



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

**GASNOHROMATOGRAFSKO
ODREĐIVANJE AKRILAMIDA U
INDUSTRIJSKIM PREHRAMBENIM
PROIZVODIMA OD BRAŠNA**

“MASTER RAD”

Mentor:
prof. dr Milica Balaban

Student:
Gordana Petrović, prof. hemije

Banja Luka, 2020



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET BANJA LUKA

**GASNOHROMATOGRAFSKO
ODREĐIVANJE AKRILAMIDA U
INDUSTRIJSKIM PREHRAMBENIM
PROIZVODIMA OD BRAŠNA**

“MASTER RAD”

Mentor:
prof. dr Milica Balaban

Student:
Gordana Petrović, prof. hemije

Banja Luka, 2020



UNIVERSITY OF BANJA LUKA



FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN INDUSTRIAL FLOUR-BASED FOOD PRODUCTS USING GAS- CHROMATOGRAPHY

“MASTER DISSERTATION”

Mentor:

Dr. Milica Balaban

Associate Professor

Student:

Gordana Petrović

BSc in Chemistry

Banja Luka, 2020

Mentor:

Dr Milica Balaban, vanredni profesor

Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet

GASNOHROMATOGRAFSKO ODREĐIVANJE AKRILAMIDA U INDUSTRIJSKIM PREHRAMBENIM PROIZVODIMA OD BRAŠNA

Rezime

Akrilamid (2-propenamid) je toksično i potencijalno karcinogeno jedinjenje po čovjeka do čijeg formiranja dolazi termičkim tretmanom namirnica sa visokim sadržajem ugljenih hidrata. Glavni mehanizam formiranja akrilamida je *Maillardova* reakcija između redukujućih šećera i aminokiseline asparagina na temperaturama većim od 120 °C.

Među prehrambenim proizvodima sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, najveći izvor akrilamida su pomfrit, čips, tost hljeb, kao i razne vrste keksa i biskvita. U radu je analiziran keks u kome je tokom industrijske pripreme kao pekarski agens korišten amonijum-hidrogenkarbonat. Upotreba amonijum-hidrogenkarbonata kao pekarskog agensa u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna može povećati nivo akrilamida i do 60%.

U radu je izvršeno ispitivanje uzoraka gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom (GC-MS) metodom. U prvom dijelu eksperimentalnog dijela rada predložena je priprema uzroka bez prethodne derivatizacije. Akrilamid je detektovan kao 2-propenamid sa retencionim vremenom 4,56 min, a glavni fragmentacioni joni za identifikaciju 2-propenamida imali su su m/z vrijednosti 55 i 71. U drugom dijelu rada predložena je metoda derivatizacije bromovanjem dvostruke veze akrilamida u cilju dobijanja manje polarnog jedinjenja veće molekulske mase. Akrilamid je detektovan kao 2-brompropenamid sa retencionim vremenom 6,55 min. Glavni fragmentacioni joni za detekciju 2-brompropenamida imali su vrijednosti 149 i 70. U oba slučaja urađene su dvije paralelne ekstrakcije sa dva uzorka. U jedan uzorak je dodato 10 µg akrilamida (tzv. *spike*) kako bi se utvrdila efikasnost primjenjenih metoda ekstrakcije.

Ključne riječi: akrilamid, termički tretman namirnica, industrijski prehrambeni proizvodi od brašna, GC-MS analiza, derivatizacija

Naučna oblast: PRIRODNE NAUKE

Naučno polje: HEMIJA

Klasifikaciona oznaka za datu naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: P 003

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo-nekomercijalno (CC-BY-NC)

Mentor:

Dr. Milica Balaban, Associate Professor

University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics

DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN INDUSTRIAL FLOUR-BASED FOOD PRODUCTS USING GAS-CHROMATOGRAPHY

Abstract

Acrylamide (2-propenamide) is toxic and potentially human carcinogenic compound formed in heat-treated food products with high amount of carbohydrates. The main mechanism of acrylamide formation is Maillard reaction between reducing sugars and amino acid asparagine at the temperatures higher than 120 °C.

Among the food products with high levels of carbohydrates, the main source of acrylamide are potato products, toasted bread as well as different types of biscuits. In this paper were analyzed biscuits in which ammonium hydrogen carbonate was used as a baking agent. Adding ammonium hydrogen carbonate to industrial flour-based food products can increase acrylamide levels up to 60%.

Biscuit samples were analyzed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry method (GC-MS). The samples were first analyzed without previous derivatization. Acrylamide was detected as 2-propenamide with retention time 4.56 min. Main fragmentation ions for detection of 2-propenamide were m/z 55 and 71. Extraction with additional derivatization of the acrylamide in samples was also preformed, in order to get less polar compound with higher molar mass. The derivatization was performed by bromination reaction of double bond of acrylamide. Acrylamide was detected as 2-brompropenamide with retention time 6.55. Main fragmentation ions for detection of 2-brompropenamide were m/z 149 and 70.

Two parallel extractions were performed. In one sample was added 10 µg of acrylamide (*spiked sample*) in order to determine the effectiveness of the methods used.

Key words: acrylamide, thermal treatment of the food, industrial flour-made products, GC-MS, derivatization

Scientific Field: NATURAL SCIENCES

Field of Academic Expertise: CHEMISTRY

CERIF: P 003

The type of Creative Commons licence: CC-BY-NC

Zahvaljujem se svima koji su mi pružili bezrezervnu podršku prilikom izrade ovog rada.

Mentoru dr Milici Balaban, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci zahvaljujem na nesebičnoj podršci, susretljivosti i savjetima tokom izrade ovog rada. Zahvalnost dugujem i dr Mališi Antiću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na korisnim sugestijama prilikom izrade rada.

Najveću zahvalnosti za bezgraničnu podršku tokom studiranja i izrade rada dugujem roditeljima i prijateljima. Iskreno vam hvala.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Hemija akrilamida	3
2.2. Toksikologija akrilamida	5
2.3. Mehanizmi formiranja akrilamida u namirnicama	6
2.4. Akrilamid u namirnicama	9
2.5. Akrilamid u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna	10
2.6. Faktori koji utiču na formiranje akrilamida u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna	12
2.6.1. Asparagin	12
2.6.2. Ugljeni hidrati	12
2.6.3. Pekarski agensi	13
2.6.4. Masti i ulja	13
2.7. Zakonska regulativa	14
2.8. Pregled analitičkih metoda određivanja akrilamida	16
2.9. Gasnohromatografsko određivanje (GC) akrilamida u prehrambenim proizvodima	18
2.9.1. Gasni hromatograf	19
2.9.2. Priprema uzorka i ekstrakcija	22
3. Eksperimentalni dio	26
3.1. Priprema uzorka i GC-MS analiza akrilamida	26
3.1.1. Aparatura i reagensi	26
3.1.2. Postupak pripreme uzorka	27
3.1.3. GC-MS analiza	27
3.2. Priprema uzorka i GC-MS analiza bromovanog uzorka	28
3.2.1. Postupak pripreme uzorka	28
3.2.2.1. Bromovanje uzorka	28
4. Rezultati analize i diskusija	29
4.1. Analiza akrilamida	29
4.2. Analiza derivatizovanih uzoraka	34
5. Zaključak	38
6. Literatura	40

1. Uvod

Prisustvo akrilamida u namirnicama potvrđeno je 2002. godine od strane grupe istraživača Švedske nacionalne administracije za hranu – SNFA (*Swedish National Food Administration*) i Univerziteta u Štokholmu. Istraživanje je prvobitno sprovedeno kako bi se utvrdilo porijeklo akrilamida u krvi radnika na izgradnji tunela u Švedskoj koji nisu bili profesionalno izloženi akrilamidu, što je dovelo do pretpostavke da bi hrana koju su radnici konzumirali mogla sadržavati akrilamid u sebi.

Navedena pretpostavka dovela je do otkrića da do formiranja akrilamida dolazi tretiranjem namirnica sa visokim sadržajem ugljenih hidrata na visokim temperaturama. Akrilamid nije pronađen u sirovim namirnicama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, već je ustanovljeno da isključivo termičkim tretmanom poput prženja, pečenja i tostiranja dolazi do njegovog formiranja (Tareke, 2002).

Otkriće akrilamida u namirnicama podstaklo je dalja istraživanja budući da je akrilamid klasifikovan kao potencijalni humani karcinogen od strane međunarodne Agencije za istraživanje karcinoma (eng. *International Agency for Research on Cancer, IARC*). Nakon izvještaja SNFA pokrenut je veliki broj istraživačkih aktivnosti o mehanizmu nastanka akrilamida, efektima pripreme namirnica i ostalih faktora koji utiču na sintezu akrilamida u raznim vrstama namirnica.

Do formiranja akrilamida dolazi u industrijskim proizvodima, kao i u namirnicama pripremljenim u domaćinstvu. Tokom proizvodnje ili pripreme namirnica Maillardova reakcija predstavlja jedan od glavnih mehanizama nastajanja akrilamida. Po Maillardovoj reakciji, do formiranja akrilamida u termički tretiranim namirnicama dolazi usljed reakcije aminokiselina i redukujućih šećera na temperaturama višim od 120 °C (Stadler i sar., 2002). Glavna aminokiselina koja učestvuje u Maillardovoj reakciji i daje najveće prinose akrilamida je asparagin.

Akrlamid je prisutan u velikom broju namirnica koje se svakodnevno konzumiraju, a među različitim vrstama prehrambenih proizvoda u kojima se nalazi akrilamid, u najčešće konzumirane spadaju proizvodi od žitarica, proizvodi od krompira, kafa, kao i razne vrste keksa i biskvita. U radu su ispitivani uzorci keksa na prisustvo akrilamida proizvedeni u Bosni i Hercegovini. Prilikom industrijske proizvodnje uzoraka keksa, kao pekarski agens korišten je amonijum-hidrogenkarbonat.

Upotreba amonijum-hidrogenkarbonata kao pekarskog agensa u industrijskim proizvodima od brašna može značajno povećati nivo akrilamida (Amrein, 2004). Prema preporukama Evropske Komisije indikativne vrijednosti za akrilamid u keksu i biskvitima u 2013. godini iznosile su 500 µg/kg, dok je u 2017. godini ova vrijednost redukovana na 350 µg/kg. Indikativne vrijednosti ne čine nužno sigurnosni prag, već ukazuju na potrebu za redukovanjem nivoa akrilamida u hrani kontrolisanjem procesa proizvodnje i ublažavanjem faktora koji utiču na njegovo formiranje.

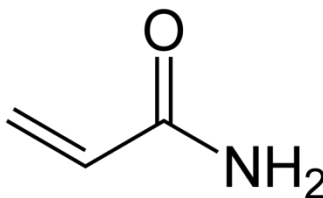
Za određivanje akrilamida u namirnicama gdje je prisutan u niskim koncentracijama preporučuju se metode hromatografije sa detektorima odgovarajuće osjetljivosti. U radu je analiziran keks gasnohromatografskom-masenospektrometrijskom metodom (GC-MS). Priprema uzoraka za analizu podrazumijevala je derivatizaciju, odnosno bromovanje dvostruke veze akrilamida u cilju dobijanja napolarnijeg jedinjenja veće molekulske mase. Bromovani akrilamid, 2-brompropenamid identifikovan je na osnovu karakterističnih m/z vrijednosti.

2. Teorijski dio

2.1. Hemija akrilamida

Akrilamid (2-propenamid) je organsko jedinjenje, kristalne strukture bijele boje. Karakteriše ga mala molekulska masa (71,08 g/mol), visoka temperatura topljenja (84-85 °C) te odlična rastvorljivost u vodi (216 g / 100 g vode na 30 °C).

Akrilamid posjeduje dvije funkcionalne grupe, amidnu grupu i reaktivnu elektron-deficitarnu dvostruku vezu. Za elektron deficitarnu grupu karakteristične su nukleofilne reakcije adicije sa amonijakom, aminima, bisulfitima, hlorom, bromom i fosforom. Amidna grupa akrilamida podliježe reakcijama hidrolize, dehidratacije i kondenzacije sa aldehydima (Habermann, 2002).



Slika 1. Hemijska struktura molekule akrilamida

(preuzeto sa <https://en.wikipedia.org/wiki/Acrylamide>)

Stabilnost akrilamida i njegova reaktivnost sa različitim nukleofilima porijeklom iz namirnica proučavana su od strane Adamsa i saradnika (2010). Dobijeni rezultati istraživanja pokazuju da je akrilamid stabilan u vodenim rastvorima. Vrsta pufera i pH vrijednosti imaju značajan uticaj na smanjenje nivoa slobodnog akrilamida. Na nivo slobodnog akrilamida značajno utiču i amino-kiseline sa nukleofilnim bočnim lancem poput cistenina, arginina, serina i lizina. Najveća reaktivnost slobodnog akrilamida zapažena je kod cisteina, pri čemu kao proizvod adicije nastaje monoadicioni proizvod cistein-S-propanamid.

Akrilamid se komercijalno upotrebljava za sintezu poliakrilamida. Polimerizovani akrilamid ima široku upotrebu u tretmanu otpadnih voda, kozmetici, papirnoj i tekstilnoj industriji, te za laboratorijsko dobijanje gelova za elektroforezu. Akrilamid se koristi u istraživačkom radu pri selektivnoj modifikaciji SH grupa proteina i florescentnim određivanjima triptofanskih ostataka u proteinima (Mottram, 2008).

Rastvorljivost akrilamida u različitim rastvaračima značajno varira. Dobro se rastvara u polarnim rastvaračima, a najveću rastvorljivost ima u vodi (Tabela 1).

Tabela 1. Rastvorljivost akrilamida u različitim rastvaračima (Habermann, 2000)

Rastvarač	g/100 mL na 30 °C
Voda	215,5
Metanol	155
Dimetilsulfoksid	124
Dimetilformamid	119
Etanol	86,2
Aceton	63,1
Piridin	61,9
Acetonitril	39,6
Etilen glikol monobutil eter	31
Dioksan	30
Etil-acetat	12,6
Hloroform	2,66
1,2-Dihloretnan	1,50
Benzen	0,35
Ugljen-tetrahlorid	0,039
<i>n</i> -Heptan	0,0068

2.2. Toksikologija akrilamida

Akrilamid je jedinjenje sa potencijalom da izazove niz toksičnih efekata. U toksična dejstva akrilamida spadaju neurotoksičnost, genotoksičnost, reproduktivna toksičnost kao i potencijalno karcinogena svojstva (IARC, 1994). Polimeri akrilamida pokazuju slabo toksične osobine.

Pomoću citohroma P450 akrilamid se transformiše u svoj toksični metabolit glicidamid koji ispoljava genotoksična dejstva u organizmu. Akrilamid i glicidamid podliježu reakcijama nukleofilne adicije sa amino- ili sulfhidrilnom (-SH) grupom proteina. U odnosu na glicidamid, akrilamid pokazuje relativno veću reaktivnost sa SH grupom proteina i nisku reaktivnost sa DNK, dok glicidamid formira adukte sa amino-grupom iz DNK (Törnqvist, 2005). Sam akrilamid ne ispoljava mutagena dejstva u biološki značajnim koncentracijama, dok njegov metabolit pokazuje pozitivne rezultate na mutagenost (Lineback, 2012).

