

Primjena blisko-infracrvene spektroskopije u detekciji akrilamida u hrani

Pavlinić, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:798166>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2018.

Mateja Pavlinić

812/N

**PRIMJENA BLISKO-
INFRACRVE
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
AKRILAMIDA U HRANI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Zavod za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Jasenke Gajdoš Kljusurić i Laboratoriju za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa, Služba za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju, Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar pod stručnim vodstvom dr.sc. Adele Krivohlavek.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof.dr.sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić, na strpljenju, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

PRIMJENA BLISKO-INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI AKRILAMIDA U HRANI

Mateja Pavlinić, 812/N

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je utvrditi primjenjivost blisko-infracrvene spektroskopije (tzv. NIRS) za predikciju udjela akrilamida u prehrambenim proizvodima. Za izradu predikcijskih modela korišteni su blisko-infracrveni (NIR) spektri (904 - 1699 nm) uzoraka proizvoda na bazi krumpira, riže, kukuruza i kave (n=24). Udio akrilamida u uzorcima (120 - 971 µg/kg) određen je UPLC-MS/MS metodom. U kvalitativnim modelima korištena je analiza glavnih komponenata (PCA). Za razvoj kvantitativnih modela korištena je parcijalna linearna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLS regresija). Kvalitativni modeli pokazali su uspješno razdvajanje analiziranih uzoraka, ovisno o osnovnoj sirovini, a pri tom su korišteni nepretprocesirani NIR spektri. Kod kvantitativnih modela, od njih 15 razvijenih, 5 ih je ocijenjeno pogodnima za korištenje u probiru uzoraka s obzirom na udio akrilamida (RPD ≥ 2.4). Najbolji razvijeni PLS model imao je $R^2_{pred} = 0.86$, SEP = 255 µg/kg i RPD = 3. Rezultati rada ukazuju na to da bi se NIRS metoda mogla primijeniti u svrhu uspješnog probira uzoraka s obzirom na udio akrilamida.

Ključne riječi: akrilamid, NIRS, modeliranje, PCA, PLSR

Rad sadrži: 46 stranica, 18 slika, 9 tablica, 42 literaturna navoda, 15 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić

Pomoć pri izradi: Dipl.ing. Ivana Mandić Andačić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić
2. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Doc.dr.sc. Marija Badanjak Sabolović (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

APPLICATION OF NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY IN DETECTION OF ACRYLAMIDE IN FOOD

Mateja Pavlinić, 812/N

Abstract:

The aim of this thesis was to investigate the applicability of near-infrared spectroscopy (NIRS) in prediction of acrylamide content in food. Near-infrared (NIR) spectra (904 - 1699 nm) of samples of products based on potato, rice, corn and coffee (n=24) were used to develop prediction models. Acrylamide content in the samples (120 -971 µg/kg) was determined by UPLC-MS/MS method. For qualitative model development, principal components analysis (PCA) was used. Quantitative models were developed using partial least squares regression (PLS regression). Qualitative models developed using unprocessed NIR spectra showed successful separation of samples based on the main raw material. Out of 15 developed quantitative models, 5 of them ($RPD \geq 2.4$) were evaluated as appropriate for use in screening of products based on acrylamide content. The best developed model had $R^2_{pred} = 0.86$, $SEP = 255 \mu\text{g/kg}$ and $RPD = 3$. The results indicate that NIRS may be used for successful screening of products for acrylamide content.

Keywords: acrylamide, NIRS, modeling, PCA, PLSR

Thesis contains: 46 pages, 18 figures, 9 tables, 42 references, 15 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor*

Technical support and assistance: *Ivana Mandić Andačić BSc*

Reviewers:

1. PhD. *Suzana Rimac Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
3. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
4. PhD. *Marija Badanjak Sabolović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 26 September 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Akrilamid u hrani	2
2.1.1. Način formiranja akrilamida u hrani	3
2.1.2. Strategije za smanjenje koncentracije akrilamida u hrani	4
2.1.2.1. Smanjenje koncentracije reaktanata	4
2.1.2.2. Remećenje reakcije nastanka akrilamida	5
2.1.2.3. Uklanjanje akrilamida iz gotovog proizvoda	5
2.1.3. Regulativa vezana za akrilamide u EU	5
2.1.4. Utjecaj akrilamida na zdravlje	7
2.1.4.1. Toksikokinetika i toksikodinamika	8
2.1.5. Analitičke metode određivanja akrilamida u hrani	11
2.2. Blisko-infracrvena spektroskopija (NIRS) u praćenju kakvoće hrane	12
2.2.1. Specifičnosti NIR spektra	12
2.2.2. Prednosti i nedostaci NIRS-a u praćenju kakvoće hrane	13
2.2.3. Kemometrija kao dodatni alat u obradi NIR spektara	14
2.2.3.1. Analiza glavnih komponenti	14
2.2.3.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLSR, Partial least squares regression)	15
2.2.3.3. Linearna diskriminantna analiza (eng. Linear discriminant analysis, LDA)	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode rada	17
3.2.1. NIR spektroskopija	17
3.2.2. UPLC-MS/MS metoda	17
3.2.3. Obrada podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Rezultati sadržaja akrilamida	21
4.2. Rezultati NIR spektroskopije	22
4.3. Rezultati kemometrije	26
4.3.1. PCA analiza	26
4.3.2. LDA analiza	27
4.3.3. PLS regresija	30
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	42
7. PRILOZI	47

1. UVOD

Niz bolesti povezan je s unosom različitih kontaminanata hranom, a jedan od njih je i akrilamid, kancerogeni spoj koji se u izrazito visokim koncentracijama nalazi u namirnicama koje se peku i prže te pri tom postignu tamniju boju.

Najviše koncentracije akrilamida nalaze se u pečenoj i prženoj hrani i proizvodima od krumpira i žitarica, kao što su prženi krumpirići, kruh, keksi i čips, te u kavi, dok je u mesnim proizvodima njegova koncentracija niska zbog nedostatka prekursora potrebnih za njegovu formaciju.

Sigurnost i kvaliteta hrane važan je čimbenik u proizvodnji i distribuciji hrane te je cilj ovog rada bio utvrditi primjenjivost blisko-infracrvene spektroskopije (tzv. NIRS) kao jedne od nedestruktivnih metoda koja se koristi u kvalitativnoj, ali i kvantitativnoj detekciji određenih molekula, u predikciji udjela akrilamida u prehrambenim proizvodima.

