industrijski	18,11				
Dvopek-Kukuruz-Pirinač-2	(DKP-2)	ne	industrijski	25,90				
4. Ražani hleb								
Ražani-integralni-1	(RI-1)	da	industrijski	11,05	10,69±0,52	10,32	11,05	300
Ražani-integralni-2	(RI-2)	da	industrijski	10,32				

SD-standardna devijacija dva merenja; Min, Maks-minimalna i maksimalna koncentracija akrilamida;

* Ref. konc.- referentnih vrednosti akrilamida u Republici Srbiji („Sl. glasnik RS“, br. 73/2024 i 90/2024).

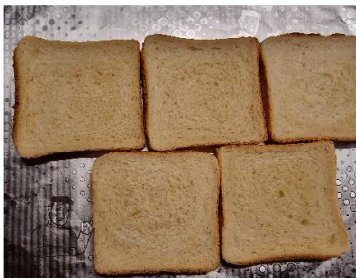
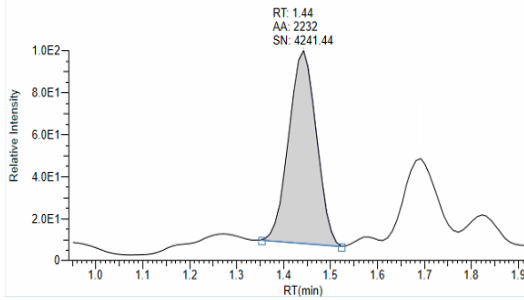
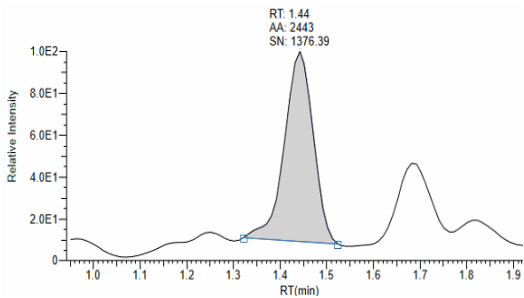
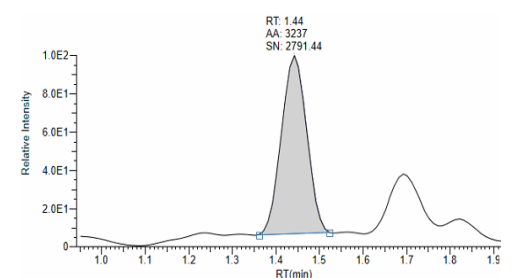
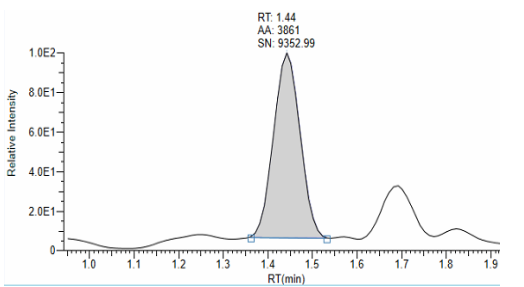
Tabela P5. Sadržaj akrilamida u sredini, kori i celom uzorku hleba sa udelima sredine i kore.