Neurotoksični efekti akrilamida su najopsežnije ispitivani budući da su neurotoksični efekti akrilamida zapaženi i kod laboratorijskih životinja, kao i kod ljudi koji su profesionalno bili izloženi akrilamidu (LoPachin, 2004).

U ogledima sprovedenim na eksperimentalnim životinjama, akrilamid dovodi do reakcije razmjene adenina sa guaninom i guanina sa citozinom u molekuli DNK, dovodeći do malignih oboljenja štitne žlijezde, testisa, pluća i mozga životinja. Karcinogeni efekti akrilamida dokazani na eksperimentalnim životinjama za sada nisu dokazani na epidemiološkim studijama kod ljudi. Uprkos tome, akrilamid je ostao na listi potencijalnih humanih karcinogena formiranoj od strane Međunarodne agencije za istraživanje karcinoma (Delević, 2015).

S obzirom na potencijalne karcinogene učinke akrilamida, izloženost akrilamidu putem hrane zabrinjavajuća je za sve starosne grupe, ali su djeca zbog svoje male tjelesne mase naizloženi grupa. Zbog neurotoksičnih i potencijalno karcinogenih svojstava, nivo akrilamida u hrani je potrebno svesti na što manju moguću mjeru.

2.3. Mehanizmi formiranja akrilamida u namirnicama

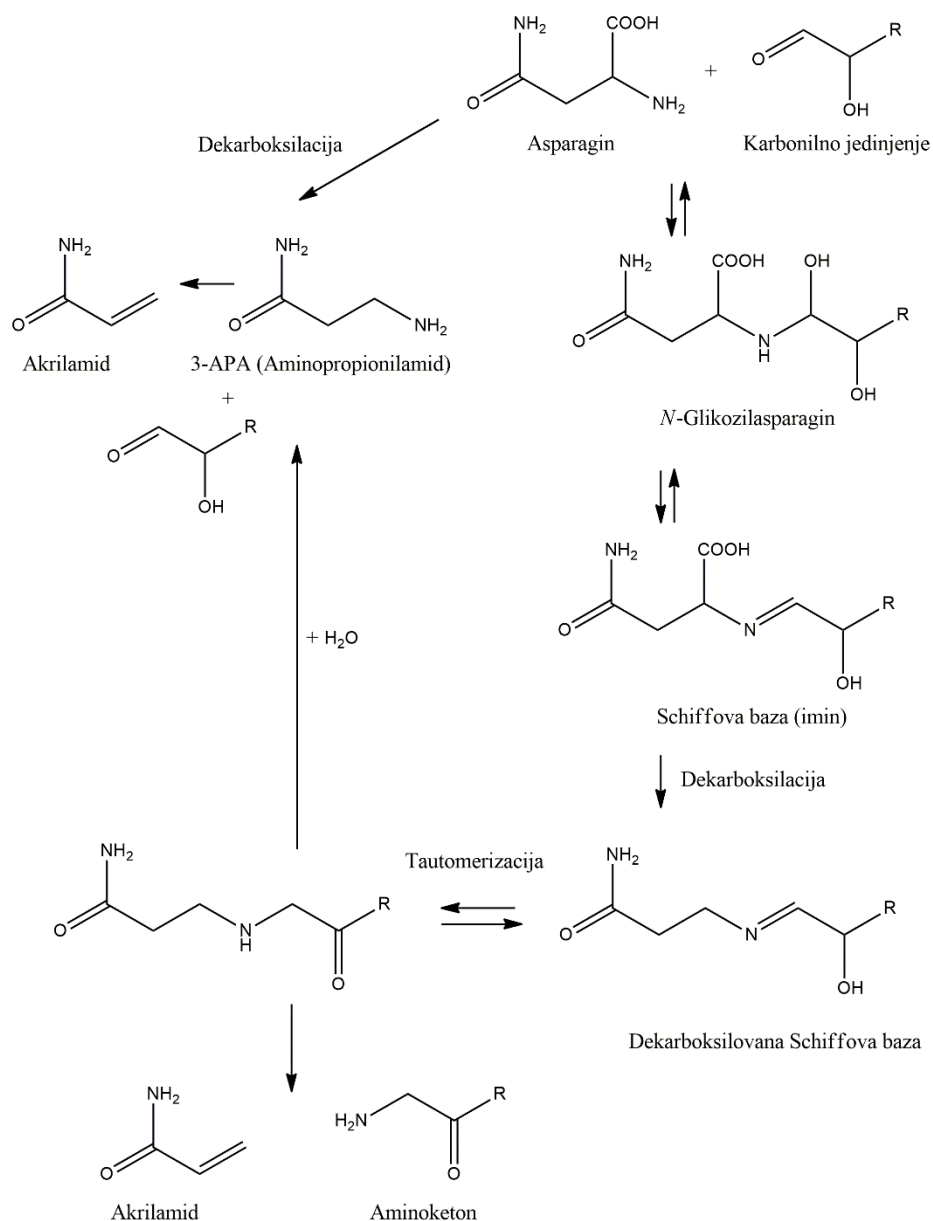
Nakon što je otkriveno prisustvo akrilamida u termički tretiranim namirnicama, urađene su opsežne studije kako bi se odredili glavni prekursori reakcije i razjasnio njen mehanizam. Prvi pretpostavljeni mehanizam formiranja akrilamida je Maillardova reakcija, u kojoj ključnu ulogu ima aminokiselina asparagin (Stadler i sar., 2002). Iako temperaturno indukovane reakcije dekarboksilacije i deaminacije samog asparagina mogu dovesti do formiranja akrilamida, određene studije sugerišu da prisustvo redukujućih šećera ima ključnu ulogu u prevođenju asparagina u akrilamid (Yayalayan, 2003).

Prvi publikovani radovi o mehanizmima formiranja akrilamida dekarboksilacijom asparagina pod uticajem redukujućih šećera imali su različite pretpostavke. Prema Mottramu i saradnicima (2002) oksidativna dekarboksilacija odnosno Streckerova degradacija je ključni korak u formiranju akrilamida. Ipak, na ovaj način ne dolazi samo do dekarboksilacije asparagina, nego istovremeno dolazi do oksidacije i nastanka Streckerovog aldehida koji je dalje potrebno redukovati i dehidrovati kako bi došlo do formiranja akrilamida (Yayalayan i Stadler, 2005).

Predloženi mehanizam Stadlera i saradnika pretpostavlja da je inicijalni proizvod nastao reakcijom asparagina i redukujućih šećera *N*-glikozid direktni prekursor akrilamida koji dovodi do stvaranja akrilamida u visokim koncentracijama. Prvi detaljni mehanizam nastanka akrilamida iz *N*-glikozilasparagina predložili su Yayalayan i saradnici (2005). Predloženi mehanizam se zasniva na sposobnosti imina formiranih reakcijom aminokiseline i aldehida da podliježu intramolekularnoj ciklizaciji. Reakcije intramolekulske ciklizacije i dekarboksilacije dalje dovode do Amadori premještanja i proizvoda koji generiše akrilamid na visokim temperaturama (Yayalayan i Stadler, 2005).

Suprotno tome u Zyzak i saradnici (2003) su potvrdili da dekarboksilacija nije ključni korak u procesu formiranja akrilamida. Navedena studija pretpostavlja da do formiranja akrilamida dolazi reakcijom između karbonilne grupe Šifove baze i asparagina, na visokim

temperaturama pri čemu dokazi do nastanka 3-amniopropionamida koji se dalje razlaže na amonijak i akrilamid.

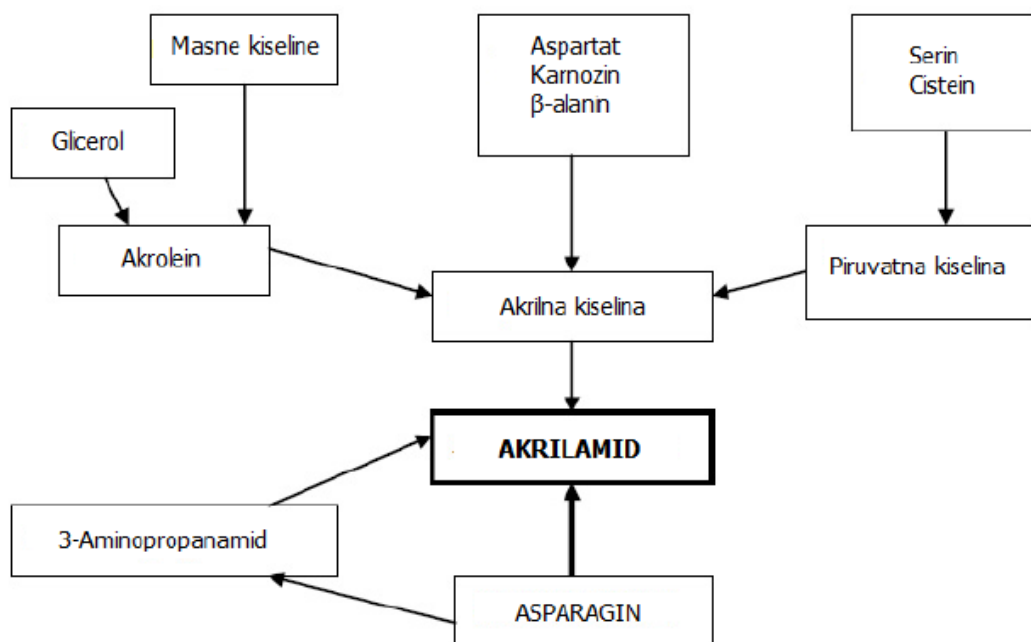


Slika 2. Mogući načini formiranja akrilamida (Delević, 2015)

Mehanizam nastajanja akrilamida putem akroleina u namirnicama bogatim lipidima, predložen je od strane Yashura i saradnika (2003). Prema predloženom mehanizmu, visoke koncentracije akrilamida se stvaraju reakcijom amonijaka i akroleina na temperaturama višim od 180 °C. Akrolein nastaje degradacijom lipida (triacilglicerola), dok se amonijak stvara

Streckerovom degradacijom ili deaminacijom aminokiselina. Oksidacijom akroleina nastaje akrilna kiselina koja dalje reaguje sa amonijakom i formira akrilamid (Yashuara, 2003).

Iako reakcije između aminokiselina i redukujućih šećera predstavljaju dominantnu hemijsku reakciju nastanka akrilamida, predloženi su mnogi alternativni putevi formiranja akrilamida prikazani na Slici 3. Još uvijek nije moguće istaknuti određen hemijski mehanizam kao tačan, te se za sada samo mogu pretpostaviti određeni putevi koji uključuju reakcije između ugljenih hidrata, aminokiselina, lipida i ostalih gradivnih komponenti namirnica.



Slika 3. Osnovni putevi formiranja akrilamida (Eriksson, 2005)

2.4. Akrilamid u namirnicama

Akrilamid je prisutan u različitim vrstama prehrambenih proizvoda, kao što su proizvodi od žitarica, proizvodi od krompira, kafa i dr. Najveće koncentracije akrilamida pronađene su u pomfritu, čipsu, hljebu, pecivima i kafi. Sadržaj namirnica u različitim grupama namirnica prikazan je u tabeli 2.

Tabela 2. Sadržaj akrilamida u različitim grupama namirnica (EFSA Journal, 2012)

Vrsta namirnice	Broj uzoraka	Srednja vrijednost konc. AA (µg/kg)	CV%
Žitarice i proizvodi od žitarica	11327	366	151
Hljeb i peciva	5145	446	130
Keks	4980	350	162
Žitarice za doručak	1130	96	131
Pica	85	33	270
Riba i morski plodovi	107	25	180
Meso i iznutrice	325	19	174
Mijeko i mliječni proizvodi	147	5,8	119
Koštunjavo voće i sjemenke	203	84	233
Proizvodi od krompira	10077	477	108
Pečeni krompir	99	169	150
Krompirov čips	3555	752	73
Pomfrit	6309	334	128
Kafa i čaj	1455	509	120
Kafa (kuvana)	93	13	100
Kafa (sirova,pečena)	709	288	51
Kafa bez kofeina	34	688	169
Ekstrakti kafe	119	1100	93
Zamjena za kafu	368	845	90
Zeleni čaj (pečen)	101	306	69
Kakao proizvodi	23	220	111
Šećer i med	113	24	87
Povrće	193	17	206
Prerađeno i sušeno voće	49	131	125
Alkoholna pića	99	6,6	147
Infant formula	117	<5	82
Hrana za bebe (u prahu)	24	16	73
Hrana za bebe (keks)	32	181	106

2.5. Akrilamid u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna

U industrijske prehrambene proizvode od brašna spadaju svi proizvodi na bazi brašna podvrgnuti procesu pečenja kao što je hljeb i pekarski proizvodi, keks, biskviti, krekeri, vafli i slični proizvodi koji se međusobno razlikuju u sastavu i načinu proizvodnje (Mesias i Morales, 2016).

Visoke temperature pripreme namirnica pri uslovima smanjenje vlažnosti pokreću niz hemijskih reakcija između sastojaka, što za posljedicu ima formiranje različitih hemijskih jedinjenja u gotovom proizvodu. Ovakav način pripreme utiče na poboljšanje teksture i organoleptičkih osobina gotovog proizvoda ali i na formiranje toksičnih jedinjenja poput akrilamida (Mesias i Morales, 2016).

Prehrambeni proizvodi na bazi brašna se svakodnevno konzumiraju, posebno od strane djece i adolescenata. Zastupljenost akrilamida u širokom spektru svakodnevno konzumiranih namirnica smatra se zabrinjavajućim, zbog čega je potrebno eliminisati što više faktora koji utiču na njegovo formiranje, kako prilikom industrijske proizvodnje, tako i prilikom pripreme namirnica u domaćinstvu.

Zbog svojih toksičnih i potencijalno karcinogenih osobina, određivanje koncentracija akrilamida u namirnicama i njegova zastupljenost u namirnicama postali su predmet intenzivnog istraživanja tokom poslednjih godina (Murkovic, 2004; Razia, 2016; Negoita, 2016).

U Tabeli 2 prikazane su koncentracije akrilamida u različitim vrstama prehrambenih proizvoda od brašna.

Prema podacima EFSA (engl. *European Food Safety Authority*) industrijski prehrambeni proizvodi od brašna doprinose 20-60% ukupnom dnevnom unosu akrilamida, što podrazumijeva 0,13-0,31 µg/kg tjelesne mase kod odraslih i 0,55-0,75µg/kg kod djece i adolescenata (EFSA, 2012).

Tabela 3. Podaci o sadržaju akrilamida u proizvodima od brašna na osnovu izvještaja navedenih u literaturi (Mesias, Morales, 2016)

Vrsta namirnice	Akrilamid (µg/kg)
Hljeb	5-16 4-90 <10-152 27-36 35-110 <30-160
Hrskavi hljeb	<30-430 <65-1480 65-1271 152-1546 422-908 <30-151
Keks od đumbira	260-1410 108-1697 196-280
Tost hljeb	<30-1430 <10-107 16-154
Biskviti	<30-700 20-1514 <10-1060 <68-1150 47-370 104 <30-2085 697
Keks	400 40-350 42-250
Krekeri	80-420 566-2017 197-328 15-1040 <30-296 39-510
Kolači i deserti	12 26 20-200 48-672

Nivo akrilamida u proizvodima od brašna može značajno oscilirati. Koncentracija akrilamida u određenom proizvodu najviše zavisi od hemijskog sastava proizvoda i uslova termičkog tretmana.