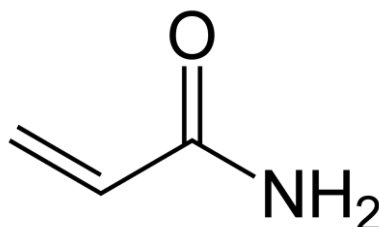
Nedestruktivno mjerenje podrazumijeva direktno mjerenje uzorka hrane bez pretpripreme uzorka ili destrukcije prilikom mjerenja. Tako su različiti uzorci hrane (čips, kava, krekeri i sl.) mjereni NIR sondom te su se spektri pohranjivali u izvornom obliku. Kemometrijske tehnike se koriste izuzetno uspješno u analizi NIR spektara te omogućavaju, ovisno o kemometrijskom postupku, kvalitativno razdvajanje uzoraka na osnovu specifične valne duljine za promatranu molekulu. Druge tehnike omogućit će povezivanje NIR spektra i sadržaja promatranog spoja (akrilamida) te razvoj predikcijskih modela koji kasnije služe za procjenu sadržaja spoja u nepoznatom uzorku.

Upravo navedeno provedeno je i u ovom radu, gdje se pomoću faktorske analize uspješno razdvojilo uzorke hrane s obzirom na izvornu sirovinu i vrstu proizvoda, a korištenjem parcijalne regresije najmanjih kvadrata razvijeno je nekoliko modela predikcije akrilamida koji bi mogli imati primjenu u kvantitativnom probiru uzoraka prehrambenih proizvoda s obzirom na udio akrilamida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Akrilamid u hrani

Akrilamid (C_3H_5NO) je organska molekula male molekulske mase, dobro topiva u vodi (EFSA, 2015). Kao industrijska kemikalija proizvodi se od 1950-ih godina, a najviše se koristi za proizvodnju poliakrilamida koji primjenu nalaze u industriji papira, tekstila, boja, u obradi otpadnih voda, rudarskoj i drugim industrijama (IARC, 1994).



Slika 1. Strukturna formula akrilamida

Zbog već otprije poznate kancerogenosti i neurotoksičnosti, povećana zabrinutost o izloženosti akrilamidu javila se 2002. godine kada je švedska Nacionalna agencija za hranu objavila da je pronađen u hrani. To je potaknulo interes znanstvene zajednice i nova epidemiološka istraživanja kao i istraživanja metabolizma, toksičnosti i izloženosti. (EFSA, 2015).

Akrilamid nastaje u hrani koja se priprema na temperaturama višim od $120^{\circ}C$ pri niskom sadržaju vode, u procesima kao što su pečenje, prženje, roštiljanje, prženje u fritezi i tijekom industrijskih procesa (EFSA, 2015, Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016), a nije prisutan u toplinski neobrađenoj hrani i hrani koja je prošla termičku obradu do $100^{\circ}C$, kao što je kuhanje (Badanjak Sablović i Rimac Brnčić, 2016). S obzirom da su povoljni uvjeti za reakciju niska vlažnost i visoka temperatura, najveća koncentracija akrilamida formira se na površini namirnice (npr. kora kruha), a u pravilu se može reći da je količina akrilamida viša u namirnicama koje su tijekom pečenja ili prženja postigle tamniju boju (HAH, 2015).

Najviše koncentracije akrilamida nalaze se u pečenoj i prženoj hrani i proizvodima od krumpira i žitarica, kao što su prženi krumpirići, kruh, keksi i čips, te u kavi, dok je u mesnim

proizvodima njegova koncentracija niska zbog nedostatka prekursora potrebnih za njegovu formaciju (IFST, 2017) Također se nalazi i u cigaretnom dimu (EFSA, 2015).

2.1.1. Način formiranja akrilamida u hrani

Istraživanja mogućih mehanizama nastanka akrilamida u prehrambenim proizvodima započela su ubrzo nakon njegovog otkrića u hrani, a prvi konkretni dokazi o ključnoj ulozi asparagina predstavljeni su 2002. godine od strane nekoliko nezavisnih istraživačkih skupina (Taeymans i sur., 2004). Prva istraživanja reakcijskih mehanizama Stadlera i suradnika (2002) i Zyzaka i suradnika (2003) pokazala su da akrilamid nastaje tijekom reakcije asparagina s reducirajućim šećerima na visokim temperaturama, a pomoću izotopima označenog asparagina dokazano je da ugljikov lanac i atom dušika u akrilamidu tijekom reakcije asparagina i D-glukoze potječu iz molekule asparagina. Istraživanja su pokazala da je ovo osnovni mehanizam nastanka akrilamida u hrani, odnosno da nastaje Maillardovim reakcijama.

Do njegovog formiranja dolazi prvenstveno tijekom toplinske obrade hrane biljnog podrijetla (krumpira i žitarica) na temperaturama višim od 120°C. Koncentracije reducirajućih šećera (glukoze i fruktoze) i slobodnog asparagina u sirovini su, uz temperaturu i duljinu toplinske obrade, najvažniji čimbenici koji utječu na količinu akrilamida formiranog u hrani. (Pedreschi i sur., 2014). Ipak, pokazalo se da značajna količina može nastati i na temperaturama ispod 100°C, u uvjetima sličnim sušenju u npr. suhim šljivama (EFSA, 2015).

Predloženi su i demonstrirani i neki drugi putevi nastanka akrilamida koji ne uključuju nužno asparagin. Pokazalo se da se može formirati iz akroleina i akrilne kiseline. U teoriji, akrilna kiselina bi uz prisustvo amonijaka mogla formirati akrilamid. Akrilna kiselina u hrani može nastati iz akroleina, a on toplinskom razgradnjom lipida i glicerola, iz ugljikohidrata, aminokiselina i Maillardovih produkata ili iz asparaginske kiseline Maillardovim reakcijama (Taeymans i sur., 2004). Moguće je da ovaj mehanizam ima značajnu ulogu u formiranju akrilamida u hrani bogatoj lipidima (Keramat i sur., 2011).

Maillardove reakcije, osim što doprinose nastanku akrilamida, također su važne i poželjne prilikom proizvodnje za postizanje poželjnih organoleptičkih karakteristika mnogih proizvoda. Zbog toga je glavni izazov razviti metode kojima bi se razine akrilamida što više smanjile, bez utjecaja na senzorska svojstva. Većina metoda oslanja se na minimiziranje

nastanka akrilamida inhibiranjem intenziteta Maillardove reakcije putem smanjenja njegovih prekursora u sirovini ili promjenom proizvodnih parametara (Pedreschi i sur., 2014).

2.1.2. Strategije za smanjenje koncentracije akrilamida u hrani

Strategije smanjenja koncentracije akrilamida u hrani mogu se podijeliti u tri kategorije:

- Smanjenje koncentracije reaktanata
- Remecenje reakcije nastanka akrilamida
- Uklanjanje akrilamida iz gotovog proizvoda

2.1.2.1. Smanjenje koncentracije reaktanata

Iako je mehanizam nastanka jednak, različite sirovine razlikuju se po limitirajućim reaktantima. Tako kod krumpira veću ulogu ima koncentracija reducirajućih šećera, dok je u kavi i žitaricama limitirajući reaktant asparagin (Pedreschi i sur., 2014). Smanjenje količine ovih prekursora nastoji se postići odabirom prigodnih kultivara, načina pripreme sirovine i uvjeta skladištenja.

