

# Kvantifikacija akrilamida u izabranim namirnicama primenom gasne hromatografije u tandemu sa masenom spektrometrijom

Veselin M. Delević<sup>1</sup>, Refik M. Zejnilović<sup>2</sup>, Biljana S. Jančić-Stojanović<sup>3</sup>, Brižita I. Đorđević<sup>4</sup>, Zorana N. Tokić<sup>5</sup>, Milica D. Zrnić-Ćirić<sup>4</sup>, Ivan M. Stanković<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut za javno zdravlje, Podgorica, Crna Gora

<sup>2</sup>Univerzitet Crne Gore, Farmaceutski fakultet, Podgorica, Crna Gora

<sup>3</sup>Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Srbija

<sup>4</sup>Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za bromatologiju, Srbija

<sup>5</sup>Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za Organsku hemiju, Srbija

## Izvod

Akrilamid je toksično i verovatno kancerogeno jedinjenje koje nastaje termičkim tretmanom namirnica bogatih ugljenim hidratima na visokim temperaturama. U ovom radu prikazana je unapređena metoda za ekstrakciju i kvantifikaciju akrilamida iz namirnica proizvedenih na bazi kukuruznog brašna koje su zastupljene u našoj tradicionalnoj ishrani. Derivatizacija akrilamida sa bromom je izvedena sa smanjenom zapreminom zasićenog rastvora bromne vode čime je značajno smanjena toksičnost ovog dela pripreme uzoraka. Kvantifikacija je urađena osetljivom GC-MS metodom. Kvantifikaciji akrilamida GC-MS metodom predhodile su: homogenizacija uzorka, ekstrakcija akrilamida vodom, prečišćavanje ekstrakta pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi, bromovanje (koristeći smanjenu zapreminu rastvora bromne vode), dehidrobromovanje sa natrijum-tiosulfatom i prevođenje 2,3-dibrompropenamida u 2-brompropenamid pomoću trietilamina. Kalibracija je vršena u opsegu koncentracija 5–80 µg/kg. Dobijena je sledeća jednačina prave  $y = 0,069x + 0,038$  sa koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,999$ . Dobijena granica detekcije bila je 6,86 µg/kg, a granica kvantifikacije 10,78 µg/kg. Takođe, ispitana je i tačnost metode a dobijene *Recovery* vrednosti bile su prosječno od 97 do 110%. Predložena GC-MS metoda je jednostavna, pouzdana i precizna za određivanje akrilamida u uzorcima termički tretiranih namirnica. Dobijeni rezultati pokazuju da se u ispitivanim namirnicama kvantifikuje prisustvo akrilamida u koncentracijama od 18 do 77 µg/kg u zavisnosti da li je namirnica pripremljena kuvanjem ili pečenjem.

**Ključne reči:** akrilamid, optimizacija bromovanja, GC-MS metoda, termički tretirane namirnice.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Grupa istraživača Švedske Agencije za bezbednost hrane i Univerziteta u Stokholmu 2002. godine objavili su naučnu javnost da su kvantifikovali visoke koncentracije akrilamida u termički tretiranim namirnicama bogatim ugljenim hidratima, što je privuklo veliku pažnju jer je akrilamid od strane međunarodne Agencije za istraživanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IRAC) svrstan u grupu 2A kao verovatno kancerogen za ljude [1,2].

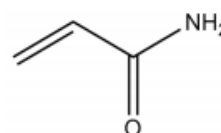
Akrilamid (2-propenamid, slika 1) nastaje tokom termičkih tretmana namirnica na visokim temperaturama reakcijom između redukujućih šećera i amino kiseline asparagina takozvanom Maillard-ovom reakcijom. Danas je pokrenuto nekoliko naučnih inicijativa da bi se u potpunosti razumela njegova hemija i toksikologija,

NAUČNI RAD

UDK 613.263:547–327:661.717.53:  
543

*Hem. Ind.* 70 (2) 209–215 (2016)

doi: 10.2298/HEMIND150225027D



Slika 1. Molekulska struktura akrilamida.  
Figure 1. Molecular structure of acrylamide.