2.6. Faktori koji utiču na formiranje akrilamida u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna

U industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna, pretpostavljeni mehanizam formiranja akrilamida je Maillardova reakcija redukujućih šećera i aminokiselina pri visokim temperaturama. Tokom mnogih procesa pripreme namirnica, Maillardova reakcija je dominantan hemijski proces koji formira boju, ukus i teksturu namirnice. Iako je kombinacija temperature, vlažnosti i vremena zagrijavanja od ključnog značaja kada je u pitanju formiranje akrilamida, postoje mnogi drugi faktori koji mogu značajno uticati na koncentraciju akrilamida u proizvodu (Meisas i Morales, 2016).

2.6.1. Asparagin

Asparagin se smatra glavnim prekursorom u reakciji formiranja akrilamida u hrani. U prehrambenim proizvodima glavni izvor slobodnog asparagina je brašno. Snižavanjem nivoa slobodnog asparagina postižu se značajno niže koncentracije akrilamida. Jedna od predloženih metoda snižavanja sadržaja asparagina u brašnu je dodavanje enzima asparaginaze. Asparaginaza prevodi asparagin u asparaginsku kiselinu, te se na taj način snižava njegov sadržaj u brašnu i onemogućava njegovu dalju redukciju do akrilamida (Whitehurst i Oort, 2010). Divalentni metalni joni (Ca^{2+} , Mg^{2+}) su takođe efikasni u vezivanju slobodnog asparagina tako što sa asparaginom ili drugim aminokiselinama grade kompleksna jedinjenja (Levine, 2009).

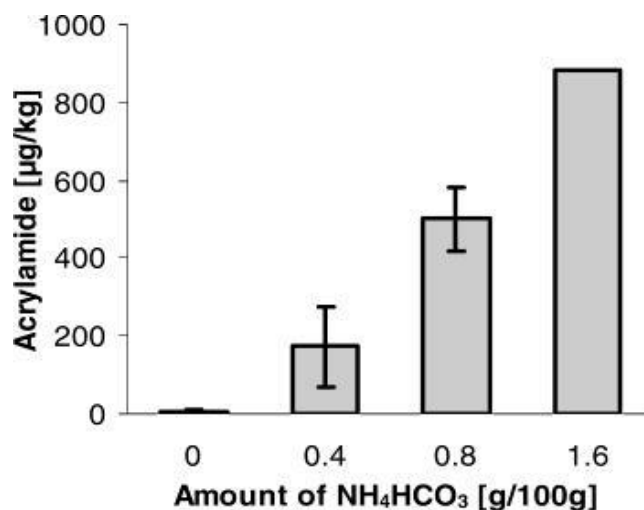
2.6.2. Ugljeni hidrati

Kao što je već navedeno, redukujući šećeri su zajedno sa asparaginom glavni prekursori u Maillardovoj reakciji. Uticaj glukoze, fruktoze i saharoze na formiranje akrilamida u biksvitima ispitivani su od strane Hamleta i saradnika (2007). Rezultati pokazuju da dodatkom 1% fruktoze u tijesto povećava nivo akrilamida za 20% u poređenju sa glukozom i saharozom. Dodatkom neredukujućeg šećera saharoze umjesto invertnih šećera prilikom proizvodnje rezultuje 70% nižim koncentracijama akrilamida u proizvodu. Upoređivanjem uticaja različitih šećera na formiranje akrilamida pronađeno je da fruktoza daje veće prinose akrilamida u odnosu na glukozu, dok saharoza daje slične rezultate kao i fruktoza što se može objasniti hidrolizom saharoze tokom termičkog tretmana (Mesias i Morales, 2016).

2.6.3. Pekarski agensi

Pekarski agensi su supstance koje se dodaju u tijesto prilikom pripreme proizvoda u cilju povećanja volumena, poboljšanja oblika i teksture proizvoda. U najčešće korištene pekarske agense u industriji spadaju natrijum-hidrogenkarbonat, NaHCO_3 i amonijum-hidrogenkarbonat NH_4HCO_3 . Industrijski prehrambeni proizvodi u kojima se kao pekarski agens koristi amonijum-hidrogenkarbonat mogu sadržavati visoke koncentracije akrilamida.

Uticaj amonijum-hidrogenkarbonata na formiranje akrilamida objašnjava se formiranjem karbonilnih jedinjenja reakcijom između amonijaka i redukujućih šećera. Nastala karbonilna jedinjenja poput glioksala i metilglioksala stupaju brže u reakciju sa aminokiselinama u odnosu na redukujuće šećere (Amrein, 2006). Upotrebom natrijum-hidrogenkarbonata kao pekarskog agensa, moguće je smanjiti nivo akrilamida i do 60% , u odnosu na amonijum-hidrogenkarbonat. (Amrein, 2004).



Slika 4. Koncentracije akrilamida nastale dodavanjem amonijum-hidrogenkarbonata (Amrein, 2004)

2.6.4. Masti i ulja

Kao što je već navedeno, termički tretman namirnica, poput prženja ili pečenja na visokim temperaturama generiše visoke koncentracije akrilamida Maillardovom reakcijom.

Naknadne studije bazirale su se na uticaj ulja na formiranje akrilamida kao i uticaj različitih vrsta ulja na proces formiranja akrilamida.

Određene studije pokazuju da lipidna oksidacija pokreće proces formiranja akrilamida u termički tretiranim namirnicama. Uticaj ulja na formiranje akrilamida postaje evidentniji uklanjanjem šećera iz matriksa, tako da lipidi postaju glavni izvor karbonilnih jedinjenja. Prema datoj studiji, suncokretovo ulje generiše veće količine akrilamida u poređenju sa palminim uljem (Capuano, 2010). Studije Arribas-Lorenza i saradnika (2009) su takođe podržale hipotezu da sekundarna lipidna oksidacija utiče na formiranje akrilamida u namirnicama te da maslinovo ulje generiše značajne koncentracije akrilamida.

Suprotno tome, u određenim studijama koje su ispitivale uticaj različitih vrsta ulja na formiranje akrilamida, pokazano je da upotreba različitih ulja nema uticaja na formiranje akrilamida pri termičkom tretmanu namirnica (Mestdagh, 2005).

2.7. Zakonska regulativa

Prema preporuci Evropske komisije 2010/307/EU države članice EU dužne su da prate nivoe akrilamida u određenim namirnicama te da godišnje dostavljaju podatke EFSA-i (Eng. *European Food Safety Authority*). Praćenje nivoa akrilamida vrši se kod namirnica koje poznato sadrže visoke nivoe akrilamida i/ili kod namirnica koje imaju značajan udio u ljudskoj ishrani (EFSA, 2015).

Na osnovu praćenja nivoa akrilamida, Evropska komisija odredila je takozvane indikativne vrijednosti za akrilamid u određenim namirnicama. Indikativne vrijednosti za akrilamid prema preporuci Evropske komisije 2017/215 prikazane su u Tabeli 4. Prema preporukama, indikativne vrijednosti ne čine na sigurnosni prag, već upućuju na dalja ispitivanja. Dalja istraživanja se svode na ispitivanja procesa proizvodnje kao i istraživanje mogućih načina snižavanja koncentracije akrilamida u datoj namirnici.

Tabela 4. Indikativne vrijednosti za koncentraciju akrilamida prema preporuci Evropske komisije
(preuzeto sa: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=EN>)

Vrsta namirnice	Indikativna vrijednost (µg/kg)
Pomfrit	500
Krompirov čips Krekeri od krompira Ostali proizvodi od krompira	750
Hljeb -Hljeb od pšeničnog brašna -Hljebovi od ostalih tipova brašna	50 100
Žitarice za doručak -Proizvodi od mekinja i žitarica punog zrna -Proizvodi od pšenice i raži -Proizvodi od kukurza, ovasa, spelte, ječma i riže	300 300 150
Biskviti i vafli -Krekeri (sa izuzetkom krekeri na bazi krompira) -Hrskavi hljeb -Medenjaci -Ostali slični proizvodi iz ove kategorije	350 400 350 800 300
Kafa	400
Instant kafa	850
Zamjene za kafu -Zamjene za kafu na bazi žitarica -Zamjene za kafu od cikoriije	500 4 000
Keks namjenjen bebama i maloj djeci	150
Hrana na bazi žitarica za bebe i malu djecu	40

Poređenjem koncentracija akrilamida u Tabeli 3 i Tabeli 4 primjećuje se da je kod određenih namirnica koncentracija akrilamida premašila indikativne vrijednosti. Izvještaj EFSA nakon praćenja nivoa akrilamida u periodu od 2007-2010. navodi kako se nivoi akrilamida u namirnicama tokom godina smanjuju sa izuzetkom biskvita, keksa i hrskavog hljeba čije su koncentracije premašile indikativne vrijednosti i do 12% (EFSA, 2012). Navedeni podaci ukazuju na potrebu za ublažavanjem faktora koji mogu uticati na formiranje akrilamida u ovakvim namirnicama. U Bosni i Hercegovini akrilamid do sada nije obuhvaćen ni jednim zakonskim aktom. Kapaciteti laboratorija u smislu obavljanja analiza na prisustvo akrilamida u hrani prikazani su u Tabeli 6.

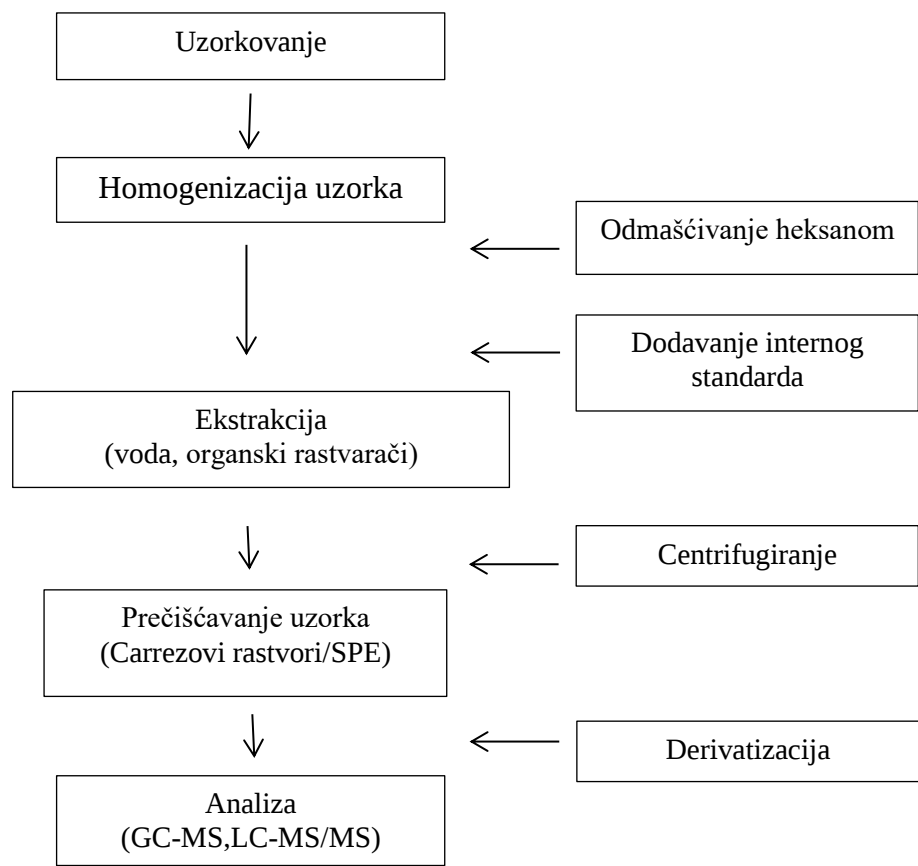
Tabela 5. Kapaciteti laboratorija u smislu obavljanja analiza na akrilamid u hrani (Izvještaj sastanka na temu „Akrilamid u hrani – rizici i preporuke, Agencija za sigurnost hrane BiH, 2017)

Laboratorija	Obavlja analize DA/NE	Metoda	Akreditovana metoda
Federalni institut za javno zdravstvo	DA	Interna metoda (GC-MS)	U procesu akreditacije
Zavod za javno zdravstvo, Bihać	NE		
Institut za javno zdravlje i sigurnost hrane, Zenica	NE		
Kantonalna veterinarska stanica, Sarajevo	NE		
Veterinarski zavod, Tuzla	NE		
Zavod za javno zdravstvo Kantona Sarajevo	NE		
Zavod za javno zdravstvo Tuzlanskog kantona	NE		
Veterinarski zavod „TEOLAB“	NE		
Institut za javno zdravstvo Republike Srpske	NE		
Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“	NE		

2.8. Pregled analitičkih metoda određivanja akrilamida

Mala molekulska masa, nedostatak hromofora i visoka reaktivnost predstavljaju glavne izazove pri analizi akrilamida u niskim koncentracijama u uzroku. Izbor optimalnih uslova ekstrakcije i prečišćavanja zavisi od matriksa uzorka koji se analizira. Voda i organski rastvarači kao što su *n*-propanol ili 2-butanon su poželjni rastvarači za ekstrakciju, uglavnom na sobnoj temperaturi (EFSA Journal, 2015). Zbog raznolikosti matriksa uzorka, predložene su brojne metode pripreme uzorka (Biedermann 2002) i kvantifikacije akrilamida. Šema 1 prikazuje glavne korake pri pripremi uzorka i analizi akrilamida.

U literaturi (Wenzl, 2010; Tateo i Bononi 2003) postoji veliki broj predloženih metoda za kvantitativno određivanje akrilamida. Gasno-hromatografija (GC) sa masenim spektrometrom kao detektorom, kao i tečna-hromatografija u sprezi sa tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) predlažu se kao precizne i tačne metode pri kvantifikaciji akrilamida. GC-MS i LC-MS/MS analize se izvode sa ili bez predhodne derivatizacije akrilamida.



Šema 1. Glavni koraci pripreme uzorka i analize akrilamida i njihove varijacije (Gökmen, 2015)

Kao pouzdana alternativa GC-MS i LC-MS/MS analizama predložena je HPLC-DAD (*High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*) metoda (Michalak, 2013; Can, 2014) kao i UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography* metoda (Zhang, 2006). Zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti kao i brzine analize HPLC-DAD i UPLC-MS/MS se predlažu kao prihvatljivije metode analize, jer ne zahtijevaju predhodnu derivatizaciju akrilamida u uzorku. Derivatizacijom akrilamida postiže se veća osjetljivost i tačnost metode, što se kompenzuje dužim trajanjem analize, jer je derivatizacija proces koji zahtijeva vrijeme. Kao alternativa GC-MS metodi, predložena je i GC metoda sa azotno-fosfornim detektorom (Kim, 2011) bez predhodne derivatizacije uzorka.