Smanjenje koncentracije asparagina može se postići odabirom kultivara krumpira ili žitarica koji ga sadrže u niskim koncentracijama ili njegovim acetiliranjem u sirovini (Keramat i sur., 2011). Koristi se i enzim asparaginaza koji razgrađuje asparagin do asparaginske kiseline i amonijaka, pri tome ne uzrokuje značajne promjene u izgledu i okusu krajnjeg proizvoda, a dovodi do značajnog smanjenja akrilamida u gotovom proizvodu - od 27-70% (Anese i sur., 2013). U pekarskim proizvodima, fermentacija tijesta može značajno smanjiti koncentraciju asparagina prije pečenja u odnosu na korištenje kemijskih sredstava za dizanje tijesta - do 80% u tijestima fermentiranim uz pomoć pekarskog kvasca (Pedreschi i sur., 2014).

Smanjenje koncentracije reducirajućih šećera postiže se selekcijom kultivara i pravilnim skladištenjem. Niske temperature pogoduju povećanju razine šećera u krumpiru pa se on mora skladištiti u povoljnim uvjetima, odnosno na temperaturama višim od 6°C i pri relativnoj vlažnosti od 85 do 90% (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016).

2.1.2.2. Remećenje reakcije nastanka akrilamida

Količina akrilamida formiranog u hrani proporcionalna je vremenu i temperaturi termičke obrade. Pokazalo se da se rastom temperature iznad 120°C brzina nastanka akrilamida u hrani značajno povećava (Keramat i sur., 2011). Smanjenje temperature prženja ili pečenja učinkovit je način smanjenja koncentracije akrilamida u proizvodu. Također, pH vrijednost utječe na nastanak akrilamida, pri čemu se maksimalna brzina primjećuje pri pH 8, dok je pri nižim vrijednostima pH brzina reakcije smanjena. Namakanje ili blanširanje u organskim kiselinama poput limunske i octene dovodi do smanjenja koncentracije akrilamida, ali može negativno utjecati na okus proizvoda (Pedreschi i sur., 2014).

S obzirom na to da akrilamid nastaje uglavnom na površini proizvoda gdje su temperature najviše, a koncentracija vlage najniža, povećanje odnosa volumena-površina, npr. rezanje krumpira na veće komade, utječe na smanjenje koncentracije akrilamida u krajnjem proizvodu (Badanjak Sabolović i Rimac Brnčić, 2016).

2.1.2.3. Uklanjanje akrilamida iz gotovog proizvoda

Metode uklanjanja akrilamida iz proizvoda uključuju hidrolizu do amonijaka i akrilne kiseline, polimerizaciju u poliakrilamide uz pomoć UV svjetlosti ili zračenja i reakciju akrilamida s aminokiselinama, esterima, peptidima i proteinima koji sadrže sulfhidrilnu grupu (Keramat i sur., 2011).

2.1.3. Regulatorna vezana za akrilamide u EU

U 2007. godini, Europska Komisija donijela je preporuku da se u državama članicama provodi praćenje koncentracije akrilamida u hrani za koju se zna da ga sadrži u velikim količinama ili značajno doprinosi njegovom unosu. Preporuka se odnosila na razdoblje od 2007. - 2009. godine (Preporuka 2007/331/EC), a 2010. donesena je nova preporuka koja je produljila razdoblje praćenja. Kao rezultat praćenja, European Food Safety Authority (EFSA) je objavila izvješća o koncentracijama akrilamida u hrani. U zadnjem izvješću za razdoblje od 2007. do 2010. godine analiza trenda nije pokazala velike promjene u koncentraciji akrilamida u hrani (EFSA, 2012).

Prehrambena industrija, Europska Komisija i države članice Europske Unije od 2002. provode mjere u svrhu istraživanja mehanizma nastanka i načina smanjenja koncentracije akrilamida u prehrambenim proizvodima (Preporuka 2013/647/EU). The Confederation of the Food and Drink Industries of the EU (CIAA), danas FoodDrinkEurope, organizacija koja predstavlja europske proizvođače hrane, razvila je i već 2005. godine objavila prvo izdanje "Paketa instrumenata" koje proizvođači mogu koristiti u svrhu smanjenja koncentracije akrilamida u svojim proizvodima (EFSA, 2012). Najrecentnije izdanje objavljeno je 2013., a mjere su podijeljene na četiri kategorije s obzirom na fazu proizvodnog procesa na koju se odnose: agronomske čimbenike, recepture prehrambenih proizvoda, preradu i završnu pripremu.

Na temelju praćenja razina akrilamida u hrani, Europska Komisija prvo je objavila indikativne vrijednosti za razne vrste proizvoda. Ukoliko bi se u prehrambenom proizvodu utvrdila količina akrilamida koja je veća od danih indikativnih vrijednosti, preporuka EK je bila državama članicama da nadležna tijela provedu uvid u procese proizvodnje i prerade kako bi se utvrdio razlog visokih vrijednosti, kao i uvid u HACCP ili sličan sustav da se utvrdi je li subjekt u poslovanju s hranom utvrdio odgovarajuće faze u preradi koje bi mogle dovesti do nastajanja akrilamida, jesu li poduzete odgovarajuće mjere njihove kontrole i u kojoj su mjeri u proizvodnji primijenjeni instrumenti. Iako indikativne vrijednosti nisu predstavljale sigurnosni prag, u slučaju njihovog prekoračenja mogle su se pokrenuti mjere provedbe i/ili brzog uzbunjivanja ukoliko se na temelju vjerodostojne procjene rizika provedene za svaki slučaj posebno utvrdilo da za to postoji potreba (Preporuka 2013/647/EU). Od 11. travnja 2018. godine na snagu je stupila Uredba (EU) br. 2017/2158 u kojoj su propisane nove referentne vrijednosti akrilamida. Svrha ovih referentnih vrijednosti je da služe kao pokazatelji uspješnosti djelotvornosti mjera za smanjenje razine akrilamida u hrani. Referentne vrijednosti propisane ovom Uredbom u pravilu su niže od indikativnih vrijednosti iz prethodnih preporuka EK, a cilj je odrediti najniže razine referentnih vrijednosti koje su realno ostvarive u pojedinim proizvodima. Uredba obvezuje subjekte u poslovanju s hranom koji proizvode i na tržište stavljaju hranu na koju se Uredba odnosi da primjenjuju mjere ublažavanja učinaka propisane Uredbom, te ukoliko se razine referentnih vrijednosti premaše, da preispitaju i primijenjene mjere i prilagode postupke i kontrole radi ostvarivanja najnižih realno ostvarivih razina akrilamida ispod razina referentnih vrijednosti navedenih u Uredbi. U tablici 1. prikazane su referentne vrijednosti akrilamida za različite grupe proizvoda.