fokusirajući se prvenstveno na njegove mehanizme formiranja i moguće posledice po ljude. Ispitivanja na životinjama su pokazala da visoke doze akrilamida (> 203 µg/kg) imaju nepoželjne efekte na razvojne funkcije u neonatalnom periodu kod glodara. S druge strane, epidemiološke studije za različite vrste kancera nijesu pokazale vezu između ishranom unešenog akrilamida i pojave kancera [3,4]. Međutim, došlo se do zaključka da standardne epidemiološke studije imaju nisku statističku validnost kako bi se utvrdila povezanost pojave raka sa izloženošću akrilamidu [5]. Imajući ovo u vidu Zajednički FAO/WHO ekspertski komitet za aditive (eng. Joint FAO/WHO Expert Committee on

Prepiska: V.M. Delević, Institut za javno zdravlje, ulica Džona Džeksona b.b., 20000 Podgorica, Crna Gora.

E-pošta: [delevic@t-com.me](mailto:delevic@t-com.me)

Rad primljen: 25. februar, 2015

Rad prihvaćen: 6. maj, 2015

Food Additives, JECFA) istakao je važnost dobijanja što više validnih podataka o sadržaju akrilamida u namirnicama koje se konzumiraju u zemljama u razvoju kao vredan instrument u obavljanju procene unosa, kako bi se redukovala izloženost ljudi [6].

Akrilamid nastaje u namirnicama tokom termičkih tretmana na visokim temperaturama kao što je pečenje ili prženje u ulju. Na formiranje akrilamida u namirnicama pored termičkih tretmana utiče i prisustvo amino kiseline (asparagina) i redukujućih šećera. Amino kiselina asparagin je glavni prekursor za nastajanje akrilamida u prisustvu redukujućih šećera. Međutim, neke studije su pokazale da akrolein, akrilne kiseline i druge amino kiseline kao što su alanin i arginin su takođe mogući prekursori nastanka akrilamida [5].

Poslednjih deset godina u svetu se intenzivno radi na razvoju analitičkih metoda za kvantifikaciju akrilamida u različitim vrstama termički tretiranih namirnica koje su dominantno HPLC ili GC metode [9], kao i u namirnicama koje nisu termički tretirane, vodi za piće i biološkom materijalu [7,8]. Prikaz GC i HPLC metoda, kao i elektroforetskih metoda za određivanje akrilamida u različitim uzorcima dat je u preglednom radu [10]. Pored toga, opisani su i različiti postupci pripreme uzoraka kao što su ekstrakcija sa *n*-propanolom [11], ekstrakcija sa *n*-heksanom i vodenim rastvorom natrijum-hlorida [12], ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. Solid Phase Extraction – SPE) [13,14], ekstrakcija sa metanolom, prečišćavanje sa rastvorom Carrez I i II [15], itd. Za kvantifikaciju akrilamida pomoću GC–MS (eng. gas chromatography–mass spectrometry) ili LC–MS–MS (eng. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry) metode većina istraživača predlaže pripremu uzoraka u više faza. Sve do sada publikovane GC–MS metode za određivanje akrilamida u namirnicama možemo podeliti u dve kategorije, one koje uključuju derivatizaciju i one bez primene derivatizacije. Metode za određivanje akrilamida bez derivatizacije zahtevaju dugotrajne ekstrakcije koje mogu trajati u nekim slučajevima i do deset dana [16]. Metode sa derivatizacijom imaju prednosti jer omogućavaju kvantifikaciju akrilamida i do nivoa tragova [17–19]. Međutim, derivatizacija bromovanjem podrazumeva upotrebu broma u laboratorijskom radu čije pare ako se udišu mogu biti opasne po analitičara, stoga, čini se da brom treba koristiti što je moguće manje u laboratorijskim eksperimentima. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC–MS) je jedna od najosetljivijih metoda korištenih za kvantifikaciju akrilamida u uzorcima životnih namirnica [20].

Cilj ovog rada bio je da se unapredi GC–MS metoda za određivanje akrilamida iz termički tretiranih namirnica. U tom cilju urađena je optimizacija postupka bromovanja čime je potvrđeno da se sa manjim zapreminama broma mogu dobiti tačni i precizni rezultati.