Analitička određivanja akrilamida se najčešće obavljaju pomoću gasne hromatografije u sa masenim spektrometrom kao detektorom (GC-MS) u SIM režimu (eng. *Single Ion Monitoring*). GC-MS analize imaju određene prednosti u istraživanjima, zbog svoje preciznosti i tačnosti, ali i dostupnosti instrumenata većini laboratorija.

Određeni autori predložili su metode određivanja akrilamida zasnovane na elektroforezi, kao što su kapilarna elektroforeza, CE (Galceran i sar, 2007), bezvodna kapilarna elektroforeza, NACE (Baskan, Erim, 2007) i elektroforeza kapilarne zone, CZE (Bermudo i sar, 2005).

Analitičke metode kao što su pirolitička gasna hromatografija-masena spektrometrija (Py-GC-MS) ili FTIR spektroskopija korištene su kako bi se objasnilo formiranje akrilamida u namirnicama, ali ne i za njegovu kvantifikaciju.

2.9. Gasnohromatografsko određivanje (GC) akrilamida u prehrambenim proizvodima

Gasna hromatografija ima široku primjenu u analizi hrane. Veliki broj GC metoda je standardizovan i rutinski se koristi prilikom analiza. Osjetljivost, brzina, tačnost i jednostavnost GC-MS analize prilikom separacije, identifikacije i kvantifikacije isparljivih jedinjenja doveli su do izuzetno brzog razvoja ove tehnike i njene široke upotrebe. Princip rada gasnohromatografskih analiza zasniva se na prolasku uzroka kroz kolonu gdje dolazi do njegovog razdvajanja na komponente. Komponente se u koloni razdvajaju na osnovu njihovih fizičkih i hemijskih osobina. Analit se identifikuje na osnovu retencionog vremena, odnosno vremena njegovog zadržavanja na stacionarnoj fazi kolone.

Glavne prednosti gasne hromatografije su:

- Visoka rezolucija: na kapilarnoj koloni dužine 50 m može se generisati 100 000 teorijskih podova i time razdvojiti složene smješe bolje nego bilo kojim drugim danas dostupnim tehnikama.
- Brzina: najveći broj GC analiza može se završiti u vremenu od 1 do 30 minuta. Jednostavnije analize se mogu završiti i kroz nekoliko sekundi.

- ### 2.9.1. Gasni hromatograf

Gas nosač

Regulator protoka

Injektor

Kolona

Termostatisirana komora

Detektor

Izlaz

Osnovi princip GC razdvajanja je distribucija analita između dvije faze. Jedna od faza je stacionarna faza, a druga faza je inertni gas. Inertni gas zajedno sa parama uzorka čini mobilnu fazu koja se kreće kroz kolonu i prolazi preko stacionarne faze. Nakon injektovanja uzorka, on ulazi u kolonu kao uska zona molekula. Na koloni se zona širi usljed interakcija komponenti sa stacionarnom fazom koja neke komponente zadržava duže od drugih. Komponente injektovanog uzorka se na kolonu unose u struji nosećeg inertnog gasa (mobilna faza) gdje dolaze do stacionarne faze te na različite načine intereaguju sa njom. Mobilna faza se konstatno kreće te tako obezbjeđuje bržu razmjenu molekula analita između mobilne i stacionarne faze. Na taj način se smanjuje mogućnost uspostavljanja ravnotežnih koncentracija analita između dvije faze. Kao posljedica toga, u prednjem dijelu zone u kojoj je para, molekuli prelaze u tečnu fazu dok u

zadnjem dijelu dolazi do suprotnog procesa – desorpcije. Jedinjenje se pomjera kroz kolonu brzinom koja najviše zavisi od njegove rastvorljivosti u tečnoj fazi. Slabije rastvorna jedinjenja provode kraće vrijeme u koloni od bolje rastvornih jedinjenja. Razdvajanje komponenti u gasnom hromatografu se dešava u zagrijanoj koloni u kojoj se nalazi stacionarna faza. Izbor temperature kolone zavisi od termičke stabilnosti njene tečne stacionarne faze kao i osobina jedinjenja koja se razdvajaju. Iz kolone, molekuli uzorka odlaze do odgovarajućeg detektora koji potom detektuje prisustvo i koncentraciju određenog jedinjenja koje se očitava kao odgovarajući pik (Antić i Antić, 2014).

2.9.1.1. Kolone u gasnoj hromatografiji

Razdvajanje komponenti vrši se u koloni koja sadrži stacionarnu fazu. Kolona se smatra „srcem“ hromatografskog sistema i smještena je u odgovarajuću peć čija temperatura može biti konstantna ili se linearno povećavati.

Postoje dvije vrste kolona, pakovane i kapilarne kolone. Kod pakovanih kolona stacionarna faza je deponovana ili hemijski vezana na poroznom nosaču, dok je kod kapilarnih kolona unutrašnji zid kolone obložen tankim slojem stacionarne faze. Stacionarna faza može biti i hemijski vezana za unutrašnji zid kolone.

Pakovane kolone se danas rijetko koriste, imaju prečnik (3,18 i 6,35 mm) i dugačke su između 1-3 m. Proizvode se od čelika ili stakla, a unutrašnji zid cijevi se tretira kako bi se izbjegli katalitički efekti sa uzorkom. Punjene su inertnim i stabilnim poroznim nosačem na kome stacionarna faza može biti impregnirana ili hemijski vezana. Najveći broj nosača se dobija od tzv. diatomajske zemlje ili kizelgura koji se većinskim dijelom sastoji iz mikroamornog hidratisanog silikata (sadrži oko 90% SiO_2). Ostatak čine metalni oksidi: Al_2O_3 , Fe_2O_3 , TiO_2 , CaO i MgO . Pakovane kolone se najčešće koriste za analizu gasova. Kolone pakovane poroznim polimerima najčešće se preporučuju za analizu vodenih rastvora polarnih organskih jedinjenja koja mogu da grade vodonične veze.

Kapilarna kolona se sastoji od cijevi i stacionarne faze. Unutrašnji zid malog prečnika (0,05 do 0,53 mm) obložen je tankim filmom (0,1 do 10 μm) termički stabilnog polimera velike

molekulske mase koji predstavlja stacionarnu fazu. Dužine kapilarnih kolona dosežu dužinu i do 120 m.

Kod pakovanih kolona tehnike impregnacije stacionarne faze su vrlo jednostavne, dok je kod kapilarnih kolona izbor stacionarne faze ograničen jer nanošenje filma na unutrašnju površinu kolone zahtjeva različit pristup od impregnacije. Najveći broj danas korištenih stacionarnih faza su polisiloksani i polietilenglikoli manje ili više hemijski modificirani. Svaka od ovih faza može da se koristi između minimalne temperature ispod koje se ravnotežna koncentracija sporo uspostavlja i maksimalne temperature iznad koje dolazi do degradacije polimera. Svaka stacionarna faza ima preporučeni opseg radnih temperatura. Ispod minimalne temperature, viskoznost faze je velika te je difuzija analita između faza otežana. Zagrijavanjem kolona one počinju da „cure“, tačnije dio faze se gubi iz kolone. Kolone sa polarnim stacionarnim fazama imaju tendenciju da cure više nego kolone sa nepolarnim stacionarnim fazama. Za dobro razdvajanje i uspješnu analizu neophodno je poznavanje fizičko-hemijskih osobina jedinjenja u smješi, kao i osobina tečnih stacionarnih faza u kolonama. (Antić i Antić, 2014)

2.9.1.2. Maseni spektrometar kao detektor u GC analizi

Detektor je direktno povezan sa izlazom kolone, tako da sve što je sa nje eluirano prolazi kroz njega. U gasnoj hromatografiji koriste se različiti detektori, od kojih su mnogi posebno razvijeni za gasnu hromatografiju. Kombinacija gasne hromatografije i masene spektrometrije predstavlja najmoćniju metodu za razdvajanje i kvalitativnu i kvantitativnu analizu isparljivih organskih jedinjenja.

GC-MS je najzastupljenija analitička tehnika za identifikaciju i kvantifikaciju organskih jedinjenja u složenim uzorcima. Gasni hromatograf razdvaja komponente smješe u vremenu, a maseni spektrometar pruža informacije koje pomažu u strukturnoj identifikaciji svake od komponenata. GC-MS može da obezbjedi kompletan maseni spektar ako je sadržaj analita u uzorku oko 1×10^{-10} g. Maseni spektar daje molekularni jon i fragmentacione jone koji služe kao osnova za identifikaciju zajedno sa retencionim vremenima dobijenih gasnohromatografskim razdvajanjem.

GC-MS metoda ograničena je na analite koji osim što treba da budu isparljivi, treba da budu i stabilni u gasnohromatografskoj koloni u uslovima razdvajanja (temperatura kolone, interakcije sa stacionarnom fazom, injektovanje itd.). Pored navedenih ograničenja i dalje postoje brojna jedinjenja koja mogu da budu razdvojena i identifikovana iz kompleksnih smješa pomoću GC-MS metode. Maseni spektrometar u GC-MS sistemu ima dvostruku ulogu, služi kao detektor i snima masene spektre eluiranih jedinjenja. Maseni spektar se dobija mjerenjem struja koje potiču od jona razdvojenih prema masa/naelektrisanje (m/z) vrijednostima. (Antić i Antić, 2014)

Da bi određeno jedinjenje bilo analizirano u masenom spektrometru mora biti naelektrisano. Osnovni dio masenog spektrometra je jonizacioni izvor koji obezbjeđuje jone te ih šalje u analizator. U analizatoru dolazi do razdvajanja jona u zavisnosti od njihovog odnosa mase i naelektrisanja m/z . Razdvojeni joni se detektuju i signal se bilježi u bazi podataka radi daljih analiza. Prikupljanje podataka i snimanje masenih spektara može se vršiti jednom od dvije metode: SCAN – snimanje kompletnog masenog spektra i SIM – praćenje odabranih jona. SCAN režim podrazumijeva skeniranje mase u zadatom opsegu, uz istovremeno praćenje retencionog vremena kako bi se identifikovao analit. SIM tehnika se koristi u kvalitativnim određivanjima, te se ovom tehnikom detektuju se m/z vrijednosti samo reprezentativnih jona posmatranog molekula. Karakteristični joni biraju se na osnovu podataka dobijenih pomoću SCAN tehnike (Delević, 2015)

2.9.2. Priprema uzorka i ekstrakcija

2.9.2.1. Dodavanje internog standarda

Aдекватna priprema uzorka značajno utiče na kvantifikaciju akrilamida u uzorcima hrane. U većini slučajeva, interni standard se dodaje u uzorak neposredno prije ekstrakcije kako bi se utvrdila tačnost i preciznost metode. Interni standard se u uzorku ponaša identično kao i akrilamid, te se nakon analize na osnovu *Recovery* vrijednosti može utvrditi efikasnost primenjene metode ekstrakcije.

Dodavanjem poznate koncentracije internog standarda u analiziranu smjesu, dobija se postotak stvarne koncentracije analiziranog jedinjenja izdvojenog tokom analitičkog postupka, odnosno iskorištenje ili tzv. *recovery*. Najčešće korišteni interni standardi za kvantifikaciju akrilamida su izotop akrilamida ($^{13}\text{C}_3$), metakrilamid, *N,N*-dimetilakrilamid i acetamid.

2.9.2.2. Ekstrakcija i pročišćavanje uzorka

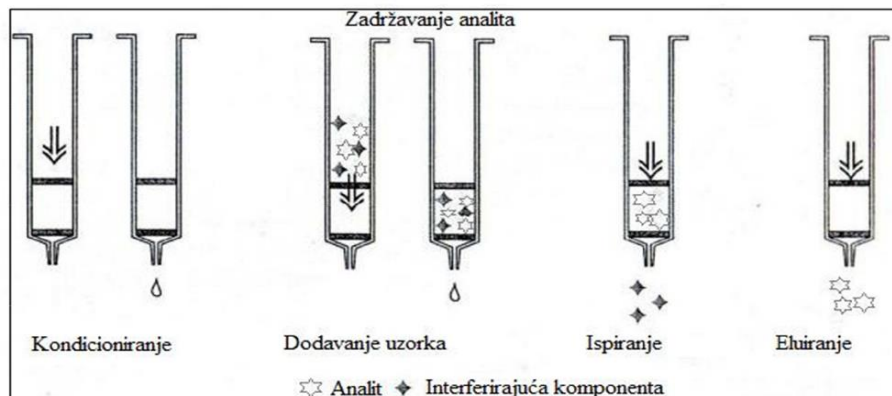
Akrilamid se kao jedinjenje visoke polarnosti dobro rastvara u vodi i polarnim organskim rastvaračima kao što su acetonitril, etilacetat i aceton. Rastvorljivost akrilamida u različitim rastvaračima diktira strategiju prilikom ekstrakcije uzorka i njegove pripreme za analizu. Voda i polarni rastvarači se često koriste pri ekstrakciji akrilamida iz različitih matriksa uzoraka hrane. Na prinos ekstrakcije mogu uticati faktori kao što su homogenizacija uzorka, odmašćivanje, odabir rastvarača, omjer rastvarača prema uzorku, kao i temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. U zavisnosti od matriksa uzorka namirnice koja se analizira, predlaže se i dodatni korak odmašćivanja uzorka heksanom, dihlormetanom, petrol etrom ili cikloheksanom.

Prečišćavanje uzorka se najčešće vrši sljedećim metodama:

- Taloženje rastvornih proteina Carrez I i Carrez II rastvorima
- Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) sa odgovarajućom stacionarnom fazom

Kod uzoraka prehrambenih proizvoda koji u svom matriksu sadrže proteine, neophodno je izvršiti njihovo taloženje. Carrezovi reagensi (kalijum-heksacijanoferat i cink-sulfat) su efikasni reagensi za taloženje proteina prilikom pročišćavanja uzorka (Gökmen, 2016).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi ili čvrsto tečna ekstrakcija (SPE) je takođe jedna od korištenih metoda za pročišćavanje uzorka i njegovu pripremu za analizu. Značajna primjena SPE metoda ogleda se u koncentrisanju analita što je posebno značajno u analizi tragova, gdje su koncentracije analita u uzorku veoma niske. Prilikom SPE ekstrakcije uzorak se propušta kroz čvrstu fazu pri čemu se analit vezuje za adsorbens dok interferirajuće komponente zajedno sa rastvaračem prolaze kroz kolonu. Nakon toga, odgovarajućim rastvaračem ili smjesom rastvarača uklanjaju se zaostale interferirajuće komponente. Analit se na kraju eluira sa rastvaračem dovoljno visoke eluacione moći (Delević, 2015).



Slika 6. Zadržavanje interferirajućih komponenti na koloni za SPE ekstrakciju (Delević, 2015)

Za uspješnu ekstrakciju jako polarnih jedinjenja sa velikom rastvorljivošću u vodi najčešće se koriste kolone sa grafitnim (GCB) ili poroznim ugljenikom (PCB) (Mitra S, 2003).

Iako se klasične metode pripreme i prečišćavanja i dalje široko koriste, priprema uzorka mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Micro Extraction* - SPME) u posljednje vrijeme sve je više u upotrebi, jer zahtjeva manje količine reagenasa uz bržu pripremu uzorka.