Tablica 1. Razine referentnih vrijednosti za prisutnost akrilamida u hrani Izvor: Uredba Komisije 2017/2158/EU

Hrana	Razina referentne vrijednost (µg/kg)
Prženi krumpirići	500
Čips od krumpira ili krumpirovog tijesta	
Krekeri na bazi krumpira	750
Ostali proizvodi od krumpirovog tijesta	
Meki kruh	
1. pšenični kruh	50
2. ostale vrste mekog kruha	100
Žitarice za doručak	
1. proizvodi od posija i cjelovitih žitarica	300
2. proizvodi na bazi pšenice i raži *	300
3. proizvodi na bazi kukuruza, pira, ječma i riže *	150
Keksi i vafli	350
Krekeri, osim krekeri na bazi krumpira	400
Hrskavi kruh	350
Medenjaci	800
Slični proizvodi iz ove kategorije	300
Pržena kava	400
Instant kava	850
Zamjena za kavu	
1. zamjene na kavu isključivo na bazi žitarica	500
2. zamjene za kavu na bazi mješavine žitarica i cikorijske	(**)
3. zamjene za kavu isključivo na bazi cikorijske	4000
Dječja hrana, prerađena hrana na bazi žitarica za dojenčad i malu djecu osim keksa i dvopeka***	40
Keksi i dvopek za dojenčad i malu djecu	150
* žitarice koje nisu na bazi cjelovitog zrna i/ili posija. Određuje se na temelju žitarica prisutnih u najvećoj količini	
** Za razinu referentne vrijednosti koja se primjenjuje na zamjene za kavu na bazi mješavine žitarica i cikorijske uzima se u obzir relativni omjer tih sastojaka u konačnom proizvodu	
*** Kako je definirano u Uredbi (EU) br. 609/2013	

2.1.4. Utjecaj akrilamida na zdravlje

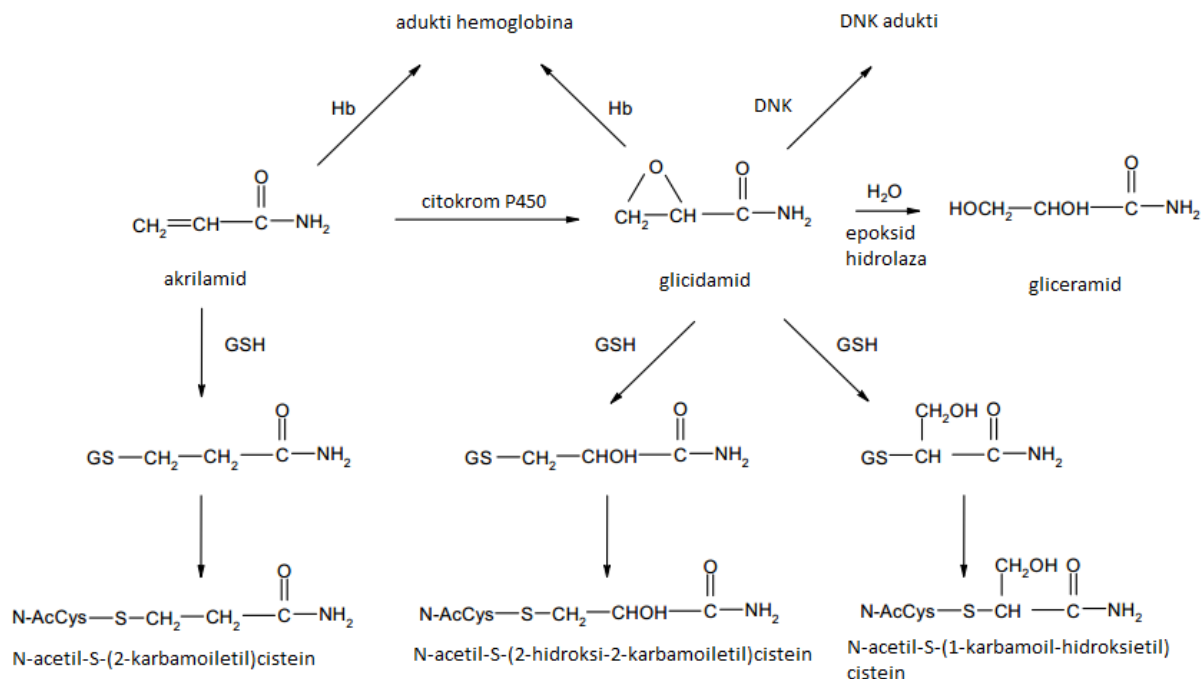
Akrilamid je neurotoksičan za ljude i životinje (Pedersen i sur., 2012.), a Međunarodna Agencija za Istraživanje Raka (IARC) 1994. godine klasificirala ga je kao tvar koja je „vjerojatno kancerogena za ljude“ (grupa 2A) (IARC,1994) 2002. godine, visoke koncentracije akrilamida pronađene su u pečenoj i prženoj hrani bogatoj ugljikohidratima

(HAH, 2015). Akrilamid se nalazi u širokom spektru hrane koja se svakodnevno konzumira, a zbog svoje tjelesne mase, djeca su najizloženija skupina. Na temelju sadašnjih razina izloženosti akrilamidu putem hrane, mogući štetni učinci na živčani sustav, prenatalni i postnatalni razvoj i muško reproduktivno zdravlje nisu se smatrali zabrinjavajućima, ali sadašnje razine izloženosti zabrinjavajuće su zbog njegovih kancerogenih učinaka (Uredba (EU) br. 2017/2158)

2.1.4.1. Toksikokinetika i toksikodinamika

Akrilamid se brzo i u potpunosti apsorbira iz probavnog sustava, a zbog dobre topivosti u vodi, distribuira se u sva tkiva. Također može dospjeti i u humano mlijeko te prolazi placentalnu barijeru (EFSA, 2015), što dovodi do zabrinutosti utjecaju izloženosti majki na zdravlje fetusa i dojenčadi.

U stanicama se može metabolizirati do epoksidnog produkta glicidamida koji ima genotoksična svojstva (Virk-Baker i sur., 2014). Akrilamid i glicidamid imaju sposobnost interakcije s nukleofilnim biomolekulama. Akrilamid prvenstveno reagira sa sulfhidrilnim skupinama reduciranog oblika glutaciona i proteina, a rjeđe s amino skupinama proteina, dok glicidamid reagira s dušikom u molekulama DNK i tvori DNK adukte. Zbog toga se smatra da bi glicidamid mogao imati veću važnost za genotoksičnost i kancerogenost akrilamida, dok sam akrilamid vjerojatno više doprinosi neurotoksičnom utjecaju zbog interakcije s proteinima (Dybing i sur., 2005). Slika 2 prikazuje osnovne metaboličke puteve akrilamida.