	Ceo hleb			Sredina hleba			Kora hleba			Sredina i kora hleba		
	Oznaka uzorka	Akrilamid (µg/kg)		Oznaka uzorka	Akrilamid (µg/kg)		Oznaka uzorka	Akrilamid (µg/kg)		Udeo**		<i>p</i> -vrednost
		Srednja vrednost	SD		Srednja vrednost	SD		Srednja vrednost	SD	sredina	kora	
Pšenični												
Meki hleb	MH	6,95	1,00	SR-MH	<LOD	-	K-MH	8,43*	1,00	0,6	0,4	-
Meki hleb sa semenkama	MH-S	34,95	2,56	SR-MH-S	<LOD	-	K-MH-S	54,54	2,56	0,5	0,5	-
Integralni sa semenkama-1	I-S-1	42,67	1,56	SR-I-S-1	22,01	0,92	K-I-S-1	79,18	1,56	0,7	0,3	0,005
Integralni sa semenkama-2	I-S-2	31,34	0,49	SR-I-S-2	4,58 *	0,57	K-I-S-2	51,96	0,49	0,5	0,5	0,001
Mešani												
Pšenično-ražani-1	PR-1	12,00	0,76	SR-PR-1	3,51*	0,15	K-PR-1	26,75	0,76	0,6	0,4	0,010
Pšenično-ražani-2	PR-2	22,86	3,26	SR-PR-2	11,46	0,68	K-PR-2	43,49	3,26	0,6	0,3	0,060
Pšenično-ražani sa semenkama-1	PR-S-1	24,10	0,86	SR-PR-S-1	5,24*	0,08	K-PR-S-1	62,83	0,86	0,7	0,3	0,010
Pšenično-ražani sa semenkama-2	PR-S-2	9,69	0,48	SR-PR-S-2	2,89*	0,26	K-PR-S-2	14,55	0,48	0,6	0,4	0,010
Kukuruzno-pirinčani	KP	14,17	0,97	SR-KP	10,52	1,03	K-KP	19,17	0,97	0,7	0,3	0,003
Kukuruzno-pirinčani sa semenkama	KP-S	13,74	0,19	SR-KP-S	13,04	0,22	K-KP-S	12,47	0,19	0,7	0,3	0,300
Ražani												
Integralni-ražani sa semenkama	IR-S	15,24	0,55	SR-IR-S	8,92*	0,52	K-IR-S	23,09	0,55	0,7	0,3	0,030

SD - standardna devijacija dva merenja; Srednja vrednost dva merenja; Udeo-udeo sredine i kore hleba u odnosu na ceo hleb; p-vrednost - statistički značajna razlika za $p < 0,05$

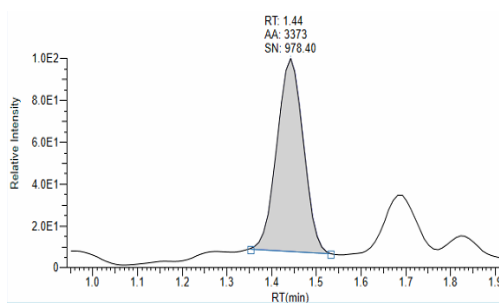
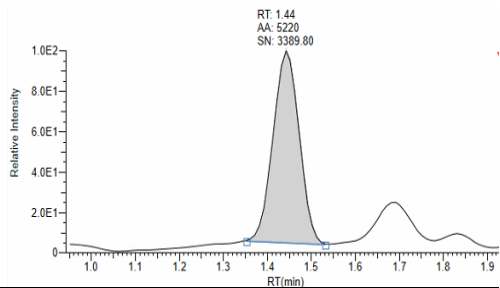
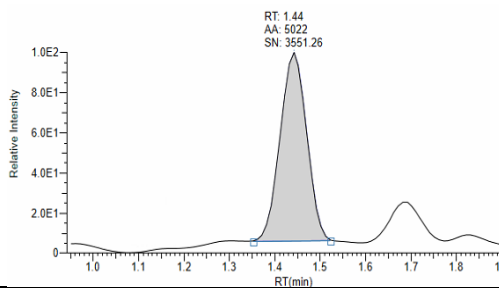
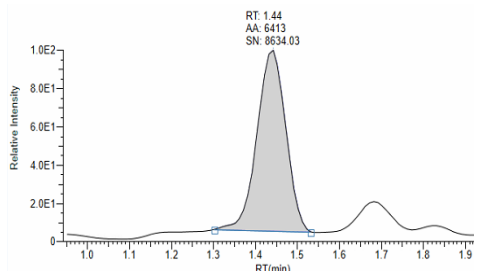
*LOD (2,71 µg/kg) < koncentracija < LOQ (10,00 µg/kg), **Udeo - udeo sredine i kore u odnosu na ceo hleb.

Tabela P6. Prosečne koncentracije akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) u uzorcima netostiranog i tostiranog hleba, izgled uzoraka i HILIC-MS/MS hromatogrami analiziranih uzoraka.