Postupak pripreme uzoraka podrazumevao je četiri faze nakon šega je primenjena GC–MS metoda. GC–MS metoda je validirana i primenjena za analizu različitih uzoraka.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Aparatura i reagensi

Za određivanje akrilamida korišćen je gasni hromatograf Shimadzu GC–MS model QP2010 plus (Shimadzu Inc., Koyoto, Japan), sa kapilarnom kolonom HP-5 MS (30 m×0,25 mm×0,25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Obrada podataka i kontrola GC–MS sistema vršena je pomoću softvera „Lab solution“ (Shimadzu Inc., Koyoto, Japan). Kao standard korišćen je rastvor akrilamida (čistoće > 99,8%) proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kao interni standard korišćen je rastvor izotopa akrilamida – [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>], koncentracije 1mg/ml u metanolu (H<sub>2</sub><sup>13</sup>C=<sup>13</sup>CH<sup>13</sup>CONH<sub>2</sub>) proizvođača Sigma–Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Organski rastvarači: *n*-heksan, metanol, etil-acetat, kao i kalijum-bromid, natrijum-tiosulfat, trietilamin i anhidrovani natrijum-sulfat takođe su od proizvođača Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kertridži za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE) su OASIS MCX 3cc (60 mg) i tečna faza OASIS HLB 6cc (200 mg) su od proizvođača Waters Corporation (Massachusetts, USA). Kalijum-bromid i natrijum-sulfat su izareni na 600 °C u trajanju od 6 sati pomoću peći za žarenje (Carbolite Furnaces; Chelmsford/Essex, England). Ostali reagensi su korišteni bez daljeg prečišćavanja.

### Priprema rastvora

Osnovni standard akrilamida koncentracije 1 mg/ml pripremljen je rastvaranjem u etil-acetatu. Radni rastvor pripremljen je rastvaranjem osnovnog rastvora standarda u opsegu koncentracija od 5 do 80 μg/dm<sup>3</sup> u etil-acetatu.

Interni standard izotopa akrilamida [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] koncentracije 4 mg/dm<sup>3</sup> dodat je ispitivanom uzorku u količini od 10 μl i dobijena je koncentracija internog standarda od 40 μg/dm<sup>3</sup>.

### Postupak optimizacije zapremine bromne vode u postupku derivatizacije akrilamida

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

Tabela 1. Recovery vrednost za akrilamid u uzorku pripremljenom sa 5 različitih zapremina bromne vode  
 Table 1. Recovery value for acrylamide in a specimen prepared from 5 different brominated flame-volume water

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

### Postupak pripreme uzoraka

Akrilamid je kvantifikovan kao derivat 2-brompropen amida (2-BPA) po metodi Pittet i dr. [20] i Yong i dr. [21] uz određene modifikacije koje su urađene u cilju unapređenja metode.

Prvo unapređenje jeste smanjena zapremina bromne vode u fazi bromovanja. Drugo unapređenje sastoji se u upotrebi SPE ekstrakcije umesto rastvora Carrez I i II kako je to bilo u predhodno publikovanoj metodi [20].

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

**Faza 1.** Homogenizacija i dodavanje internog standarda: Izmeri se 20 g dobro homogenizovanog uzorka i ostavi da bubri upijajući 200 ml dejonizovane vode (70 $\pm$ 1 °C) u trajanju od najmanje 60 min. Smeša se ponovo dobro izhomogenizuje pomoću homogenizatora Ultra-turrax (IKA-T25 Basel, Switzerland). 1 g homogenizovane smeše se prenese u kivetu za centrifugiranje, doda se 3 ml 2M NaCl i smeša se ponovo homogenizuje. Zapremina od 10  $\mu$ l internog standard koncentracije 4 mg/dm<sup>3</sup> izotopa [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>] akrilamida doda se u smešu i smeša se homogenizuje na vorteks mikseru (Stuart Scientific, Manchester, England) u toku 1 min. U smešu se doda 40  $\mu$ g/kg odnosno 40 ng/g internog standarda.

