

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA
U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 13.07.2015. godine, imenovana je Komisija u sastavu:

Dr Ivan Stanković (mentor), redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Brižita Đorđević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Biljana Stojanović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet i

Dr Refik Zejnilović, redovni profesor, Univerzitet u Podgorici - Farmaceutski fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom **„Ispitivanje uticaja termičkog tretmana na nastajanje akrilamida u namirnicama sa visokim sadržajem skroba primenom unapređene metode gasne hromatografije“** kandidata dipl. hem. Veselina Delevića, specijaliste sanitarne hemije.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije Komisija podnosi Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. hem. Veselina Delevića pod nazivom **„Ispitivanje uticaja termičkog tretmana na nastajanje akrilamida u namirnicama sa visokim sadržajem skroba primenom unapređene metode gasne hromatografije“** napisana je na 90 strana i ima 20

tabela, 23 slike i 101 literaturni navod. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (6 strana), Opšti deo (32 strana), Ciljevi istraživanja (1 strana), Eksperimentalni deo (10 strana), Rezultati i diskusija (20 strana), Zaključci (4 strane) i Literatura. Na početku doktorske disertacije dat je sažetak na srpskom i engleskom jeziku sa ključnim rečima.

Poglavlje **Uvod** daje prikaz informacija u vezi otkrića akrilamida u hrani, evaluacije njegove toksičnosti i procene izloženosti od strane međunarodnih ekspertskih tela, kao i o razvoju analitičkih tehnika za određivanje sadržaja akrilamida u hrani. Akrilamid je svrstan od strane međunarodne agencije za istraživanje kancera (IARC) u grupu 2A - kao verovatno kancerogen za čoveka.

Poglavlje **Opšti deo** sadrži 10 odeljaka. Prvih 7 odeljaka sadrži prikaz dosadašnjih saznanja iz oblasti hemijskih osobina akrilamida, njegovog metabolizma i toksičnosti u organizmu, mehanizme njegovog nastajanja u termički tretiranoj hrani, uticaje određenih sastojaka namirnica (ugljenih hidrata, masti, proteina i vode), kao i uticaj matriksa, načina skladištenja i pripreme namirnica za konzumiranje. U odeljku: „*Ekstrakcija na čvrstoj fazi*“ razmatra se mogućnost upotrebe ove tehnike za ukljanjanje interferirajućih komponenti, koncentrisanje i izolovanje akrilamida iz ispitivanog matriksa. Odeljak „*Pregled analitičkih metoda za određivanje akrilamida*“ sadrži literaturne podatke o analitičkim metodama koje se koriste za određivanje akrilamida, a odeljak „*Zakonska regulativa*“ prikazuje regulativu Evropske Unije i preporuke Evropske Komisije za indikativne vrednosti za akrilamid u namirnicama, kao i obaveze zemalja članica EU u vezi monitoringa akrilamida u određenim prehrambenim proizvodima i dostavljanja rezultata ispitivanja Evropskom autoritetu za bezbednost hrane (EFSA).

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: (i) praćenje uticaja termičkih tretmana (kuvanje, pečenje i prženje) na sintezu akrilamida kod namirnica bogatih skrobom, (ii) razvoj derivatizacione metode za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom, (iii) razvoj metode za pripremu uzoraka termički tretiranih namirnica za kvantifikaciju akrilamida upotrebom smanjene količine broma i

(iv) razvoj metode za kvantifikaciju akrilamida u namirnicama pomoću gasne hromatografije sa azot-fosforom detektorom (NPD).

Poglavlje **Eksperimentalni deo** sadrži 3 odeljka. U odeljku „*Termički tretman namirnica bogatih skrobom*“ dat je prikaz upotrebljenih metoda termičkog tretmana: kuvanje, pečenje i prženje namirnica bogatih skrobom na različitim temperaturama za pripremu uzoraka za praćenje uticaja termičkog tretmana na formiranje akrilamida u različitim namirnicama. U odeljcima „*Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS)*“ i „*Priprema uzoraka i kvantifikacija akrilamida metodom gasne hromatografije sa fosforom detektorom (NPD)*“ prikazani su eksperimentalni uslovi, aparatura, reagensi, opis i validacija upotrebljenih metoda za određivanje sadržaja akrilamida u hrani.