Vreme tostiranja (min)	AA $\pm$ SD ($\mu\text{g/kg}$)	Uzorak tostiranog hleba	Hromatogram
0	21,66 $\pm$ 1,38		
1	22,10 $\pm$ 0,20		
2	29,16 $\pm$ 2,50		
3	38,17 $\pm$ 0,14		

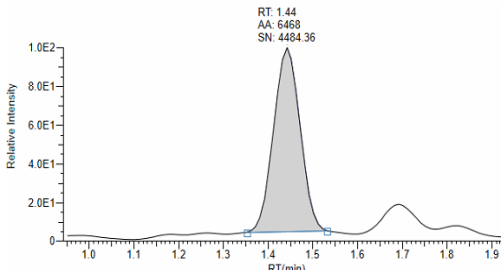
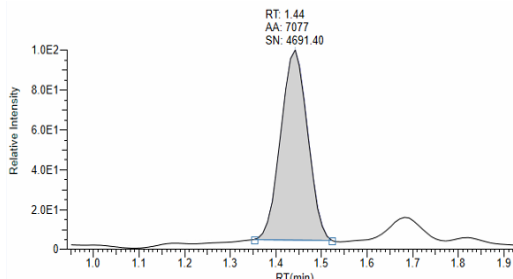
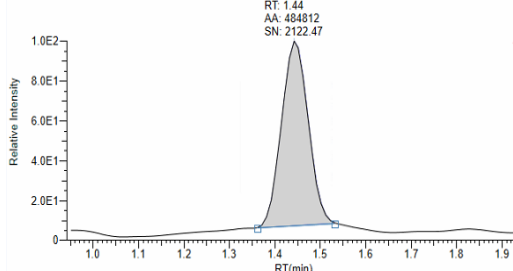
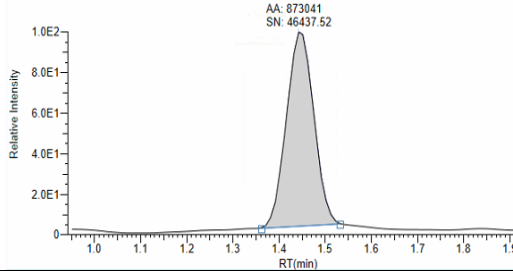
AA-akrilamid; SD-standardna devijacija dva merenja.

Tabela P6. Nastavak.

Vreme tostiranja (min)	AA± SD (µg/kg)	Uzorak tostiranog hleba	Hromatogram
4	35,17 ± 1,27		
5	51,41 ± 4,88		
6	49,85 ± 3,03		
7	66,72 ± 2,13		

AA-akrilamid; SD-standardna devijacija dva merenja.

Tabela P6. Nastavak.

Vreme tostiranja (min)	AA± SD (µg/kg)	Uzorak tostiranog hleba	Hromatogram
8	76,78 ± 1,17		
9	83,28 ± 0,55		
10	105,75 ± 16,48		
15	244,24 ± 2,01		

AA-akrilamid; SD-standardna devijacija dva merenja.

Tabela P7. Nekarcinogena i karcinogena margina izloženosti (MOE_{nc} i MOE_c) sa koeficijentom opasnosti (HQ) i mutagenim rizikom (R_m) u sredini, kori i celom hlebu.