Kod ove tehnike koristi se tanka šipka od topljenog silicijum-dioksida obložena polimerom koji ima ulogu adsorbensa. Polimerom obložena šipka silicijum-dioksida (SPME vlakno) je vezana za metalnu iglu koji zajedno čine sklop SPME vlakana. (Antić i Antić, 2014)

2.9.2.3. GC-MS analiza

Gasnohromatografska analiza izvodi se na pripremljenom uzorku akrilamida ili njegovom derivatu. Detektori koji se koriste kod GC analiza su maseni spektrometar (MS), tandemski maseni spektrometar (MS/MS), maseni spektrometar visoke rezolucije (HRMS), detektor sa zahvatom elektrona (ECD), azotno fosforni detektor (NPD) i plameno jonizacioni detektor (FID).

Iako direktna analiza akrilamida GC-MS metodom zahtjeva manje vremena i bržu pripremu uzorka, njena primjena u laboratorijama je veoma rijetka. Nedostaci analize nederivatizovanog uzorka akrilamida GC-MS metodom:

- Nedostatak karakterističnih jona u masenom spektru, uticaj interferirajućih komponenti matriksa i smanjena osjetljivost analize.
- Potencijalno generisanje akrilamida *in situ* u zagrijanom GC injektoru iz njegovih prekursora (asparagin i redukujući šećeri) kada se kao rastvarač koristi voda (Hajšlová i sar., 2006).
- Visoka rastvorljivost akrilamida u vodi u odnosu na organske rastvarače otežava pripremu uzorka i analizu.
- U određenim slučajevima može doći do eluiranja 3-hidroksipropionitrila (3-HPN) sa kolone zajedno sa akrilamidom što navodi na pogrešne rezultate pri kvantifikaciji (Biedermann i Grob, 2007).

Kako bi se prevazišli navedeni nedostaci predložene su različite strategije pripreme uzorka i analize GC-MS metodom:

- Upotreba *n*-propanola i acetonitrila kao rastvarača za ekstrakciju kako bi se izbjegla istovremena istovremena ekstrakcija prekursora akrilamida koji generišu dodatni akrilamid u injektoru (Hajšlová i sar., 2006).
- Korištenje kapilarnih kolona sa polarnim stacionarnim fazama kako bi se poboljšalo gasnrohromatografsko razdvajanje (Castle i Eriksson, 2005).
- Derivatizacija akrilamida, a zatim njegova ekstrakcija iz vodene faze u etil-acetat.

Derivatizacija akrilamida se najčešće izvodi pomoću bromovanja. Bromovani akrilamid je manje polaran u odnosu na početnu komponentu, te se bolje rastvara u nepolarnim organskim rastvaračima. Prednost postupka se ogleda u tome da se povećava molekulska masa analita što rezultuje i većom selektivnošću i osjetljivošću analize (Delević, 2015). Derivatizacija i prevođenje akrilamida u 2,3-dibrompropanamid predložena je prije otkrića akrilamida u termički tretiranim namirnicama, u cilju unapređenja metode analize monomera akrilamida iz uzorka vode (Hashimoto, 1976). Finalni proizvod bromovanja 2,3-dibrompropanamid je nestabilno jedinjenje sa potencijalom da se razloži u koloni, zbog čega se preporučuje njegovo

prevođenje u stabilniji derivat 2-brompropenamid izvođenjem reakcije dehidrobromovanja (Andrawes, 1987).

3. Eksperimentalni dio

U radu su ispitivani uzorci keksa proizvedenog u Bosni i Hercegovini. Prilikom industrijske proizvodnje ispitivanih uzoraka keksa, kao pekarski agens korišten je amonijum-hidrogenkarbonat. Cilj rada je bio da se razvije jednostavna i praktična metoda pripreme uzorka koja bi istovremeno zadovoljava kriterijume GC-MS analize u pogledu osjetljivosti i selektivnosti.

GC-MS analiza urađena je na uzorku ekstrakta akrilamida, kao i na uzorku ekstrakta 2-brompropenamida kao proizvoda derivatizacije akrilamida. Derivatizacija akrilamida izvršena je bromovanjem dvostruke veze akrilamida. Na osnovu karakterističnih m/z vrijednosti akrilamid je detektovan kao 2-propenamid, a njegov derivat kao 2-brompropenamid.

3.1. Priprema uzorka i GC-MS analiza akrilamida

3.1.1. Aparatura i reagensi

Kao standard korišten je akrilamid stepena čistoće > 99,9% (ACROS Organics, SAD). Organski rastvarači petroletar i etil-acetat (Lach-ner, Češka) kao i kalijum-bromid, natrijum-tiosulfat, trietilamin i anhidrovani natrijum-sulfat korišteni su bez dodatnog pročišćavanja. Pripremljeni rastvori kalijum-heksacijalnoferat(II)-trihidrata (37,5g / 250 mL; Carrez 1) i cink-sulfat-heptahidrata (75 g / 250 mL; Carrez 2) čuvani su u frižideru prije korištenja. Gasnohromatografska-masenospektrometrijska (GC-MS) analiza urađena je na aparatu Agilent 5977A.

3.1.2. Postupak pripreme uzorka

Dobro homogenizovan uzorak (40 g) ekstrahovan je dva puta petroletrom uz miješanje na magnetnoj miješalici, uz povratno hladilo na temperaturi približnoj 40 °C, u trajanju od 2 h. Dobijeni ekstrakt je filtriran na vakuum filteru, a zatim podijeljen u dva dijela po 10 g. Kako bi se utvrdila efikasnost metode, u jedan uzorak dodato je 10 µg akrilamida (*spike*), a zatim su rađene dvije paralelne ekstrakcije. Oba uzorka su zatim prebačena u vodenu fazu ekstrakcijom u 100 mL destilovane vode, ponovnim miješanjem na magnetnoj miješalici na blago povišenoj temperaturi (60 °C) kako bi se povećao prinos ekstrakcije.

Kako bi se istaložili rastvorni proteini, u ekstrakte su dodati Carrez 1 i Carrez 2 rastvori, a uzorci su dalje centrifugirani dva puta (4000 rpm, 15 min.). Nakon razdvajanja slojeva, u izdvojene supernatante dodaje se NaCl kako bi se izvršilo isoljavanje i poboljšanje ekstrakcije u etil-acetatu. U lijevku za odvajanje vršena je tečno-tečna ekstrakcija akrilamida etil-acetatom u tri porcije sa 40 mL rastvarača. Ekstrakti su osušeni anhidrovanim natrijum-sulfatom, a zatim uparavani na zapreminu manju od 10 mL. Dodatno prečišćavanje ekstrakata vršeno je mikrofilterima (45 µm) kako bi se uklonile eventualno zaostale nečistoće. Uzorci su zatim prebačeni u vijalu i pušteni na analizu.

3.1.3. GC-MS analiza

Analiza je urađena je na aparatu Agilent 5977A gasnom hromatografu (HP5-MS kolona, 30 m × 0.25 mm, 0,25 µm debljina filma, He - noseći gas, 1,5 cm³ min⁻¹), u sprezi sa selektivnim masenim detektorom 5975C (70eV). Temperaturni režim rada programiran je tako da je početna temperatura iznosila 50 °C, a zatim se mijenjala stepenom zagrijavanja od 50 °C min⁻¹ do maksimalne temperature od 240 °C. Kao mobilna faza korišten je gas He čistoće 99,999 %. Temperatura injektora iznosila je 200 °C.

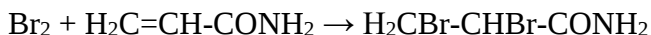
3.2. Priprema uzorka i GC-MS analiza bromovanog uzorka

3.2.1. Postupak pripreme uzorka

Odvagani uzorak (40 g) je najprije dobro homogenizovan, a zatim rastvoren u 100 mL petrol-etera na magnetnoj mješalici u trajanju od 2h na blago povišenoj temperaturi. Nakon postupka odmašćivanja uzorka, dobijeni ekstrakt filtriran je na vakuumu, a zatim osušen i podjeljen na dva dijela po 10 g. U jedan uzorak dodato je 10 µg akrilamida (spajk) kako bi se utvrdila efikasnost metode ekstrakcije, a zatim su urađene dvije paralelne ekstrakcije. Nakon odmašćivanja, uzorci su prebačeni u vodenu fazu ekstrakcijom u 100 ml vode miješanjem na magnetnoj miješalici u trajanju od 1 sat na uz blago povišenu temperaturu. U vodene ekstrakte dodani su Carrezovi rastvori, a uzorci su zatim centrifugirani (4000 rpm, 15 min) i filtrirani na mikrofilterima (45 µm).

3.2.2.1. Bromovanje uzorka

Ekstraktima uzoraka se uz miješanje dodaje 7,5 g KBr čija se pH podešava na 1-3 dodavanjem 0,5 mL HBr. U rastvore se zatim dodaje 2,5 mL zasićenog rastvora bromne vode. Uzorci su čuvani preko noći na temperaturi od 0 °C. Finalni proizvod bromovanja je 2,3-dibrompropanamid.



Nakon što je završena reakcija bromovanja, višak broma iz rastvora se uklanja dodavanjem rastvora natrijum-tiosulfata (1 mol/L) u kapima sve do obezbojavanja rastvora. Nakon što je višak broma uklonjen iz rastvora, u uzorke je dodano po 10 g anhidrovanog natrijum-sulfata, zatim vršena tečno-tečna ekstrakcija sa 10 mL etil-acetata. Ekstrakti su osušeni anhidrovanim natrijum-sulfatom, a zatim uparavani do suha.

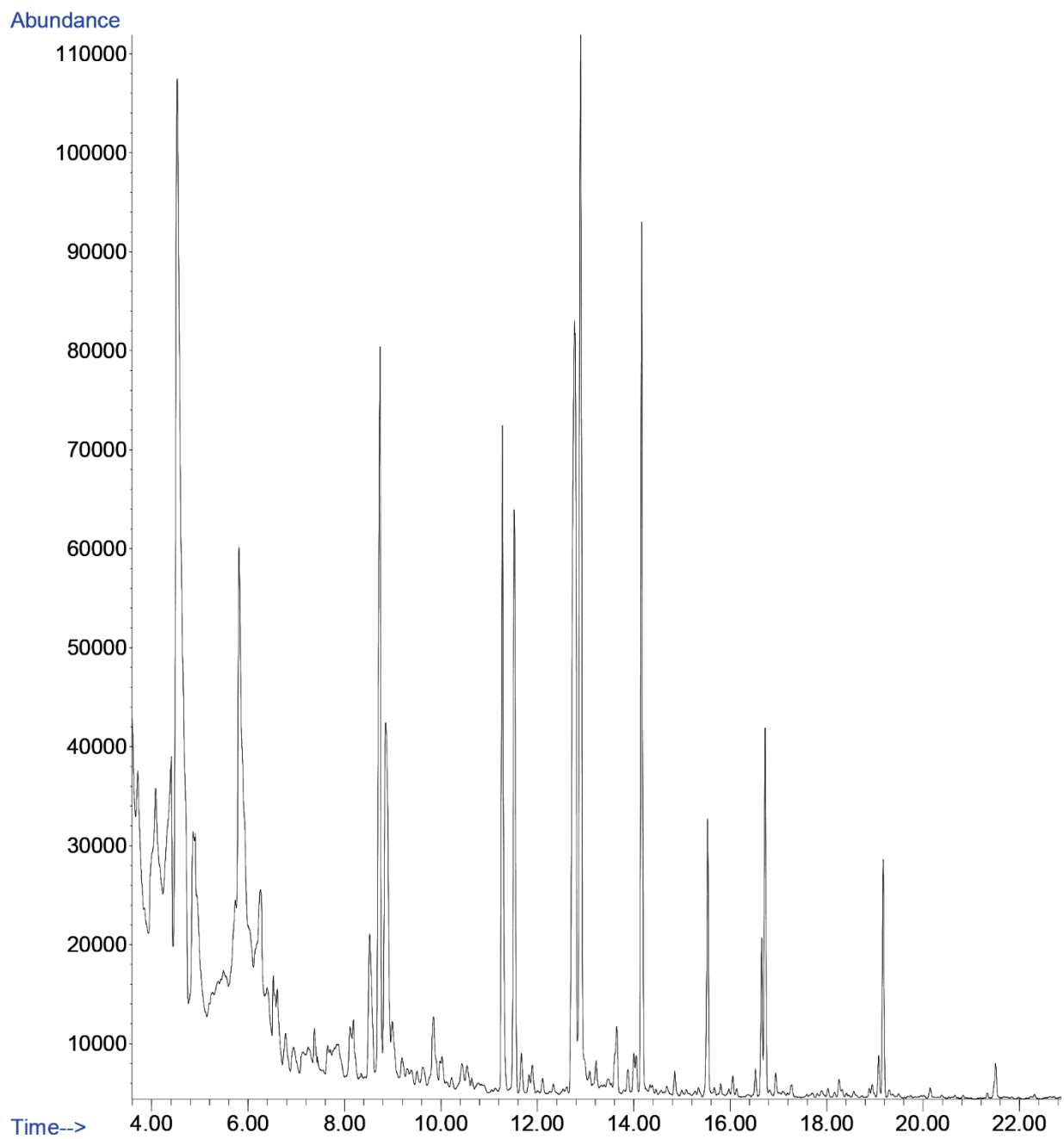
S obzirom da je 2,3-dibrompropanamid nestabilno jedinjenje sa potencijalom da se razloži u koloni, izvršena je reakcija dehidrobromovanja dodavanjem 50 µl 10% trietilamina. Reakcijom dehidrobromovanja 2,3-dibrompropanamid konvertuje se u stabilniji derivat 2-brompropenamid. Uzorci su zatim prebačeni u vijalu i pušteni na analizu.