Originalni rezultati koji su dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su u poglavlju **Rezultati i diskusija** koje sadrži 10 tabela i 11 slika. Rezultati su pregledno i sistematično predstavljeni u skladu sa postavljenim ciljevima. Kandidat je dobijene rezultate detaljno poredio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora i analizirao uticaj različitih termičkih tretmana na sadržaj akrilamida u namirnicama bogatim skrobom, kao i prednosti upotrebljenih analitičkih metoda za ekstrakciju i određivanje akrilamida u hrani.

Na kraju disertacije, dati su **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (101) citiranih vankuverskim stilom.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršeno je ispitivanje uticaja promenljivih parametara (temperatura i dužina termičke obrade) različitih termičkih tretmana (kuvanje, pečenje, prženje) namirnica bogatih skrobom na formiranje akrilamida primenom unapredene metode gasne

hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i gasne hromatografije sa azot-fosforom detektorom (NPD). Pokazano je da na temperaturi od 250 °C u namirnicama bogatim škrobom, kao što je krompir, dolazi do povećane sinteze akrilamida, a smanjenjem temperature prženja sa 250 °C na 170 °C smanjuje se sadržaj akrilamida, pri čemu prehrambeni proizvod postaje manje privlačan za konzumaciju jer se pogoršavaju njegove organoleptičke osobine (boja, ukus, hrskavost). Povećanjem temperature i vremena termičkog tretmana povećava se sinteza akrilamida, pri čemu porast temperature ima izraženiji efekat na sintezu akrilamida nego povećanje vremena termičkog tretmana na konstantnoj temperaturi.

Kao efektivan korak prečišćavanja korišćena je ekstrakcija na čvrstoj fazi, a sadržaj akrilamida je određivan GC-MS metodom uz derivatizaciju smanjenom količinom broma kao derivat 2-brompropen amida (2-BPA) uz predhodnu optimizaciju potrebnih količina broma za pripremu uzoraka. U cilju određivanja optimalne zapremine bromne vode, vršeno je opterećivanje uzorka kukuruznog hleba koji je sadržao 29.5 µg/kg akrilamida sa 40 µg akrilamida koji je pripremljen sa 5 različitih zapremina bromne vode, a kao odgovor, praćen je prinos ekstrakcije izražen kao “*Recovery*“ vrednost. Dobijeni rezultati za ispitivane parametre validacije potvrđuju pouzdanost metode, a ova validirana GC-MS metoda primenjena je u međulaboratorijskom ispitivanju devet uzoraka namirnica na sadržaj akrilamida.

U ovom radu primenjena je i GC-NPD metoda za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim uzorcima krompira. Opisana metoda predstavlja naučni doprinos analitici akrilamida jer je do sada publikovan veoma mali broj radova u kojima je opisana primena NPD detektora za određivanje akrilamida. Akrilamid je identifikovan na osnovu retencionog vremena (9,68 min), čime je postignuta neophodna specifičnost metode, a linearnost je dobijena u opsegu 0,30 – 10 mg/kg. Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osetljivosti i tačnosti, pa je zbog toga veoma pogodna za praktičnu primenu u laboratorijama za kontrolu hrane.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Nastajanje akrilamida u termički tretiranim namirnicama prati se od 2002 godine kada su Stadler i sar. (1) i Mottram i sar. (2) prikazali mehanizam nastanka akrilamida u namirnicama pri

Maillard-ovoj reakciji, uz pretpostavku da se akrilamid sintetiše na temperaturama iznad 100°C u prisustvu aminokiseline asparagina. U ovoj doktorskoj disertaciji demonstrirano je značajano povećanje koncentracije akrilamida sa porastom temperature prženja u ulju između 190°C i 250°C, u trajanju tretmana između 3 i 15 minuta, pri čemu visoka temperatura i duže vreme prženja dovode do povećane sinteze akrilamida, a porast temperature ima izraženiji efekat na sintezu akrilamida u gotovom proizvodu nego povećanje vremena termičkog tretmana na konstantnoj temperaturi. Dobijeni rezultati sugerišu da temperatura ulja pri prženju namirnica bogatih škrobom ne bi trebalo da prelazi 170 do 175° C, ali, sa druge strane, kod tako pripremljenih proizvoda organoleptička svojstva nisu prihvatljiva za konzumaciju, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (3-8).