Uzorak/tip hleba	Oznaka uzorka	MOE _{nc}		HQ		MOE _c		R _m	
		Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD
Sredina hleba									
Meki hleb	SR-MH	/	/	/	/	/	/	/	/
Meki hleb sa semenkama	SR-MH-S	/	/	/	/	/	/	/	/
Integralni sa semenkama-1	SR-I-S-1	10236	429	0,021	0,001	7082	296	3,35E-05	1,40E-06
Integralni sa semenkama-2	SR-I-S-2	74306	9259	0,003	0,000	51409	6406	4,64E-06	5,79E-07
Pšenično-ražani-1	SR-PR-1	77113	3297	0,003	0,000	53352	2281	4,44E-06	1,90E-07
Pšenično-ražani-2	SR-PR-2	24250	1440	0,009	0,001	16778	996	1,41E-05	8,40E-07
Pšenično-ražani sa semenkama-1	SR-PR-S-1	44682	705	0,005	0,000	30913	488	7,66E-06	1,21E-07
Pšenično-ražani sa semenkama-2	SR-PR-S-2	104162	9446	0,002	0,000	72066	6535	3,30E-06	2,99E-07
Kukuruzno-pirinčani	SR-KP	21885	2136	0,010	0,001	15141	1478	1,57E-05	1,53E-06
Kukuruzno pirinčani semenke	SR-KP-S	18122	308	0,012	0,000	12538	213	1,89E-05	3,22E-07
Integralni-ražani sa semenkama	SR-IR-S	26635	1554	0,008	0,000	18428	1075	1,29E-05	7,51E-07
Kora hleba									
Meki hleb	K-MH	33631	3974	0,006	0,001	39070	4617	6,83E-06	8,08E-07
Meki hleb sa semenkama	K-MH-S	6198	291	0,035	0,002	4800	226	5,53E-05	2,60E-06
Integralni sa semenkama-1	K-I-S-1	2843	56	0,076	0,001	6606	130	4,01E-05	7,89E-07
Integralni sa semenkama-2	K-I-S-2	6498	61	0,033	0,000	5033	47	5,27E-05	4,93E-07
Pšenično-ražani-1	K-PR-1	10102	287	0,021	0,001	13039	371	2,03E-05	5,78E-07
Pšenično-ražani-2	K-PR-2	6395	479	0,034	0,003	8667	649	3,07E-05	2,30E-06
Pšenično-ražani sa semenkama-1	K-PR-S-1	3727	51	0,058	0,001	6884	94	3,85E-05	5,26E-07
Pšenično-ražani sa semenkama-2	K-PR-S-2	20579	683	0,010	0,000	20626	685	1,29E-05	4,27E-07
Kukuruzno-pirinčani	K-KP	11969	606	0,018	0,001	25954	1315	1,02E-05	5,18E-07
Kukuruzno pirinčani semenke	K-KP-S	18958	289	0,011	0,000	36706	560	7,22E-06	1,10E-07
Integralni-ražani sa semenkama	K-IR-S	10276	245	0,021	0,000	19454	465	1,36E-05	3,26E-07

Tabela P7. Nastavak.

Tablica 17: Nastavak.

Uzorak/tip hleba	Oznaka uzorka	MOE _{nc}		HQ		MOE _c		R _m	
		Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD	Srednja vrednost	SD
Ceo hleb									
Meki hleb	MH	40898	5797	0,005	0,001	16977	2406	1,41E-05	2,00E-06
Meki hleb sa semenkama	MH-S	9665	313	0,022	0,001	3343	108	7,09E-05	2,30E-06
Integralni sa semenkama-1	I-S-1	5325	727	0,041	0,006	2763	377	8,65E-05	1,18E-05
Integralni sa semenkama-2	I-S-2	10845	1242	0,020	0,002	3751	429	6,36E-05	7,28E-06
Pšenično-ražani-1	PR-1	22534	1217	0,010	0,001	9744	526	2,43E-05	1,31E-06
Pšenično-ražani-2	PR-2	12132	59	0,018	0,000	5109	25	4,64E-05	2,27E-07
Pšenično-ražani sa semenkama-1	PR-S-1	9717	187	0,022	0,000	4847	93	4,89E-05	9,39E-07
Pšenično-ražani sa semenkama-2	PR-S-2	30899	1033	0,007	0,000	12059	403	1,97E-05	6,57E-07
Kukuruzno-pirinčani	KP	16206	1093	0,013	0,001	8262	557	2,87E-05	1,94E-06
Kukuruzno pirinčani semenke	KP-S	17210	386	0,012	0,000	8505	191	2,79E-05	6,25E-07
Integralni-ražani sa semenkama	IR-S	15581	649	0,014	0,001	7671	319	3,09E-05	1,29E-06