4. Rezultati analize i diskusija

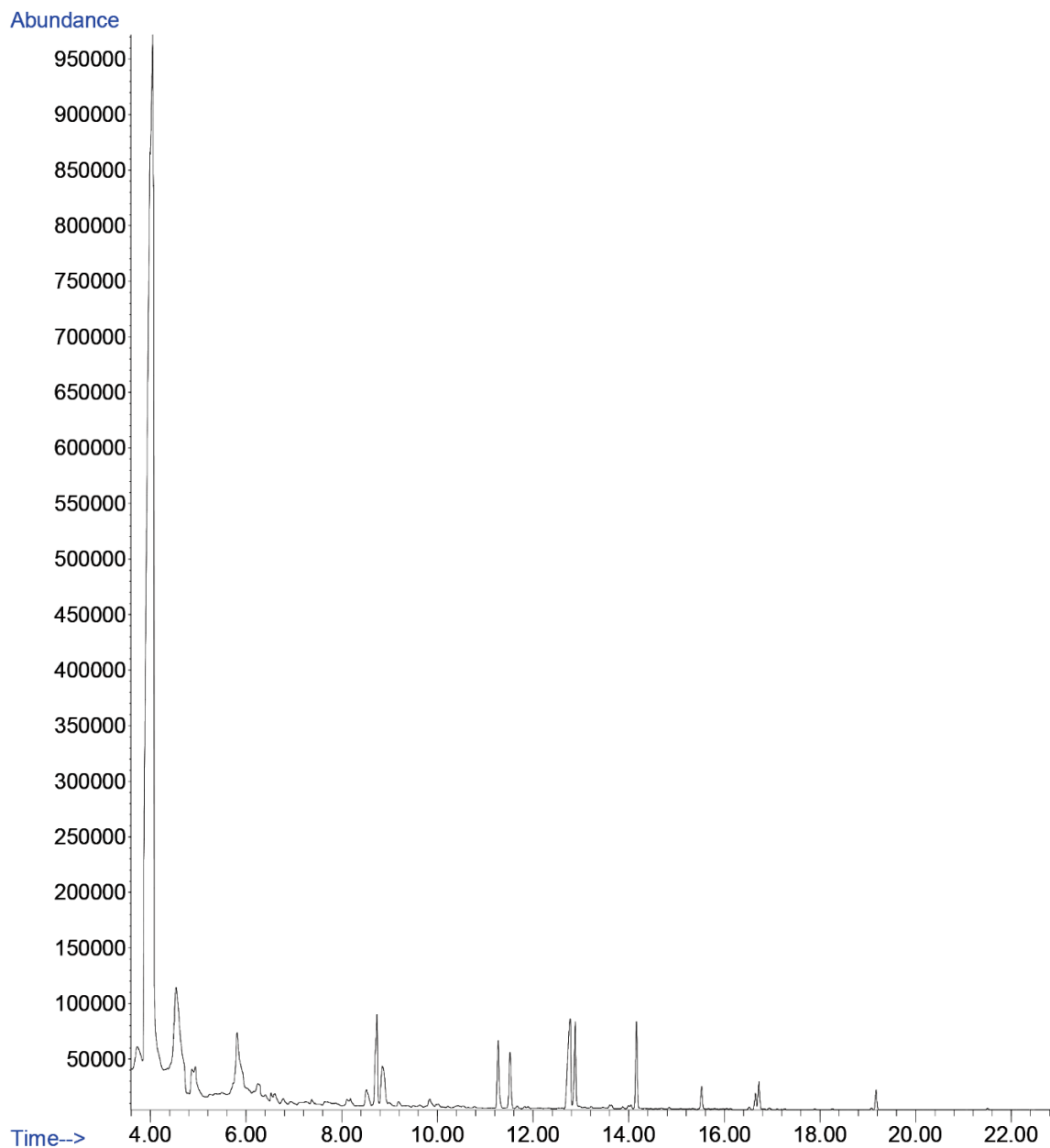
4.1. Analiza akrilamida

Pod zadatim hromatografskim uslovima akrilamid je detektovan kao 2-propenamid sa retencionim vremenom 4,56 min u uzorku keksa (Slika 7) kao i u spajkovanom uzorku (Slika 8). Primjenjena metodama ekstrakcije i prečišćavanja uzorka zadovoljava osnovne kriterijume u pogledu osjetljivosti te se može primijeniti pri rutinskoj analizi kvalitativnog prisustva na akrilamid.

Direktna analiza akrilamida GC-MS metodom izbjegava se iz više razloga. Polarni rastvarači (većinom voda) koji se koriste za ekstrakciju akrilamida prilikom pripreme uzorka, nisu pogodni za injektovanje u GC sistem. Visoka polarnost akrilamida i njegova slaba isparljivost zahtijeva razdvajanje na kolonama sa polarnim stacionarnim fazama. Polarne stacionarne faze često imaju tendenciju da „cure“ na visokim temperaturama pri čemu dolazi do hemijske razgradnje polimera koji čine stacionarnu fazu.

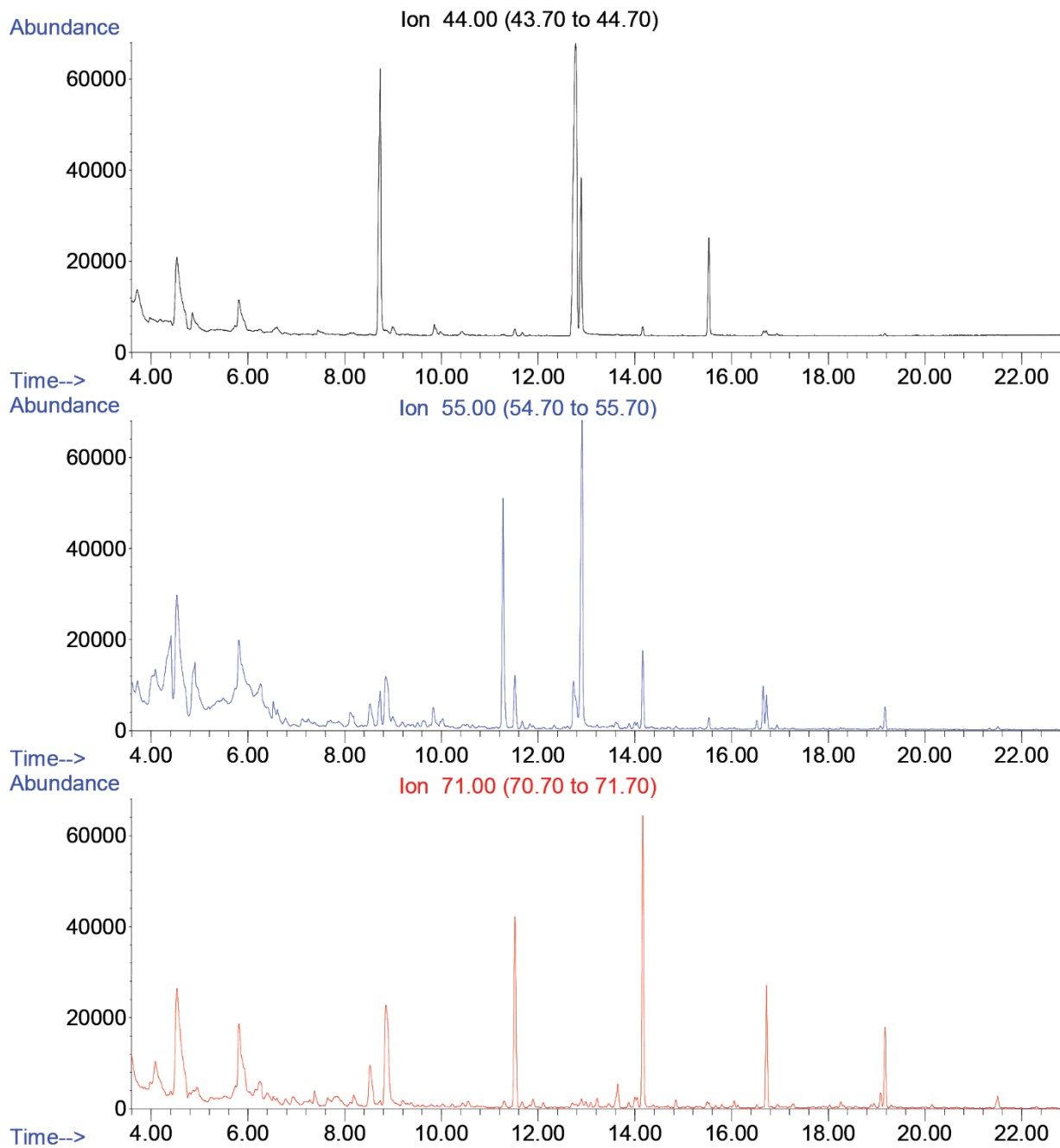


Slika 7. Hromatogram uzorka ekstrakta akrilamida u keksu $t_r = 4,56$ min

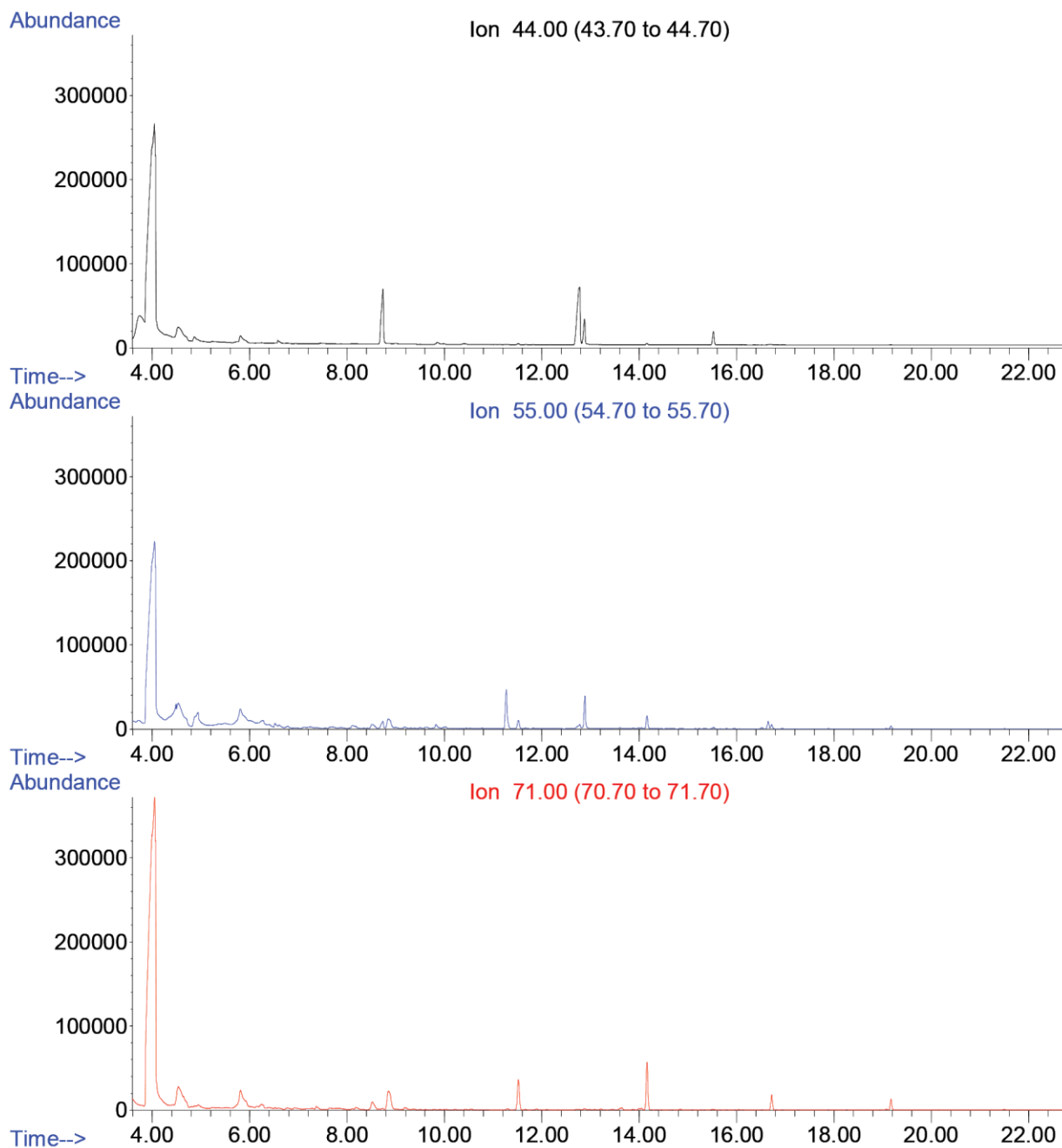


Slika 8. Hromatogram uzorka ekstrakta akrilamida u spajku, tr = 4,56 min

Pod zadatim hromatografskim uslovima u elektron-jonizacionom režimu rada (*engl. Electron ionization mode, EI*) snimljeni su maseni spektri. Glavni fragmentacioni joni za indentifikaciju i kvantifikaciju akrilamida imaju m/z vrijednosti 55 i 71. Karakteristični joni akrilamida kao i njihova zastupljenost u uzorku keksa i spajkovanom uzorku prikazani su na Slici 9 i Slici 10.



Slika 9. Zastupljenost karakterističnih jona akrilamida u uzorku keksa



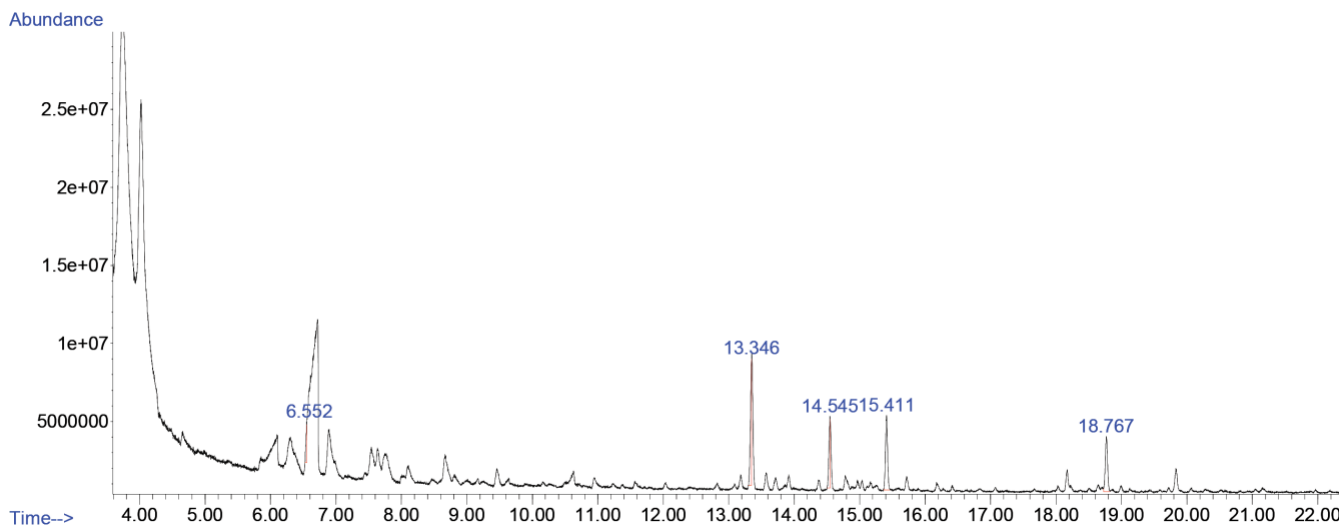
Slika 10. Zastupljenost karakterističnih jona akrilamida u spajkovanom uzorku

Mala molekulska masa i nedostatak karakterističnih jona akrilamida kao i i potencijalan uticaj interferirajućih supstanci na analizu, smatraju se glavnim nedostacima pri analizi akrilamida zbog čega se navedenom metodom ne dobija pouzdan maseni spektar za kvantifikaciju akrilamida.