Slika 2. Osnovni metabolički putevi akrilamida (prema Dybing i sur., 2005)

Oba spoja tvore i adukte s hemoglobinom koji predstavljaju važne biomarkere izloženosti. Još jedna važna skupina biomarkera izloženosti su konjugati akrilamida i glicidamida s merkapturinom kiselinom. Oni se izlučuju urinom, a nastaju u reakcijama konjugacije s glutationom uz pomoć glutation-S-transferaze (EFSA, 2015). Glicidamid se također može i hidrolizirati do gliceramida.

Kancerogenost

IARC je 1994. godine akrilamid klasificirao kao tvar „vjerojatno kancerogenu za ljude“, na temelju do tada objavljenih istraživanja koja su jasno pokazivala kancerogeni učinak u eksperimentalnih životinja. Akrilamid i njegov metabolit glicidamid imaju kancerogeno djelovanje na različita tkiva miševa i štakora (EFSA, 2015). Ipak, epidemiološka istraživanja do sada nisu uspjela potvrditi povezanost izloženosti akrilamidu i formiranja tumora u ljudi i nedovoljno je dokaza koji bi ukazivali da količine akrilamida koje se konzumiraju hranom mogu uzrokovati negativne učinke na ljudsko zdravlje. Također, neka su istraživanja pokazala da je kancerogeni potencijal akrilamida relativno niži od drugih kancerogenih tvari koje se mogu naći u hrani, kao što su mikotoksini (Xu i sur., 2014).

Moguće je i da epidemiološki dokazi ni u budućnosti neće biti u mogućnosti dokazati ili osporiti povezanost dijetarnog akrilamida i rizika nastanka raka (HAH, 2015). Virk-Baker i suradnici (2014), u pregledu literature o utjecaju prehrambenog akrilamida na razvoj raka, ukazuju na to da su upitnici korišteni za procjenu izloženosti u mnogim studijama neadekvatni za klasifikaciju ispitanika prema stvarnom unosu i često ne uzimaju u obzir promjene tijekom duljeg vremenskog razdoblja, te da epidemiološke studije ne mogu imati značajne interpretacije dok se ne počnu koristiti bolje metode.

Reproduktivna toksičnost i teratogenost

Reproduktivna toksičnost akrilamida zabilježena je u studijama na laboratorijskim miševima i štakorima, međutim još uvijek nije poznato koje učinke akrilamid ima na reprodukciju i razvoj u ljudi (Xu i sur., 2014).

U prospektivnoj studiji provedenoj u razdoblju od 2006. do 2010. godine u kojoj su sudjelovale trudnice iz Danske, Engleske, Grčke, Norveške i Španjolske, Pedersen i suradnici (2012) pronašli su da postoji statistički značajna povezanost koncentracije adukata akrilamida i glicidamida s hemoglobinom u krvi iz pupčane vrpce i niže tjelesne mase i opsega glave novorođenčadi. Ovi čimbenici utječu na zdravlje djeteta jer je poznato da se smanjeni opseg glave pri rođenju povezuje s odgođenim neurološkim razvojem, a niska porođajna tjelesna masa je rizični čimbenik za mnoge bolesti kasnije u životu, kao što su niži rast, povećana incidencija kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2 i osteoporoze. Ukoliko druge studije potvrde ove rezultate, to bi dodatno trebalo poduprijeti promjene u proizvodnji hrane i javnozdravstvene savjete trudnicama da izbjegavaju hranu bogatu akrilamidima (Pedersen i sur., 2012).

Neurotoksičnost

Akrilamid je neurotoksičan za ljude. Pokazalo se da je neurotoksičnost kumulativna i da se javlja najčešće kod radnika subkronično izloženih na radnom mjestu (Xu i sur., 2014). Neurološki simptomi izloženosti uključuju utrnulost ruku i nogu, perutanje kože i poremećaj osjeta vibracije, dodira i boli, gubitak refleksa na gležnju, mišićnu atrofiju i ataksiju (IARC, 1994). Iako unos akrilamida iz prehrambenih izvora nije povezan s neurotoksičnim efektima u ljudi, potrebno je još studija da se procjeni kumulativni učinak kronične izloženosti malim

količinama akrilamida, kao i potencijalna povezanost s razvojem nekih neurodegenerativnih bolesti (Xu i sur., 2014).

2.1.5. Analitičke metode određivanja akrilamida u hrani

Analitika hrane bavi se razvojem i primjenom analitičkih metoda koje omogućuju prikupljanje informacija o strukturi, sastavu i senzorskim karakteristikama hrane. Te metode omogućuju sukladnost prehrambenih proizvoda s važećim zakonima i standardima, utvrđivanje nutritivnog sastava hrane i izradu nutritivnih deklaracija, utvrđivanje autentičnosti proizvoda, kontrolu sigurnosti hrane za ljudsku upotrebu, odnosno detekciju patogenih mikroorganizama, stranih tijela ili toksikanata te kontrolu kvalitete. Proizvođačima omogućava postizanje dosljednosti kvalitete i sigurnosti proizvoda, a potrošačima da donose informirane izbore o svojoj prehrani (McClements, 2003).

Od njegovog otkrića u hrani, primjenjuju se i razvijaju razne metode detekcije akrilamida. Većina ih se temelji na kromatografskim metodama, bilo plinskoj ili tekućinskoj kromatografiji uz detekciju masenom spektrometrijom (Stadler i Scholz, 2004). Najviše se upotrebljavaju vezani sustavi plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-dvojna masena spektrometrija (HPLC-MS/MS) (Wenzl i sur., 2003). Priprema uzoraka za ove metode uključuje procese ekstrakcije, derivatizacije (u nekim slučajevima), pročišćavanja i koncentriranja analita (Keramat i sur., 2011). Iako je analitika napredovala i omogućuje formiranje ovakvih univerzalnih i preciznih metoda za detekciju akrilamida u hrani, laboratoriji i dalje moraju biti opremljeni skupim instrumentima, a uzorci proći opsežan postupak pripreme. Zbog toga se javlja potreba za razvojem novih, jeftinijih i brzih metoda za probir (eng. screening) koje bi bile robusne i pouzdane, a koje bi se mogle primijeniti u uvjetima kakvi postoje u tvornicama (in-line ili on-line) što bi omogućilo učinkovitu kontrolu i brži odgovor (Stadler i Scholz, 2004).