BIOGRAFIJA

Sanja Đekić je rođena 21. 1. 1970. godine u Beogradu, Republika Srbija. Završila je Zemunsku gimnaziju. Godine 1989. upisala je osnovne akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, studijski program Diplomirani Hemičar. Diplomirala je 2001. godine odbranivši završni rad pod naslovom „Izolovanje i identifikacija lignana iz biljke *Achillea lingulata*“, pod mentorstvom dr Vlatke Vajs, redovnog profesora. Specijalističke studije je završila 2006. godine na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Hemija. Odbranila je specijalistički rad sa temom "Određivanje antioksidativnih sastojaka vina" pod mentorstvom dr Slobodana Milosavljevića, redovnog profesora, čime je stekla zvanje Specijalista hemijskih nauka. Godine 2015. završila je master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Hemija, i odbranila završni rad pod naslovom „Validacija GC/MS metode: Određivanje sadržaja pesticida iz grupe triazina u uzorcima hrane“ pod mentorstvom dr Velea Teševića, redovnog profesora. Doktorske akademske studije je upisala 2016. godine, na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Hemija, pod mentorstvom dr Rade Baošić, redovnog profesora. Položila je sve ispite po planu i programu sa prosečnom ocenom 10.

Profesionalnu karijeru započela je 2001. godine u kompaniji MOL d.o.o., privrednom društvu za hemiju, biotehnologiju i konsalting. U periodu od 2001. do 2005. godine radila je kao analitičar i stekla značajno iskustvo u laboratorijskom radu i primeni analitičkih metoda. Godine 2005. unapređena je u rukovodioca hemijske laboratorije, i na toj poziciji ostaje do 2007. godine. Tokom ovog perioda, njene aktivnosti su se odnosile na sveobuhvatnu analizu različitih tipova uzoraka iz životne sredine, uključujući vodu, zemljište i vazduh, kao i razvoj i validaciju novih analitičkih metoda zasnovanih na gasnoj hromatografiji (eng. *Gas Chromatography*, GC), visokoefikasnoj tečnoj hromatografiji (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i jonskoj hromatografiji (eng. *Ion Chromatography*, IC). Pored toga, ključne odgovornosti su obuhvatale obezbeđivanje i kontrolu kvaliteta rada u celokupnom obimu delatnosti hemijske laboratorije, kroz rukovođenje procesom akreditacije laboratorije prema zahtevima standarda ISO/IEC 17025 (eng. *International Organization for Standardization*, ISO; *International Electrotechnical Commission*, IEC).

Od 2007. godine do danas zaposlena je u kompaniji Analysis d.o.o., koja je specijalizovana za distribuciju analitičke opreme, na poziciji specijaliste za aplikativnu podršku klijentima u oblasti hromatografije i masene spektrometrije. Pored pružanja ekspertske podrške i aktivnosti koje se odnose na rukovođenje kvalitetom, prema zahtevima standarda ISO 9001 i ISO/IEC 17025, njene trenutne odgovornosti uključuju demonstraciju rada i primenu instrumenata u oblasti hromatografije i masene spektrometrije, sveobuhvatnu obuku korisnika za rad na instrumentima, uključujući metodologiju pripreme uzoraka, tehničku podršku i rešavanje kompleksnih problema pri radu na instrumentima. Njena uža specijalnost je analitika hrane u domenu hromatografije i masene spektrometrije sa posebnim fokusom na masenu spektrometriju sa trostrukim kvadrupolom (eng. *Triple Quadrupole*) i masenu spektrometriju visoke rezolucije (orbitrap tehnologija).

Sanja Đekić je, po pozivu i u organizaciji Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, juna 2023. godine održala predavanje pod naslovom LC-MS/MS & IC-MS/MS Analysis of polar pesticides in food, u okviru seminara „Mass Spectrometry Techniques in Environmental and Food Safety Control“. U periodu od 2016. do 2020. godine bila je angažovana na ERASMUS+ međunarodnom projektu „NetChem: ICT umrežavanje za prevazilaženje tehničkih i društvenih barijera u instrumentalno-analitičkoj hemijskoj edukaciji“ (broj projekta: 573885-EPP-1-2016-1-RS-EPPKA2- CBHE-JP).

Sanja Đekić koristi engleski jezik, a od računarskih programa MSOffice, Matlab, SPSS, Origin, ChemDraw, ChemSketch, Compound Discoverer, TraceFinder, Chromeleon, Xcalibur.

Sanja Đekić je koautor pet naučnih radova objavljenih u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Dva naučna rada su objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i dva rada u međunarodnom časopisu (M23). Takođe, koautor je jednog naučnog saopštenja na međunarodnom skupu štampanom u izvodu (M34).

Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, prikazani su u dva naučna rada. Jedan rad je štampan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), dok je jedan rad publikovan u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21).

Naučni radovi:

1. **Sanja Đekić, Dubravka Relić, Isidora Kecojević, Mila Ilić, Ivana Sredović Ignjatović, Aleksandar Lolić, Rada Baošić (2025). Dietary exposure and health risks of acrylamide in Serbian market foods: Bread, biscuits, snacks, and potato chips. Journal of Food Composition and Analysis, 144. DOI 10.1016/j.jfca.2025.107698**
2. **Sanja Đekić, Isidora Kecojević, Biljana Bajić, Ana Joksimović, Aleksandar Lolić, Rada Baošić (2024). Rapid Determination of Acrylamide by HILIC-MS/MS in Selected Food Samples. Food Analytical Methods, 17, 1540–1549. DOI 10.1007/s12161-024-02676-9**
3. Elizabet Janjić-Hajnal, Jovana Kos, Bojana Radić, Mislav Anić, Radmila Radović, Nina Kudumija, Ana Vulić, **Sanja Đekić**, Jelka Pleadin, (2023) Impact of Climate Changes on the Natural Prevalence of Fusarium Mycotoxins in Maize Harvested in Serbia and Croatia. Foods, 12(5), 1002. DOI 10.3390/foods12051002
4. Bojana Radić, Radmila Radović, Elizabet Janjić-Hajnal, Anamarija Mandić, **Sanja Đekić**, Zorica Stojanović, Jovana Kos (2023). Moniliformin Occurrence in Serbian Maize over Four Years: Understanding Weather-Dependent Variability. Toxins, 15 (11), 634. DOI 10.3390/toxins15110634
5. Isidora Kecojević, **Sanja Đekić**, Milana Lazović, Danica Mrkajić, Rada Baošić, Aleksandar Lolić (2021). Evaluation of LC-MS/MS methodology for determination of 179 multi-class pesticides in cabbage and rice by modified QuEChERS extraction. Food Control. 123. DOI 10.1016/j.foodcont.2020.107693
6. Jelena Cvejić, **Sanja Đekić**, Aleksandar Petrović, Milica Atanacković, Slobodan Jović, Ilija Brčeski, Ljiljana Gijković-Bukarica (2010). Determination of *trans*- and *cis*-Resveratrol in Serbian Commercial Wines. Journal of Chromatographic Science, 48, 3, 229–234. DOI 10.1093/chromsci/48.3.229
7. **Sanja Đekić**, Slobodan Milosavljević, Vlatka Vajs, Slobodan Jović, Aleksandar Petrović, Ninoslav Nikićević, Verica Manojlović, Viktor Nedović, Vele Tešević (2008). *Trans*- and *cis*-resveratrol concentration in wines produced in Serbia. Journal of the Serbian Chemical Society, 73,11, 1027-1037. DOI:10.2298/JSC0811027D

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Сања Ђекић**

Број индекса **ДХ01/2016**

Изјављујем

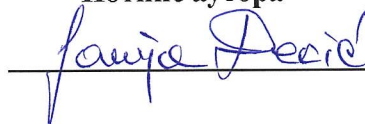
да је докторска дисертација под насловом

Razvoj i primena HILIC MS/MS metode za određivanje akrilamida u odabranim uzorcima hrane sa procenom rizika po ljudsko zdravlje

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 14.08.2025.

Потпис аутора



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Сања Ђекић
Број индекса	ДХ01/2016
Студијски програм	Хемија
Наслов рада	Razvoj i primena HILIC MS/MS metode za određivanje akrilamida u odabranim uzorcima hrane sa procenom rizika po ljudsko zdravlje
Ментор	др Рада Баошић

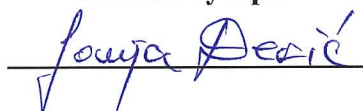
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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, 14.08.2025.

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

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

Razvoj i primena HILIC MS/MS metode za određivanje akrilamida u odabranim uzorcima hrane sa procenom rizika po ljudsko zdravlje

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

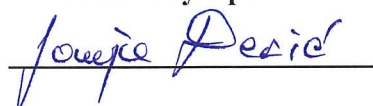
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 14.08.2025.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.