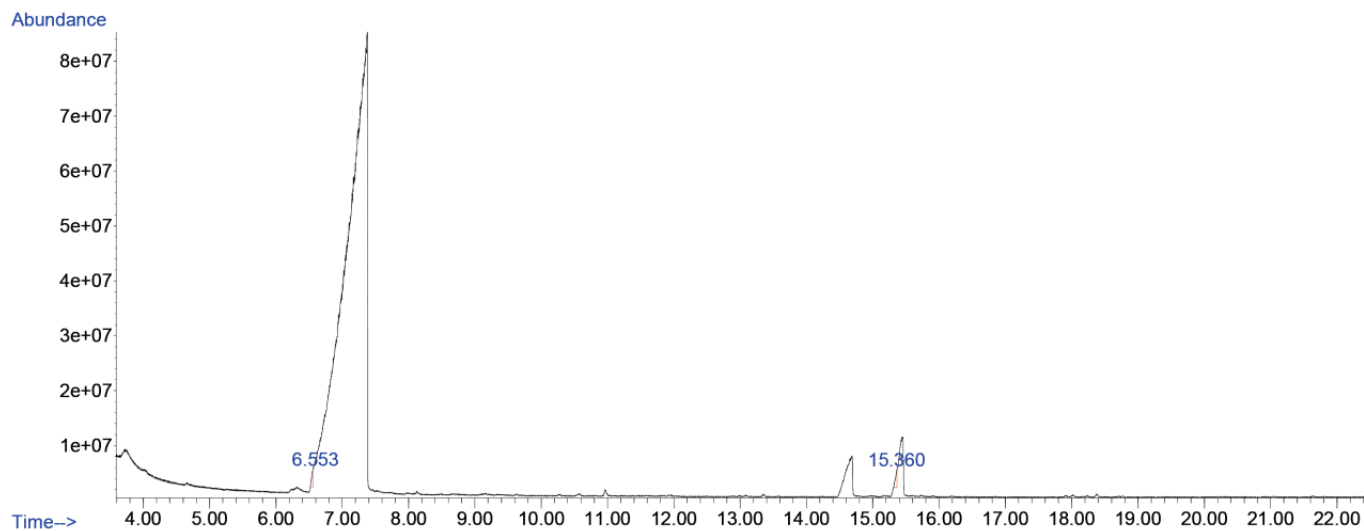
4.2. Analiza derivatizovanih uzoraka

GC analizom bromovanih uzoraka akrilamida dobijen je pik sa retencionim vremenom 6,55 min kod uzorka keksa (Slika 11) kao i kod spajkovanog uzorka (Slika 12) čime se predložena metoda ekstrakcije i derivatizacije pokazala uspješnom. Derivatizacijom odnosno bromovanjem, akrilamida dobija se nepolarnije jedinjenje manje isparljivosti u odnosu na akrilamid koje se bolje rastvara u nepolarnim organskim rastvaračima što je od posebne važnosti prilikom GC analiza.

Bromovanjem akrilamida postiže se znatno selektivnija i osjetljivija metoda analize, uz minimalan uticaj interferentnih supstanci. Prevođenjem 2,3-dibrompropanamida u 2-brompropenamid prije analize, izbjegava se potencijalni rizik od dehidrobromovanja u injektoru ili na koloni prilikom GC-MS što može značajno uticati na selektivnost i osjetljivost metode.

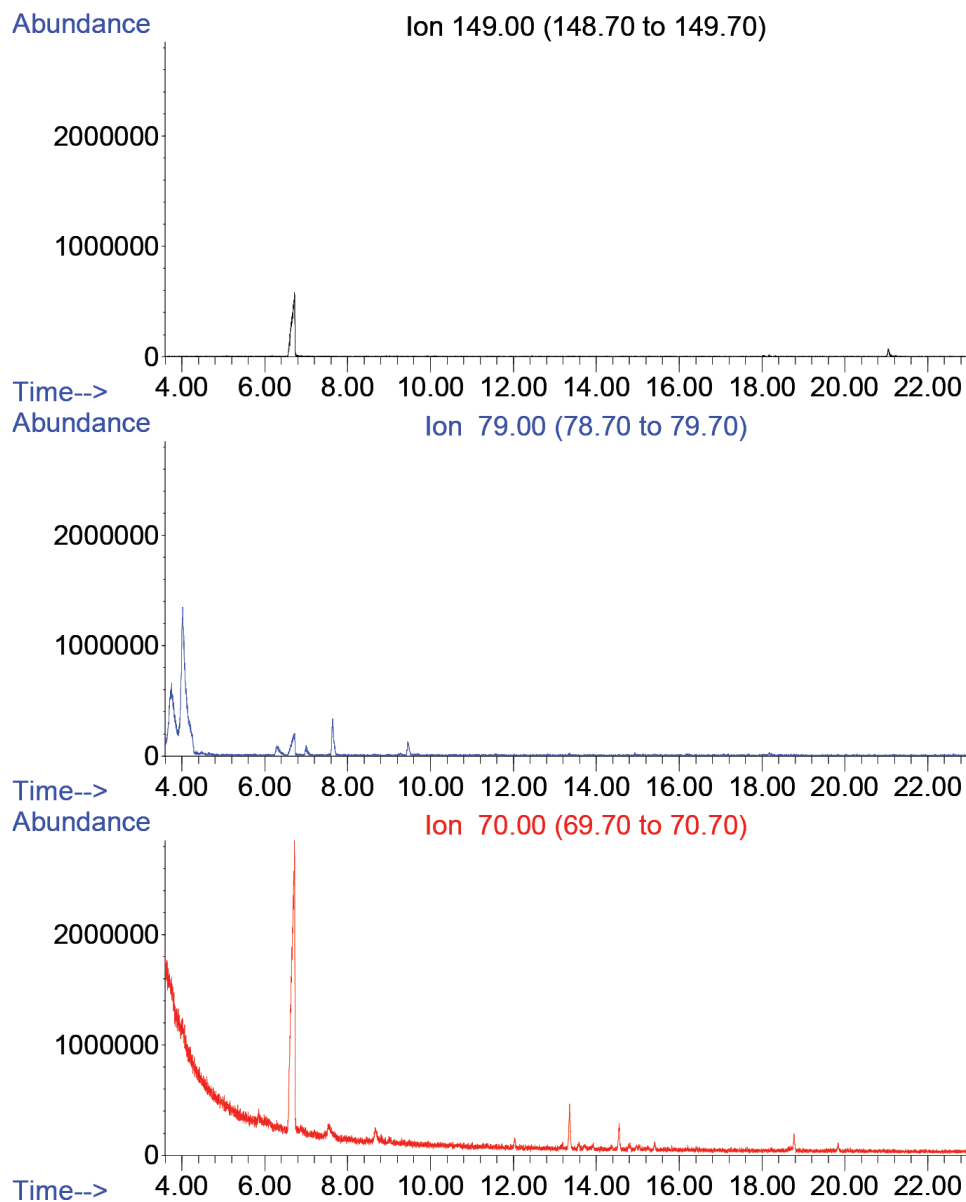


Slika 11. Hromatogram uzorka ekstrakta 2-BPA u uzorku keksa

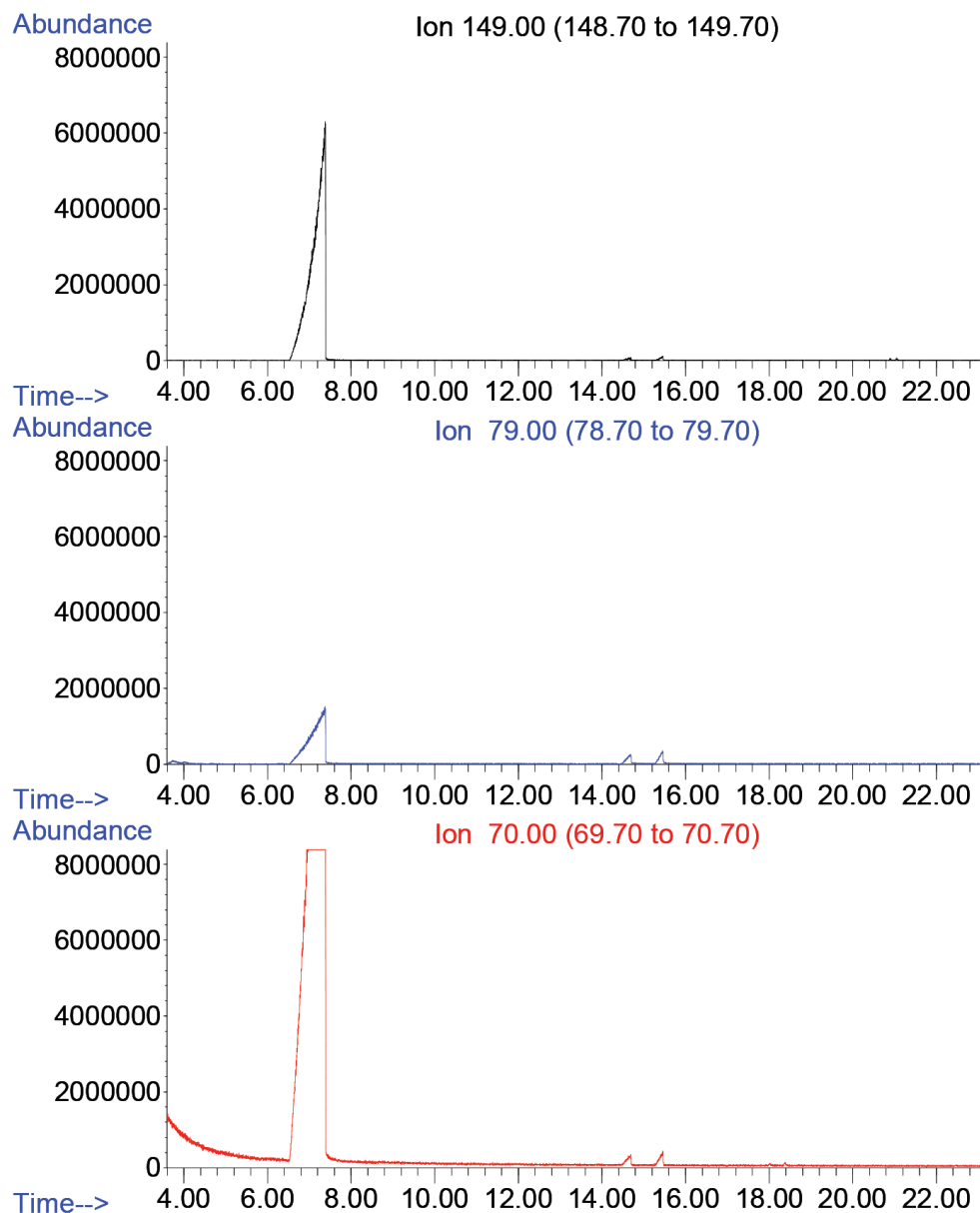


Slika 12. Hromatogram spajkovanog uzorka 2-BPA

Posmatrani fragmentacioni joni za identifikaciju analita 2-brompropenamida su $[\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}]^+ = 70$ i $[\text{C}_3\text{H}_4^{79}\text{BrNO}]^+ = 149$. Zastupljenost karakterističnih jona u uzorku akrilamida kao uzorku spajka prikazani su na Slici 13 i Slici 14.



Slika 13. Zastupljenost karakterističnih jona 2-BPA u uzorku keksa



Slika 14. Zastupljenost karakterističnih jona 2-BPA u spajkovanom uzorku

Predloženim metodama GC-MS analize potvrđeno je prisustvo akrilamida u keksu gdje je kao pekarski agens korišten amonijum-hidrogenkarbonat. S obzirom da se radi o svakodnevno konzumiranim prehrambenim proizvodima, za dalje istraživanje predlaže se potpuna kvantifikacija akrilamida u prisustvu odgovarajućeg standarda kako bi se utvrdilo da li dobijene koncentracije prelaze indikativne vrijednosti akrilamida u datoj grupi namirnica.

5. Zaključak

Do formiranja akrilamida u industrijskim prehrambenim proizvodima od brašna dolazi usljed Maillardove reakcije između ugljenih hidrata i aminokiseline asparagina na visokim temperaturama pri uslovima smanjene vlažnosti. Pri industrijskoj proizvodnji navedenih proizvoda ostali faktori poput izbora pekarskog agensa mogu imati značajan uticaj na povećanje koncentracije akrilamida.

Cilj rada je bio da se razvije adekvatna metoda ekstrakcije i analize uzorka koja bi zadovoljila odgovarajuće kriterijume u pogledu selektivnosti i osjetljivosti na akrilamid. U radu je analiziran keks proizveden u Bosni i Hercegovini prilikom čije proizvodnje je korišten amonijum-hidrogenkarbonat kao pekarski agens.

Za analizu akrilamida u uzorcima gdje je on prisutan u niskim koncentracijama preporučuju se metode hromatografije sa detektorima odgovarajuće osjetljivosti. U ovom radu je korištena gasnohromatografska – masenospektrometrijska metoda. Uzorci keksa su najprije analizirani bez predhodne derivatizacije. Akrilamid je detektovan kao 2-propenamid u ekstraktu uzorka keksa kao i u ekstraktu spajkovanog uzorka na osnovu retencionih vremena 4,56 min. Glavni fragmentacioni joni za identifikaciju akrilamida imali su m/z vrijednosti 55 i 71. Zbog nedostatka karakterističnih jona akrilamida kao i potencijalnog uticaja interferentnih supstanci, predložena metoda ne daje pouzdan maseni spektar za kvantifikaciju akrilamida. Prednost metode se ogleda u jednostavnosti pripreme uzorka i hromatografske analize za kvalitativna određivanja akrilamida u namirnicama gdje je prisutan u niskim koncentracijama.

U cilju unapređenja metode, predložena je priprema uzorka koja podrazumijeva predhodnu derivatizaciju akrilamida. Derivatizacija je izvršena bromovanjem dvostruke veze akrilamida, a finalni proizvod bromovanja je 2,3-dibrompropanamid. Kako bi se izbjegla spontana reakcija dehidrobromovanja u injektoru ili koloni gasnog hromatografa, 2,3-dibrompropanamid je preveden u stabilniji monoderivat 2-brompropenamid. Glavni fragmentacioni joni za identifikaciju 2-brompropenamida imaju m/z vrijednosti 149 i 70. Dobijeno jedinjenje karakteriše veća molekulska masa, lakša isparljivost i bolja rastvorljivost u neorganskim rastvarčima u odnosu na akrilamid. Derivatizacija uzorka rezultuje povećanom

osjetljivosti i selektivnosti metode uz minimalan uticaj interferirajućih jedinjenja na analizu. Reakcija bromovanja zahtijeva vrijeme, zbog čega je glavni nedostatak predložene metode produženo vrijeme pripreme uzorka za analizu.

S obzirom na zaključak Evropske agencije za sigurnost hrane u pogledu karcinogenog uticaja akrilamida neophodno je utvrditi da li koncentracija akrilamida u svakodnevno konzumiranim prehrambenim proizvodima prelazi indikativne vrijednosti te smanjiti njegovu prisutnost u hrani koja u sirovom stanju sadrži prekursore za njegovo formiranje.