2.2. Blisko-infracrvena spektroskopija (NIRS) u praćenju kakvoće hrane

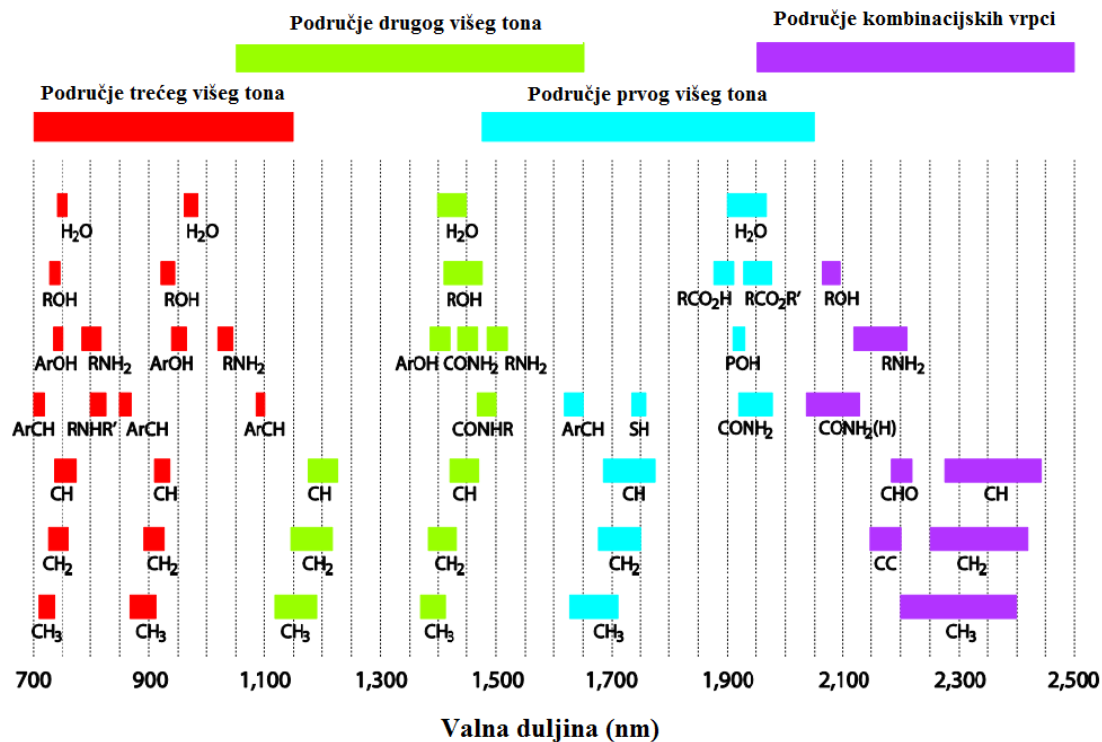
Blisko infracrvena spektroskopija (engl. Near-infrared spectroscopy, NIRS) vrsta je vibracijske spektroskopije koja se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina od 750-2500 nm, što odgovara energijama fotona od 2.65×10^{-19} do $7,96 \times 10^{-20}$ J (Pasquini, 2003).

Vibracijska spektroskopija u infracrvenom (IR) području temelji se na svojstvu molekula da apsorbiraju zračenje valnih duljina koje odgovaraju energiji potrebnoj za prijelaz između kvantiziranih vibracijskih energetske razina (Metrohm, 2013). Molekula može apsorbirati infracrveno zračenje ako tijekom vibracije dolazi do promjene dipolnog momenta. S obzirom da je najlakši, atom vodika je podložan najjačim vibracijama tako da glavne vrpce NIR spektra odgovaraju vezama koje sadrže vodik i druge lakše atome (prvenstveno C-H, N-H, O-H i S-H) (Blanco i Villarroya, 2002).

2.2.1. Specifičnosti NIR spektra

Energetske razine molekularnih vibracija su kvantizirane, odnosno mogu poprimiti samo diskretne vrijednosti koje se nazivaju energetskim razinama. Te energetske razine označavaju se vibracijskim kvantnim brojem ν koji može biti bilo koji cijeli broj uključujući nulu. Fundamentalni vibracijski prijelazi odnose se na energetske prijelaze iz $\nu=0$ u $\nu=1$ i njihove apsorpcijske vrpce pojavljuju se u NIR spektrima (LibreTexts, 2016).

NIR spektri su specifični po tome što obuhvaćaju kombinacijske vrpce i vrpce viših tonova (overtona). Do viših tonova dolazi kada molekula apsorbira zračenje koje dovodi do prijelaza iz $\nu=0$ u $\nu=2$ (prvi viši ton), $\nu=0$ u $\nu=3$ (drugi viši ton) itd. (LibreTexts, 2016). Cijeli NIR spektar sastoji se od četiri viša tona, a jačina apsorpcijskih vrpca smanjuje se sa svakim višim tonom (Esteve Agelet i Hurburgh Jr., 2010) Područje viših tonova nalazi se između valnih duljina 780 i 2000 nm (Metrohm, 2013). Na višim valnim duljinama (1900-2500 nm) nalazi se područje kombinacijskih vrpca. Kombinacijske vrpce nastaju u poliatomnim molekulama kada energija jednog fotona dovodi do istovremenog povećanja vibracijskog kvantnog broja dvije ili više veza (Blanco i Villarroya, 2002). Slika 3. Prikazuje položaje najvažnijih apsorpcijskih vrpca NIR spektra za pojedine funkcijske skupine.



Slika 3. Položaj najvažnijih apsorpcijskih vrpca u NIR spektru (prema Metrohm, 2013)

Iz ovih razloga NIR spektri sadrže široke, preklapajuće apsorpcijske vrpce koje nije moguće direktno interpretirati, već se podaci obrađuju posebnim statističkim (kemometrijskim) metodama.

2.2.2. Prednosti i nedostaci NIRS-a u praćenju kakvoće hrane

U praćenju kakvoće hrane blisko-infracrvena spektroskopija ima brojne prednosti u odnosu na tradicionalne analitičke metode. To je brza, nedestruktivna metoda, pogodna za in-line upotrebu (Pasquini, 2003) koju karakterizira točnost i pouzdanost (Huang i sur., 2008). Zahtjevi za pripremu uzoraka su minimalni i ne zahtijeva utrošak kemijskih reagensa (Metrohm, 2013) što smanjuje troškove analize i količinu otpada. NIR spektre karakterizira velik omjer signala i šuma, a zbog slabe apsorpcije vode i stakla mogu se koristiti za snimanje spektara vodenih otopina u staklenim reaktorima, bez potrebe za korekcijom pozadinskog signala. (Jednačak i Novak, 2013.) S druge strane, vrpce NIR spektara su manje informativne i zahtijevaju daljnju obradu multivarijatnim metodama analize (Jednačak i Novak, 2013). Kao sekundarna metoda analize zahtijeva izradu kalibracijskih modela što je dugotrajan proces.

Također, osjetljivost tehnike drastično pada pri koncentracijama nižim od 0,1% (Cen i He, 2007).