**Faza 2.** Prečišćavanje: Smeša koja sadrži interni standard centrifugira se na 10000 obrtaja pomoću centrifuge (Sigma, Gillingham Dorset, UK) u trajanju od 30 min. Dobijeni supernatant se filtrira kroz stakleni filter pora 0,45 $\mu$ m (Witeg Labortechnik GmbH, Germany) kako bi se izdvojila eventualno zaostala mast. Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi (HLB, MCX) kondicioniraju se najprije sa 3 ml metanola zatim sa 3 ml vode. Nakon kondicioniranja, na kolonu se nanosi uzorak filtrata, a zatim se vrši eluiranje sa 50 ml dejonizovane vode. U eluat se zatim doda 7,5 g kalijum-bromida čija je pH vrednost podešena na pH 2,0 dodavanjem oko 15 kapi 47% bromovodonične kiseline.

**Faza 3.** Bromovanje: Ekstraktima uzoraka se uz mešanje doda po 2 ml zasićenog rastvora bromne vode

(1,6 vol.%). Uzorci se čuvaju na 0 °C u trajanju od 24 h kako bi se završila reakcija bromovanja.

**Faza 4.** Finalno prečišćavanje za GC–MS određivanje: Nakon završetka reakcije bromovanja višak broma ukloni se dodavanjem 5 kapi 1 M natrijum-tiosulfata dok nestane žuta boja. Zatim se doda po 10 g anhidrovanog natrijum-sulfata i smeša se dobro izmeša. Smeša se prenese u levak za odvajanje zapremine 250 ml, doda se 20 ml smeše etil-acetat/heksan (4:1, V/V) i dobro se izmeša. Organska faza se zatim prenese u kivetu za centrifugiranje u kojoj je odmereno 4 g anhidrovanog natrijum-sulfata. Ovaj korak se ponovi dva puta sa po 20 ml smeše etil-acetat/heksan (4:1, V/V). Smeša se centrifugira i dekantuje kroz stakleni filter papir i upari do suva pomoću rotacionog vakum uparivača (Rotavapor R-124; Buchi, Switzerland). Suvi ostatak se rastvori u 50  $\mu$ l trietilamina i 450  $\mu$ l etil-acetata. Pripremljeni ekstrakti se čuvaju u zamrzivaču na –20 °C do GC–MS analize.

### Postupak GC–MS analize

Nakon stabilizovanja GC–MS sistema uradi se kalibracija. Svi potrebni parametri (vremenske funkcije, izbor metode izračunavanja, atenuacije i dr.) unesu se softverskom metodom koja omogućava praćenje razdvajanja akrilamida. Hromatografski uslovi su navedeni u tabeli 2.

Tabela 2. Uslovi hromatografskog postupka  
 Table 2. Terms chromatographic procedure

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

### Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćeni su programi Microsoft Office Excel i Statistica. Primijenjene su regresiona i korelaciona analiza.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim uzorcima proizvedenim na bazi kukuruznog brašna primenjena je GC–MS metoda. Kao što je navedeno u uvodu, cilj je bio da se razvije metoda koja će

biti brža i ekonomičnija od uobičajenih metoda i koja će zahtevati manju količinu broma za fazu derivatizacije akrilamida. Iz tog razloga, urađena je optimizacija bromovanja prema proceduri opisanoj u Eksperimentalnom delu, a korišćene zapremine bromne vode, kao i dobijeni rezultati za *Recovery* vrednosti prikazane su u tabeli 1.

Na osnovu rezultata zaključeno je sledeće: srednja *Recovery* vrednost za 1 ml bromne vode bila je 70,6% što je dosta nisko dok je *Recovery* vrednost za zapreminu bromne vode od 2 ml, bio prihvatljivih 89,2%. Dalje povećanje zapremine bromne vode dovodi do povećanja *Recovery* vrednosti, ali kako su sa zapreminom od 2 ml bromne vode dobijene reproduktivne vrednosti sa zadovoljavajućom *Recovery* zaključeno je da nije potrebno raditi sa većim zapreminama. Za izvođenje ekstrakcije akrilamida iz različitih vrsta namirnica, drugi istraživači koristili su 15 ml bromne vode [2,7,18–21]. Na ovaj način postignuto je značajno unapređenje s obzirom na činjenicu da je ovaj reagens toksičan za okolinu.