6. Literatura

1. Adams, A., Hamdani, S., Van Lancker, F., Méri, S., & De Kimpe, N. (2010). Stability of acrylamide in model systems and its reactivity with selected nucleophiles. *Food research international*, 43(5), 1517-1522.
2. Amrein, T. M., Andres, L., Manzardo, G. G., & 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.
3. Amrein, T. M., Schönbächler, B., Escher, F., & Amadò, R. (2004). Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4282-4288.
4. Andrawes, F., Greenhouse, S., & Draney, D. (1987). Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by gas chromatography and gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 399, 269-275.
5. Arvanitoyannis, I. S., & Dionisopoulou, N. (2014). Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(6), 708-733.
6. Başkan, S., & Erim, F. B. (2007). NACE for the analysis of acrylamide in food. *Electrophoresis*, 28(22), 4108-4113.
7. Bermudo, E., Nunez, O., Moyano, E., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2007). Field amplified sample injection–capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1159(1-2), 225-232.
8. Bermudo, E., Núñez, O., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006). Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1129(1), 129-134.
9. Biedermann, M., & Grob, K. (2008). In GC-MS, acrylamide from heated foods may be coeluted with 3-hydroxy propionitrile. *European Food Research and Technology*, 227(3), 945-948.
10. Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P., & Mandli, H. (2002). Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93(6), 638-652.
11. Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Imhof, D., Bazzocco, D., & Pfefferle, A. (2003). How much reducing sugar may potatoes contain to avoid excessive acrylamide formation during roasting and baking?. *European Food Research and Technology*, 217(5), 369-373.
12. Capuano, E., Oliviero, T., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2010). Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Research International*, 43(4), 1021-1026.
13. Castle, L., & Eriksson, S. (2005). Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC International*, 88(1), 274-284.
14. Commission Recommendation of 8 November 2013 on investigation into the levels of acrylamide in food, OJ L 301, 12.11.2013, P.15-17

15. Commission Recommendation 2010/307/EU of June 2010 on the monitoring of acrylamide in food, OJ L 137, 3.6.2010. p. 4-10
16. Delević, V. M. (2015). Ispitivanje uticaja termičkog tretmana na nastajanje akrilamida u namirnicama sa visokim sadržajem skroba primenom unapređene metode gasne hromatografije (Doktorska Disertacija, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet).
17. Dunovská, L., Čajka, T., Hajšlová, J., & Holadová, K. (2006). Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 578(2), 234-240.
18. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104.
19. Eriksson, S. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology (Doctoral dissertation, Department of Environmental Chemistry).
20. European Food Safety Authority. (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10(10), 2938.
21. Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4504-4526.
22. Friedman, M., & Levin, C. E. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6113-6140.
23. Gökmen, V. (2015). Analysis of Acrylamide in Foods with Special Emphasis on Sample Preparation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Detection. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 445.
24. Habermann, C. E. (2000). Acrylamide. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
25. Hamlet, C. G., Jayaratne, S. M., & Sadd, P. A. (2004). Rapid, sensitive and selective analysis of acrylamide in cereal products using bromination and GC/MS/MS. *Czech journal of food sciences*, 22(I), 290. Ahn, J. S., Castle, L., Clarke, D. B., Lloyd, A. S., Philo, M. R., & Speck, D. R. (2002). Verification of the findings of acrylamide in heated foods. *Food Additives & Contaminants*, 19(12), 1116-1124.
26. Hashimoto, A. (1976). Improved method for the determination of acrylamide monomer in water by means of gas-liquid chromatography with an electron-capture detector. *Analyst*, 101(1209), 932-938.
27. <http://www.fsa.gov.ba/fsa/bs/>
28. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogen risk to humans 2011. <https://monographs.iarc.fr> (01.09.2018)
29. Izveštaj sastanka na temu „Akrilamid u hrani – rizici i preporuke, Agencija za sigurnost hrane BiH, Sarajevo 2017
30. Kim, S. H., Hwang, J. H., & Lee, K. G. (2011). Analysis of acrylamide using gas chromatography-nitrogen phosphorus detector (GC-NPD). *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 835-839.
31. Konings, E. J., Ashby, P., Hamlet, C. G., & Thompson, G. A. (2007). Acrylamide in cereal and cereal products: a review on progress in level reduction. *Food additives and contaminants*, 24(sup1), 47-59.

32. Kornbrust, B. A., Stringer, M. A., Lange, N. E. K., Hendriksen, H. V., Whitehurst, R., & Oort, M. V. (2010). Asparaginase—an enzyme for acrylamide reduction in food products. *Enzymes in food technology*, 2, 59-87.
33. Levine, R. A., & Ryan, S. M. (2009). Determining the effect of calcium cations on acrylamide formation in cooked wheat products using a model system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6823-6829.
34. Lineback, D. R., Coughlin, J. R., & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual review of food science and technology*, 3, 15-35.
35. LoPachin, R. M. (2004). The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 25(4), 617-630.
36. Mesias, M., & Morales, F. J. (2015). Acrylamide in bakery products. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 131-157.
37. Mestdagh, F., De Meulenaer, B., & Van Peteghem, C. (2007). Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *Food Chemistry*, 100(3), 1153-1159.
38. Michalak, J., Gujska, E., & Kunciewicz, A. (2013). RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of food composition and analysis*, 32(1), 68-73.
39. Mitra, S. (Ed.). (2004). *Sample preparation techniques in analytical chemistry* (Vol. 237). John Wiley & Sons.
40. Mottram, D. S., & Friedman, M. (2008). *Symposium on the Chemistry and Toxicology of Acrylamide*.
41. Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. T. (2002). Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906), 448.
42. Murkovic, M. (2004). Acrylamide in Austrian foods. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 61(1-2), 161-167.
43. Negoita, M., Iorga, E., Adascalului, A., Catana, L., Belc, N., Stan, A., & Aboul-Enein, H. Y. (2016). Analysis and Evaluation of the Acrylamide Levels in Some Bread Assortments on the Romanian Market by GC-MS/MS. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 5, 180-189.
44. Razia, S., M. Bertrand, V. Klaus, and G. L. Meinolf. "Investigation of acrylamide levels in branded biscuits, cakes and potato chips commonly consumed in Pakistan." *International Food Research Journal* 23, no. 5 (2016).
45. Sadd, P. A., Hamlet, C. G., & Liang, L. (2008). Effectiveness of methods for reducing acrylamide in bakery products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6154-6161.
46. Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., ... & Riediker, S. (2002). Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419(6906), 449.
47. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4998-5006.

48. Törnqvist, M. (2005). Acrylamide in food: The discovery and its implications. In *Chemistry and safety of acrylamide in food* (pp. 1-19). Springer, Boston, MA.
49. V. V. Antić, M. P. Antić, *Hromatografija u analizi hrane*, I izdanje, Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2014.
50. Wenzl, T., De La Calle, M. B., & Anklaam, E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 885-902.
51. Wenzl, T., De La Calle, M. B., & Anklaam, E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 885-902.
52. Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (Eds.). (2002). *Enzymes in food technology*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
53. Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., & Shibamoto, T. (2003). Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3999-4003.
54. Yaylayan, V. A., & Stadler, R. H. (2005). Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, 88(1), 262-267.
55. Yaylayan, V. A., Wnorowski, A., & Perez Locas, C. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1753-1757.
56. Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., & Ren, Y. (2007). An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1142(2), 194-198.
57. Zhang, Y., Zhang, G., & Zhang, Y. (2005). Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075(1-2), 1-21.
58. Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., ... & Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4782-4787.

Изјава којом се овлашћује Природно-математички факултет/ Академија умјетности
Универзитета у Бањој Луци да мастер/магистарски рад учини јавно доступним

Овлашћујем Природно-математички факултет/ Академију умјетности Универзитета у Бањој
Луци да мој мастер/магистарски рад, под насловом

Гаснохроматографско одређивање акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна

који је моје ауторско дјело, учини јавно доступним.

Мастер/магистарски рад са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату,
погодном за трајно архивирање.

Мој мастер/магистарски рад, похрањен у д и г и т а л н и р е п о з и т о р и ј у м Универзитета
у Бањој Луци, могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце
Креативне заједнице (*Creative Commons*), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
- ☒ 2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - дијелити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - дијелити под истим условима

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

У Бањој Луци 15.1.2020

Потпис кандидата

Petrović Gordana

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије
мастер/магистарског рада

Име и презиме аутора Гордана Петровић

Наслов рада Гаснохроматографско одређивање акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна

Ментор др Милица Балабан, ванредни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог мастер/магистарског рада идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци 15.1.2020

Потпис кандидата

Petrovic' Gordana

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

**Изјављујем да је
мастер/магистарски рад**

Наслов рада Гаснохроматографско одређивање акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна

Наслов рада на енглеском језику Determination of acrylamide in industrial flour-based food products using gas-chromatography

- ☐ резултат сопственог истраживачког рада,
- ☐ да мастер/магистарски рад, у цјелини или у дијеловима, није био предложен за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- ☐ да су резултати коректно наведени и
- ☐ да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци 15.1.2020

Потпис кандидата

Refik Godić

**КОМИСИЈА ЗА ПРЕГЛЕД, ОЦЈЕНУ И ОДБРАНУ ЗАВРШНОГ/МАСТЕР РАДА НА
II ЦИКЛУСУ СТУДИЈА У САСТАВУ:**

др Весна Антић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, ужа научна област: Хемија, **предсједник**

др Милица Балабан, ванредни професор, Природно-математички факултет Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област: Органска хемија, **ментор-члан**

др Малиша Антић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, ужа научна област: Хемија, **члан**

ВИЈЕЋУ СТУДИЈСКОГ ПРОГРАМА ХЕМИЈА

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВИЈЕЋУ
ПРИРОДНО МАТЕМАТИЧКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БАЊОЈ ЛУЦИ**

Одлуком Наставно-научног вијећа Природно-математичког факултета Универзитета у Бањој Луци број 19/3.3388/19. од 18.12.2019. године именовани смо у Комисију за преглед, оцјену и одбрану завршног/мастер рада кандидата Гордане Петровић под насловом: „Гаснохроматографско одређивање акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна“.

Након прегледа предатог завршног/мастер рада подносимо сљедећи

ИЗВЈЕШТАЈ

**О ОЦЈЕНИ УРАЂЕНОГ ЗАВРШНОГ/МАСТЕР РАДА
„ГАСНОХРОМАТОГРАФСКО ОДРЕЂИВАЊЕ АКРИЛАМИДА У
ИНДУСТРИЈСКИМ ПРЕХРАМБЕНИМ ПРОИЗВОДИМА ОД БРАШНА“,
КАНДИДАТА ГОРДАНЕ ПЕТРОВИЋ**

Мастер рад кандидата Гордане Петровић је урађен у оквиру II циклуса студија на Студијском програму *хемија* под менторством проф. др Милице Балабан. Рад је написан на 43 странице и садржи 14 слика, 5 табела и 1 шему. Рад је укоричен у тврди повез А4 формата, одштампан у боји, једнострано.

Рад садржи: Сажетак на српском и енглеском језику, Увод, Теоријски дио, Експериментални дио, Резултате и дискусију, Закључак, Литературу.

Приказ анализе мастер рада по поглављима

УВОД

У оквиру поглавља Увод, укратко је објашњен главни механизам формирања акриламида у прехранбеним производима од брашна, као и фактори који утичу на повишене концентрације акриламида у индустријски произведеном кексу. У уводу су дефинисани и циљеви истраживања мастер рада, те сажето описане методе припреме узорка за гаснохроматографску-масеноспектрометријску (GC-MS) анализу.

ТЕОРИЈСКИ ДИО

У Теоријском дијелу мастер рада обрађене су хемијске особине акриламида и његови токсични ефекти. Увидом у бројну литературу обрађени су различити механизми формирања акриламида у намирницама. Појединачно су објашњени и различити фактори који утичу на повишене концентрације акриламида у прехранбеним производима од брашна. Обрађена је заступљеност акриламида у различитим намирницама, као и законска регулатива која се односи на концентрације акриламида у индустријским прехранбеним производима. У Теоријском дијелу мастер рада дат је и преглед аналитичких метода за одређивање акриламида те засебно обрађена гаснохроматографска метода са масеним спектрометром као детектором.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИО

У оквиру овог поглавља назначени су узорци који ће се анализирати. Детаљно су описане методе екстракције и услови GC-MS анализе. Методе су обухватале екстракцију акриламида из узорка и праћење карактеристичних јона за акриламид, као и дериватизацију узорка бромовањем двоструке везе акриламида, а затим реакцију дехидробромовања, те праћење карактеристичних јона за добијени производ реакције 2-бромпропенамид. У оба случаја рађене су двије паралелне екстракције са два узорка. У један узорак је додато 10 µg акриламида (тзв. *spike*) како би се утврдила ефикасност примјењене екстракције (тзв. *recovery*).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

У поглављу Резултати и дискусија детаљно су представљени резултати анализе и идентификације узорка акриламида као и 2-бромпропенамида. Добијени резултати представљени су хроматограмима и масеним спектрима. Гаснохроматографском анализом најприје је детектован акриламид као такав у

екстракту узорка кекса, као и у екстракту узорка коме је додат чист акриламид као интерни стандард и то на основу ретенционог времена од 4,56 мин. Акриламид је идентификован на масеном спектрометру на основу m/z вриједности 55 и 71. Дериватизацијом акриламида, добијен је и детектован 2-бромпропенамид у екстракту узорка кекса, као и у екстракту узорка са додатим интерним стандардом на основу ретенционог времена од 6,55 мин. Главни фрагментациони јони за детекцију 2-бромпропенамида имали су m/z вриједности 149 и 70.

ЗАКЉУЧАК

У поглављу Закључак узнесене су основне констатације о ефикасности предложених метода екстракције акриламида приликом GC-MS анализе. GC-MS анализом екстракта акриламида не добија се поуздан масени спектар за његову квантификацију. Крајњи производ бромовања и дехидробромовања је испарљивији дериват 2-пропенамид. Добијено једињење карактерише и већа молекулска маса чиме је побољшана осјетљивост и селективност GC-MS методе.

Поглавље Литература садржи 58 нумерисаних референци.

ОЦЕНА НАУЧНЕ ВАЛИДНОСТИ РАДА

Прегледани рад даје оригиналне научне резултате кандидата, засноване на хемијским методама екстракције акриламида у узорцима, те њиховој анализи и идентификацији. У раду је примјењена уобичајена и литературно утемељена методика, резултати су на правилан начин анализирани и дискутовани.

ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

На основу оцјене завршног/мастер рада под називом: „Гаснохроматографско одређивање акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна“, кандидата Гордане Петровић Комисија закључује да дати завршни/мастер рад представља значајан допринос проучавању, изоловању, анализи и идентификацији акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна. У оквиру рада успјешно је екстрахован акриламид као и његов дериват. Након екстракције урађена је GC-MS анализа. На основу урађених анализа идентификован је 2-пропенамид, односно акриламид као и производ реакције бромовања и дехидробромовања, 2-бромпропенамид. Ова анализа се показала ефикасном за идентификацију акриламида у индустријским прехранбеним производима од брашна.

На основу свега наведеног Комисија предлаже Наставно-научном вијећу Природно-математичког факултета Универзитета у Бањој Луци да усвоји Извјештај и позитивну оцјену завршног/мастер рада и да према предвиђеној процедури закаже јавну одбрану рада будући да су се стекли сви потребни научни и законски услови за то.

У Бањој Луци, јануар, 2020. године

КОМИСИЈА



др Весна Антић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у
Београду, ужа научна област: Хемија,
предсједник



др Милиша Балабан, ванредни професор
Природно-математичког факултета
Универзитета у Бањој Луци, ужа научна
област: Органска хемија, ментор-члан



др Малиша Антић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у
Београду, ужа научна област: Хемија, члан