2.2.3. Kemometrija kao dodatni alat u obradi NIR spektara

Kemometrija je pojam koji se odnosi na upotrebu matematike, statistike i računala u kemijskoj analizi (Esteve Agelet i Hurburgh Jr., 2010). NIR spektroskopija je analitička metoda koja se najviše koristi kemometrijskim alatima. Razlog tome je što su NIR spektri kompleksni i sadrže široke apsorpcijske vrpce koje se preklapaju, a na njih utječu kako kemijske, tako i fizikalne i strukturne karakteristike svih tvari prisutnih u uzorku (Metrohm, 2013).

2.2.3.1. Analiza glavnih komponenti

PCA (engl. principal component analysis) ili analiza glavnih komponenti je metoda multivarijatne statističke analize. Koristi se u obradi NIR spektara u svrhu smanjenja dimenzionalnosti podataka. NIR spektri daju veliku količinu podataka o jednom uzorku, a glavna svrha PCA analize je prepoznavanje i ekstrakcija najvažnijih informacija iz izmjerenih spektara čime se smanjuje količina podataka. (Abdi i Williams, 2010) Koristi se u kvalitativnoj analizi za prepoznavanje uzoraka u skupu podataka (Metrohm, 2013), grupiranje i procjenu strukture podataka (Jednačak i Novak, 2013).

Dobiveni podaci o svakom uzorku mogu se prikazati u n-dimenzionalnom prostoru gdje svaka točka predstavlja određenu varijablu (Jednačak i Novak, 2013), odnosno apsorbanciju NIR zračenja pri određenoj valnoj duljini. Uz pomoć PCA formiraju se nove varijable koje se nazivaju glavnim komponentama (principal components ili PC), a dobivaju se linearnim kombinacijama izvornih varijabli. Pri tome su uvjeti da prva glavna komponenta (PC-1) predstavlja najveću moguću varijaciju u podacima (Abdi i Williams, 2010), a svaka sljedeća glavna komponenta mora biti ortogonalna u odnosu na prethodnu (s matematičkog gledišta PC su vektori) i takva da predstavlja sljedeću najveću varijaciju u podacima (Metrohm, 2013).

Vektori PC-1 i PC-2 čine novi koordinatni sustav na koji se projiciraju točke iz originalnog n-dimenzionalnog prostora. Koordinate točaka u ovom koordinatnom sustavu nazivaju se

faktorskim bodovima (eng. scoreplots). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013).

2.2.3.2. Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLSR, Partial least squares regression)

Ukoliko se NIR spektroskopija želi koristiti u svrhu kvantitativne analize uzoraka, prvo treba provesti kalibraciju. U tu svrhu se koriste multivarijatne metode linearne ili nelinearne kalibracije.

Parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLSR) jedna je od metoda multivarijatne analize koja se koristi za izradu kalibracijskih modela. Zasniva se na metodama PCA i multivarijatne linearne regresije (MLR) (Abdi, 2010). Za razliku od MLR, pogodna je za analizu podataka u kojima je broj prediktorskih varijabli velik i koje su kolinearne (Wold i sur., 2001), pa je zato našla primjenu u analizi NIR spektara.

U prvom koraku PLS regresija traži kombinaciju komponenata (koji se nazivaju latentnim vektorima) iz matrica X (pohranjuje prediktorske varijable) i Y (pohranjuje zavisne varijable) koje najbolje objašnjavaju moguću kovarijancu između X i Y. Nakon toga slijedi regresijski korak u kojemu se latentni vektori dobiveni iz X koriste za predikciju Y (Abdi, 2010).

2.2.3.3. Linearna diskriminantna analiza (eng. Linear discriminant analysis, LDA)

Linearna diskriminantna analiza spada u nadgledane metode klasifikacije. Takve metode koriste informacije o pripadnosti uzoraka nekoj kategoriji za izradu modela koji bi služio u klasifikaciji novih uzoraka u jednu od poznatih kategorija na temelju podataka dobivenih mjerenjem.

LDA je slična PCA u smislu da obje metode smanjuju dimenzionalnost podataka. Međutim, LDA se temelji na odabiru onih linearnim kombinacija originalnih varijabli koje maksimiziraju varijancu između i minimiziraju varijancu unutar pojedinih kategorija (Berrueta i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U ovom radu snimljeni su NIR spektri uzoraka proizvoda iz monitoringa Ministarstva zdravstva. S obzirom da je cilj rada bio utvrditi primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu predviđanja količine akrilamida u hrani, odabrani su proizvodi iz kategorija koje sadrže značajne količine akrilamida. Analizirani su uzorci čipsa (slanog i s paprikom), krekeri od ekspanzirane riže (sa i bez začina), kave i kukuruznog flipsa. Ukupno je analizirano 24 uzorka. Uzorci su kategorizirani prema osnovnoj sirovini na proizvode na bazi kave, kukuruza, krumpira i riže. Svakom uzorku dodijeljena je šifra koja se sastoji od oznake kategorije i broja. Korištene oznake kategorija dane su u tablici 2.

Tablica 2. Oznake kategorija za uzorke s obzirom na osnovnu sirovinu

Osnovna sirovina	Oznaka kategorije	Broj uzoraka
Kukuruz	Kk	1
Kava	Kv	1
Krumpir	Kr	7
Riža	R	15

U svrhu provedbe LDA analize i pokušaja izrade modela za predikciju pripadnosti svakog proizvoda određenoj kategoriji, uzorci su detaljnije razdvojeni prema vrsti proizvoda. Tijekom ove podjele uzorci su kodirani prema tri ključa, a način kodiranja prikazan je u tablici 3.

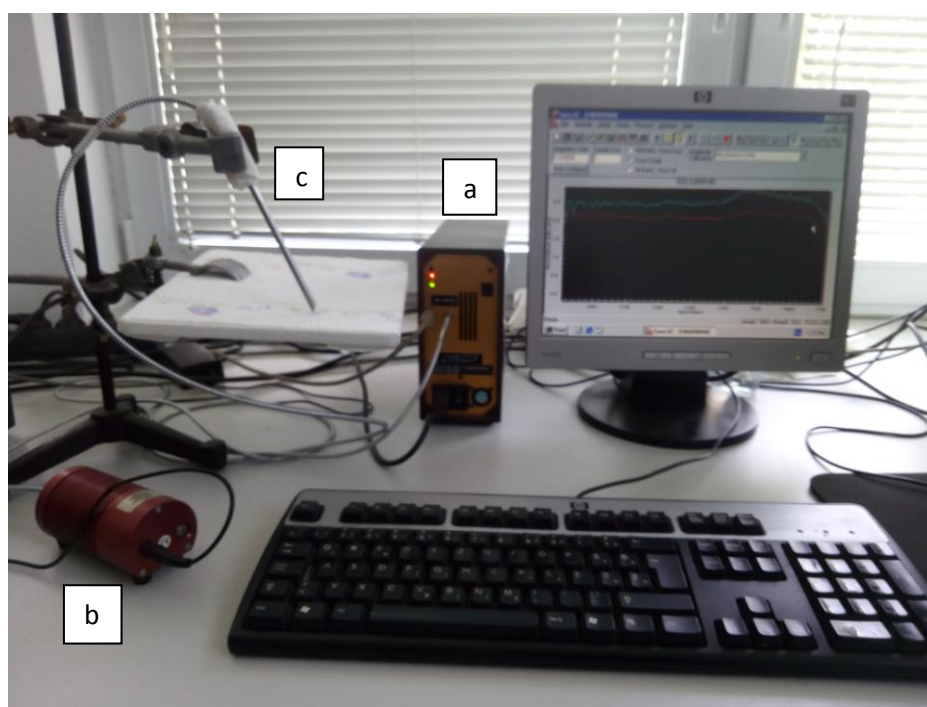
Tablica 3. Kodiranje uzoraka prema tri ključa s obzirom na vrstu proizvoda