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

#### Validacija metode

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

Dalje, urađena je verifikacija vrednosti *LoD* i *LoQ*. Za verifikaciju *LoD* i *LoQ* pripremljen je radni standard (veštački uzorak) koji sadrži 5 µg kg<sup>-1</sup> akrilamida. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Verifikacija granice detekcije i granice kvantifikacije  
Table 3. Verification of limits of detection and limit of quantification

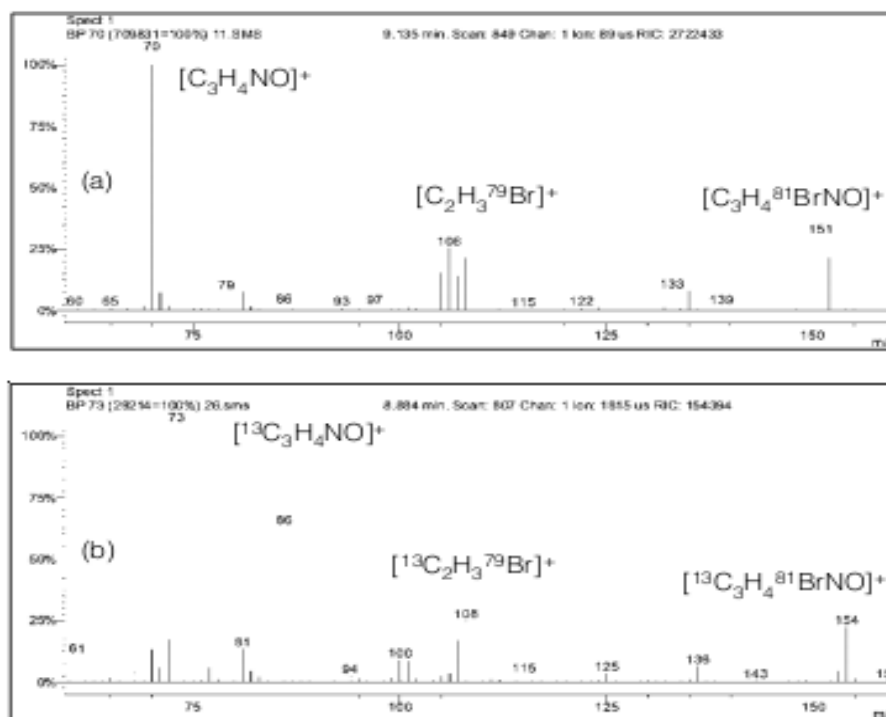
Parametar	Koncentracija, µg/kg
Radni rastvor akrilamida koncentracije 5 µg/kg	4,46
	5,54
	5,53
	5,58
	5,54
	4,44
<i>X<sub>sr</sub></i>	5,18
<i>RSD</i>	0,56

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

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

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

U narednoj fazi urađena je procjena linearnosti metode. Zavisnost odnosa površina pikova *m/z* 151 i 154) i koncentracije akrilamida ispitana je regresionom analizom i dobijena je linearna kalibraciona kriva sa



Slika 2. GC–MS spektri za: a) 2-brompropenamid (2-BPA) i b) 2-BP[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]A.  
Figure 2. GC–MS spectra of a) 2-brompropenamid (2-BPA) and b) 2-BP[<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]A.

koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,999$ . Kalibracija je vršena u opsegu koncentracija od 5–80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (5, 20, 40, 60 i 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i dobijena je jednačina prave:  $Y = 0,069x + 0,038$ .

Tačnost metode procenjena je na taj način što je uzorak kukuruznog hleba koji je sadržao 29,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  akrilamida opterećen sa 10, 20 i 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  akrilamida i dobijene vrijednosti su prikazane u tabeli 4. Vrijednosti dobijene iz šest paralelno urađenih ekstarkcija kvantitativno su obrađene GC–MS postupkom.