Mala molekulska masa akrilamida, njegova visoka reaktivnost i nedostatak hromofora su izazovi u kvantifikaciji akrilamida u malim koncentracijama u kojima je prisutan u namirnicama. Izbor optimalnih uslova za ekstrakciju i odgovarajućih koraka za prečišćavanje uzoraka su od posebne važnosti za adekvatnu pripremu uzoraka. Voda i različite kombinacije vode i organskih rastvarača su najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju uglavnom na sobnoj temperaturi, a u literaturi su prikazane ekstrakcione procedure u kojima je posebna pažnja posvećena „bubrenju“ uzorka u vodi na temperaturi od 70° C (9-11). U literaturi postoji relativno mali broj metoda za pripremu uzoraka metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi koja je kao brza i jednostavna separaciona tehnika primenjena u ovom radu. Ekstrakcija na čvrstoj fazi daje čistije uzorke i dovodi do slabije supresije jona u odnosu na metode tečno-tečne ekstrakcije (12).

Za kvantitativno određivanje akrilamida u namirnicama u literaturi se preporučuje metoda tečne hromatografije u tandemu sa dvostukom masenom spektrometrijom LC-MS/MS kao separaciona metoda za detekciju akrilamida u SIM (eng. *Selected Ion Monitoring*) modu. (12-15). Primena GC metoda ima određene prednosti jer su GC instrumenti relativno jeftini i dostupni većini bromatoloških laboratorija (16-17). Kvantifikacija akrilamida u namirnicama GC-MS metodama se može izvoditi sa ili bez primene derivatizacije u pripremi uzoraka. Prednost postupka derivatizacije se ogleda u tome što se povećava molekulska masa, što rezultira, osim veće rastvorljivosti i većom selektivnošću metode. Derivatizacija se najčešće izvodi bromovanjem pri čemu je bromovani akrilamid manje polaran nego početna komponenta i samim tim se bolje rastvara u nepolarnim organskim rastvaračima. Međutim, sa druge strane, derivatizacija je vremenski zahtevan proces jer višak broma mora biti odstranjen nakon reakcije.

U ovoj disertaciji razvijena je optimizovana GC-MS metoda uz predhodnu derivatizaciju uzorka smanjenom količinom broma, čime se skraćuje vreme pripreme uzoraka, kao i moguće izlaganje analitičara toksičnim parama broma. Dobijene vrijednosti za LoD i LoQ od 6,86 µg/kg i 10,78 µg/kg metode su bliske literaturnim vrednostima.

Do sada je publikovan veoma mali broj radova u kojima je opisana primena NPD detektora za određivanje akrilamida (18). Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osetljivosti i tačnosti, a zbog kraćeg trajanje analize i ekonomičnosti (ušteda rastvarača, manje otpada) veoma je pogodna za praktičnu primenu u laboratorijama za kontrolu hrane.

Dobijeni rezultati određivanja sadržaja akrilamida u namirnicama bogatim škrobom u korelaciji su sa rezultatima publikovanih radova.

Literatura

1. Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, J. A.; Robert; M.C.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, 419, 449
2. Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L., Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002, 419, 448.
3. Matthäus, 2002. BAGKF, Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel und Fettforschung. Available at: http://www.bfr.bund.de/cm/343/acrylamidgehalte_von_im_backofen_zubereiteten_pommes_frites_und_von_reibekuchen.pdf
4. Lim PK, Jinap S, Sanny M, Tan Cp and Khatib A, 2014. The influence of deep frying using various vegetable oils in acrylamide formation sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) chips. *Journal of Food Science*, 79, 115–121
5. Yuan Y, Zhang H, Miao Y and Zhuang H, 2014. Study on the methods for reducing the acrylamide content in potato slices after microwaving and frying processes. *RSC Advances*, 4, 1004–1009.
6. Ahn J. S., Castle L., Clarke D. B., Lloyd A. S., Philo M. R., Speck D. R., 2002. Verification of findings of acrylamide in heated foods. *Food Addit. Contam. Part A*. 19, 1116 - 1124.
7. Jackson LS and Al-Taher F, 2005. Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. In: *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Eds Friedman M and Mottram D, Springer - Business Media Inc., 447–465.

8. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733.
9. Zhang Y, Zhang G and Zhang Y, 2005. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075, 1–21.
10. Tekkeli SEK, Önal C and Önal, A, 2012. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5, 29–39.
11. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733.
12. Young M. S., Jenkins K. S., Mallet C. R., 2004. Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC International B* 87, 961-964.+
13. Gokmen V, Senyuva H.Z, Acar J, Sarioglu K, 2005. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1088 193-199.
14. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733
15. Arvanitoyannis IS and Dionisopoulou N, 2014. Acrylamide: formation, occurrence in food products, detection methods, and legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 708–733.
16. Zhang Y, Zhang G and Zhang Y, 2005. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods. Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075, 1–21.
17. Tekkeli SEK, Önal C and Önal, A, 2012. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Analytical Methods*, 5, 29–39.
18. Kim S. H., Hwang V, K. Lee G., 2011. Analysis of acrylamide using gas chromatography – nitrogen phosphorus detector (GC-NPD), *Food. Sci. Biotechnol.* 20 835-839.

C. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Akrilamid se sintetiše iz slobodne aminokiseline asparagina i redukujućih šećera, tokom termičkih tretmana na visokim temperaturama kao što su pečenje i prženje u ulju namirnica bogatih skrobom. Od strane međunarodne agencije za istraživanje kancera (IARC) akrilamid je svrstan u grupu 2A - kao verovatno kancerogen za čoveka, a njegovo formiranje u termički tretiranim namirnicama prati se od 2002 godine. Prema preporuci Evropske Komisije u zemljama EU sprovodi se obavezan monitoring akrilamida u hrani uz obavezu dostavljanja rezultata Evropskom autoritetu za bezbednost hrane (EFSA).

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršeno je ispitivanje uticaja promenljivih parametara (temperatura i dužina termičke obrade) različitih termičkih tretmana (kuvanje, pečenje, prženje) na formiranje akrilamida u namirnicama bogatim skrobom, što predstavlja doprinos izučavanju kinetike formiranja akrilamida u hrani tokom različitih termičkih tretmana koji se tradicionalno koriste u pripremanju hrane u našem regionu.

Mala molekulska masa akrilamida, njegova visoka reaktivnost i nedostatak hromofora su analitički izazovi u kvantifikaciji akrilamida u malim koncentracijama u kojima je prisutan u namirnicama. Naučni doprinos analitici akrilamida u hrani predstavlja razvoj optimizovana GC-MS metode uz predhodnu derivatizaciju uzorka smanjenom količinom broma, čime se skraćuje vreme pripreme uzoraka, kao i moguće izlaganje analitičara toksičnim parama broma. U ovoj disertaciji razvijena je i GC-NPD metoda za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim uzorcima krompira. Opisana metoda predstavlja naučni doprinos analitici akrilamida jer je do sada publikovan veoma mali broj radova u kojima je opisana primena NPD detektora za određivanje akrilamida u hrani. Predložena metoda, takođe, ima zadovoljavajuće karakteristike u pogledu osetljivosti i tačnosti, pa je zbog toga veoma pogodna za praktičnu primenu u laboratorijama za kontrolu hrane.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi u međunarodnim časopisima:

1. **Delević Veselin M., Zejnilović Refik M., Jančić-Stojanović Biljana S., Đorđević Brižita I., Tokić Zorana N., Zrnić-Ćirić Milica D., Stanković Ivan M.** Quantification of acrylamide in foods selected by using gas chromatography tandem mass spectrometry *Hemijska Industrija* 2015. Rad prihvaćen za publikovanje: 06.05.2015, DOI:10.2298/HEMIND150225027D
2. **Delević Veselin M., Zejnilović Refik M., Jančić-Stojanović Biljana S., Zrnić-Ćirić Milica D., Đorđević Brižita I., Stanković Ivan M.** The effect of heat treatments on the synthesis of acrylamide and its quantification by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. *Hemijska Industrija* 2015. Rad prihvaćen za publikovanje: 25.02.2015, DOI:10.2298/HEMIND141215009D

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Pregledom završene doktorske disertacije, može se konstatovati da je kandidat uspešno ostvario postavljene ciljeve, što je potkrepljeno objavljivanjem rezultata disertacije u naučnim časopisima međunarodnog značaja. Na osnovu izloženog, može se zaključiti da rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti analitike akrilamida u hrani.

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu dipl. hem. Veselinu Deleviću, specijalisti sanitarne hemije, javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Ispitivanje uticaja termičkog tretmana na nastajanje akrilamida u namirnicama sa visokim sadržajem skroba primenom unapredene metode gasne hromatografije“.

1. _____

Dr sc. Ivan Stanković (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

2. _____

Dr sc. Brižita Đorđević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr Biljana Stojanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

4. _____

Dr Refik Zejnilović, redovni profesor, Univerzitet u Podgorici - Farmaceutski fakultet

U Beogradu, 11.09.2015.