Vrijednosti za Recovery dobijene za tri nivoa koncentracija potvrđuju da je metoda tačna. Dobijeni rezultati za ispitivane parametre validacije potvrđuju pouzdanost metode pa je validirana GC–MS metoda primenjena za određivanje sadržaja akrilamida u izabranim namirnicama proizvedenim na bazi kukuruznog brašna kao što su kukuruzni hleb, kornfleks, palenta, projice sa sirom i projice sa sirom i spanaćem. U tabeli 5

prikazana je koncentracija akrilamida u ispitivanim namirnicama. Rezultati ispitivanja pokazuju da je akrilamid detektovan u svim uzorcima, minimalna vrednost akrilamida (18,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) je detektovana je kod palente, a maksimuma (77,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) kod kornfleksa. Ove vrijednosti su značajno niže nego kod namirnica proizvedenih dominantno od pšeničnog brašna što je posledica smanjenog sadržaja sirovih proteina u kukuruznom brašnu, pa je i mogućnost sinteze akrilamida manja.

#### ZAKLJUČAK

U ovom radu prikazana je GC-MS metoda za određivanje sadržaja akrilamida u termički tretiranim namirnicama. U radu je opisano unapređenje faze bromovanja u smislu smanjenja upotrebe reagensa koji se smatra toksičnim. Takođe, primenjena je SPE metoda u fazi pripreme uzorka čime je postupak značajno pojed-

Tabela 4. Recovery vrednost za akrilamid u opterećenim uzorcima kukuruznog hleba  
Table 4. Recovery value for acrylamide in loaded samples cornbread

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

Tabela 5. Koncentracija akrilamida u ispitivanim namirnicama  
Table 5. The concentration of acrylamide in foods tested

Uzorak	Broj uzoraka	Opseg konc. akrilamida, $\mu\text{g kg}^{-1}$	Srednja vrijednost $\pm$ SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	SD / %
Kukuruzni hleb	13	26,7–31,5	27,0 $\pm$ 1,7	1,7
Kornfleks	7	69,0–77,5	72,8 $\pm$ 4,2	4,2
Palenta	5	18,1–23,8	20,4 $\pm$ 1,9	1,9
Projice sa sirom i spanaćem	8	29,0–35,8	31,6 $\pm$ 2,3	2,3
Projice sa sirom	9	27,9–35,0	31,1 $\pm$ 2,4	2,4

nostavljen i veoma je prihvatljiv za praktičnu primenu. GC–MS metoda je validirana sa limitom detekcije 6,86 µg/kg čime je potvrđena i njena osetljivost. Na kraju, metoda je uspešno primenjena za ispitivanje sadržaja akrilamida u različitim uzorcima kao sto su krompir, čips, hleb, itd.

## LITERATURA

- [1] IARC. Monographs on the evaluation of carcinogen risk to humans [serial on the Internet]. 2011. Available from: <http://monographs.iarc.fr/>
- [2] Swedish National Food Administration (SNFA). Information about acrylamide in food Uppsala [serial on the Internet]. Available from: <http://www.slv.se>
- [3] H. Mojska, I. Gielecinska, L. Zsponar, M. Oltarzewski, Estimation of the dietary acrylamide exposure of the Polish population, *Food. Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2090–2096.
- [4] Food Standards Agency. Study of acrylamide in food [serial on the Internet], 2010, Available from: <http://www.food.gov.uk>
- [5] Scientific Committee on food. Opinion of the SCF on new findings regarding the presence of acrylamide in food [serial on the Internet]. 2010. Available from: <http://www.europa.eu.int>
- [6] FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation/World Health Organization). Summary and conclusions report of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 1-16, 2010, Available from <http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/output/en.asp>
- [7] N. Marchettini, S. Focardi, M. Guarnieri, C. Guerranti, G. Perra, Determination of acrylamide in local and commercial cultivar of potatoes from biological farm, *Food Chem.* **136** (2013) 1426–1428.
- [8] C. Laurence, E. Sune, Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in Foods, *J. AOAC. Int.* **88** (2005) 274–284.
- [9] Y. Zhang, G. Zhang, Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods review and recent developments, *J. Chromatogr., A* **1075** (2005) 1–21.
- [10] S.E. Kepekci Tekkeli, C. Onal, A. Onal, A Review of current methods for the determination of acrylamide in food products, *Food. Anal. Methods.* **5** (2012) 29–39.
- [11] L. Dunovska, T. Cajka, J. Hajslova, K. Holadova, Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **578** (2006) 234–240.
- [12] Y. Zhang, Y. Dong, Y. Ren, Y. Zhang, Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector, *J. Chromatogr., A* **1116** (2006) 209–216.
- [13] C.M. Soares, R.C. Alves, S. Casal, M.B. Oliveira, J.O. Fernandes, Development and validation of a matrix solid-phase dispersion method to determine acrylamide in coffee and coffee substitutes, *J. Food. Sci.* **75** (2010) 57–63.
- [14] E.K. Paleologos, M.G. Kontominas, Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection, *J. Chromatogr., A* **1077** (2005) 128–135.
- [15] V. Gokmen, H.Z. Senyuva, J. Acar, K. Sarioglu, Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., A* **1088** (2005) 193–199.
- [16] J.R. Pedersen, J.O. Olsson, Soxhlet extraction of acrylamide from potato chips. *Analyst* **128** (2003) 332–334.
- [17] L. Castle, M.J. Campos, J. Gilbert, Determination of acrylamide Monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **54** (1991) 549–555.
- [18] L. Castle, Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel. *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 1261–1263.
- [19] J.S. Ahn, L. Castle, D.B. Clarke, A.S. Lloyd, M.R. Philo, D.R. Speck, Verification of findings of acrylamide in heated foods. *Food Addit. Contam., A* **19** (2002) 1116–1124.
- [20] A. Pittet, A. Périsset, J.M. Oberson, Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* **1035** (2004) 123–130.
- [21] M.S. Young, K.S. Jenkins, C.R. Mallet, Solid–phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int., B* **87** (2004) 961–964.
- [22] Scientific Committee on food. Opinion of the SCF on new findings regarding the presence of acrylamide in food [serial on the Internet]. 2010, Available from: <http://www.europa.eu>
- [23] International Conference on Harmonization, Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology; Availability, *Federal Register* **62** (1997) 27463–27467.

**SUMMARY****QUANTIFICATION OF ACRYLAMIDE IN FOODS SELECTED BY USING GAS CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Veselin M. Delević<sup>1</sup>, Refik M. Zejnilović<sup>2</sup>, Biljana S. Jančić-Stojanović<sup>3</sup>, Brižita I. Đorđević<sup>4</sup>, Zorana N. Tokić<sup>5</sup>, Milica D. Zrnić-Ćirić<sup>4</sup>, Ivan M. Stanković<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Public Health, Podgorica, Montenegro*

<sup>2</sup>*Faculty of Pharmacy, Podgorica, Montenegro*

<sup>3</sup>*Department of Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

<sup>4</sup>*Department of Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

<sup>5</sup>*Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

Acrylamide is toxic and probably carcinogenic compound, made as a result of high-temperature thermal treatment of carbohydrate-rich foodstuffs. In this article a method is improved for the extraction and quantitation of acrylamide in foods produced based on corn flour that are represented in our traditional diet. Acrylamide extraction was carried out using reduced volume of saturated solution of bromine water and the GC–MS method for the quantification was shown. Quantification of acrylamide was preceded by: sample homogenization, acrylamide extraction using water, extract purification using solid phase extraction, bromination, using a reduced volume of bromine water solution, dehydrobromination with sodium thiosulfate and transformation of dibromopropenamide in 2,3,2-bromopropenamide using triethylamine. Regression and correlation analysis were applied for the probability level of 0.05. Calibration is performed in the concentration range 5–80 µg/kg with a detection limit 6.86 mg/kg and the limits of quantification 10.78 µg/kg and the coefficient of determination  $R^2 > 0.999$ . Calibration curve was obtained:  $y = 0.069x + 0.038$ . Recovery values were an average from 97 to 110%. Proposed GC–MS method is simple, precise and reliable for the determination of acrylamide in the samples of thermal treated foods. Our results show that the tested foods quantify the presence of acrylamide in concentrations of 18 to 77 mg/kg acrylamide depending on whether the food was prepared by cooking or baking.

**Keywords:** Acrylamide • Foods • GC–MS