Vrsta proizvoda	Kodovi		
	kod 1	kod 2	kod 3
čips (sve)	1	/	/
rižini krekeri (sve)	2	2	/
slani čips	/	3	3
čips s paprikom	/	4	4
rižini krekeri bez začina	/	/	5
rižini krekeri sa začinima	/	/	6

3.2. Metode rada

3.2.1. NIR spektroskopija

Za snimanje spektara uzoraka koristio se NIR spektrometar modela Control Development Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m s instaliranim Control Development software-om SPEC 32 (slika 4). NIR spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm. Snimanje se provelo sondom na površini proizvoda bez prethodne pripreme uzoraka. Za svaki uzorak snimljena su tri spektra, a za daljnju obradu koristio se prosjek spektara. Svaki spektar snimljen je u izvornom obliku te nakon primjene funkcije umekšavanja (eng. smoothing) programa SPEC32.



Slika 4. NIR instrument spojen na računalo sa instaliranim programom SPEC-32 (a), izvor zračenja (b) i sonda (c)

3.2.2. UPLC-MS/MS metoda

Za određivanje koncentracije akrilamida u uzorcima korištena je vezani sustav tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti-dvojna masena spektrometrija (UPLC-MS/MS). Metode bazirane na tekućinskoj kromatografiji iskorištavaju topivost akrilamida u vodi za efikasnu ekstrakciju. (Stadler i Scholz, 2004) UPLC-MS/MS metoda kombinira tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti i dvojnu masenu spektrometriju. Tekućinska

kromatografija koristi se za razdvajanje akrilamida iz smjese, a dvojna masena spektrometrija za identifikaciju i kvantifikaciju akrilamida. U odnosu na vezani sustav tekućinska kromatografija-dvojna masena spektrometrija (LC-MS/MS), UPLC-MS/MS smanjuje vrijeme analize uzoraka (Pedreschi i sur., 2013).

3.2.3. Obrada podataka

Multivarijatna analiza eksperimentalnih podataka dobivenih NIR spektroskopijom i UPLC-MS/MS metodom određivanja akrilamida provedena je korištenjem XLSTAT statističkog računalnog programa (verzija 2018.5, Addinsoft) za MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i programa Unscrambler X (verzija 10.4, CAMO Software AS., Oslo, Norway).

Podaci o uzorcima korišteni u ovom radu činili su dvije matrice. Matrice podataka sa kojima se radilo sadržavale su podatke o NIR spektrima, kodirane podatke o vrsti uzoraka (tablica 3) te podatke o sadržaju akrilamida. Svaki uzorak sniman je tri puta te je izračunata srednja vrijednost što rezultira sa 4 retka podataka za svaki uzorak. Jedna matrica sadržavala je izvorne NIR spektre, a druga NIR spektre nakon primjene funkcije omekšavanja programa SPEC 32. To je činilo dvije matrice dimenzija 96 redaka i 800 stupaca za matricu s izvornim NIR spektrima i 96 redaka i 776 stupaca za matricu s umekšanim NIR spektrima.

Program XLSTAT korišten je za analizu glavnih komponenata (PCA) i provedbu linearne diskriminantne analize (LDA), dok je Unscrambler X korišten za izradu modela predikcije akrilamida parcijalnom regresijom metodom najmanjih kvadrata (PLSR). U svrhu uklanjanja efekata raspršenja, prije razvoja modela PLSR metodom, spektri su u programu Unscrambler X podvrgnuti pretprocesiranju koristeći MSC (multiplicative scatter correction) i SNV (standard normal variate) transformacije u kombinaciji s detrendiranjem.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovni cilj ovog rada bio je istražiti primjenjivost NIR spektrometrije u određivanju koncentracije akrilamida u hrani, odnosno izrada kalibracijskog modela koji bi se mogao koristiti za predikciju koncentracije akrilamida u uzorcima na temelju spektralnih podataka.

Snimljeni su NIR spektri uzoraka proizvoda iz monitoringa Ministarstva zdravstva kategoriziranih prema osnovnoj sirovini na proizvode na bazi riže, kukuruza, kave i krumpira. U rezultatima su grafički prikazane srednje vrijednosti izmjerenih NIR spektara za svaki uzorak. NIR spektri su prikazani u tri grafa: jedan za izvorne NIR spektre, jedan za spektre nakon primjene funkcije umekšavanja u programu SPEC 32 i jedan za izvorne NIR spektre, ali sa grupiranjem spektara prema osnovnoj sirovini uzorka. S obzirom na to da NIR spektri ne sadrže oštre pikove već široke, preklapajuće apsorpcijske vrpce, samom vizualnom analizom NIR spektara ne može se zaključiti mnogo o samim uzorcima. Zbog toga su na spektrima provedene analize kemometrijskim metodama.

Analiza glavnih komponenata (PCA) provedena je kako bi se ispitala struktura podataka, odnosno utvrdilo postoji li grupiranje ili razdvajanje uzoraka na temelju razlika u NIR spektrima. PCA analiza provedena je na srednjim vrijednostima izmjerenih spektara. Ukupno je provedena jedna PCA analiza i to na izvornim NIR spektrima. Rezultati su prikazani grafički kao projekcija uzoraka u prostor određen glavnim komponentama PC-1 i PC-2.

Nakon što je PCA pokazala tendenciju grupiranja uzoraka prema osnovnoj sirovini, korištena je linearna diskriminantna analiza (LDA) za izradu modela za klasifikaciju uzoraka u kategorije s obzirom na osnovnu sirovinu i vrstu proizvoda. Ukupno su provedene tri LDA analize koristeći srednje vrijednosti izvornih NIR spektara za uzorke na bazi riže i krumpira. Uzorci na bazi kukuruza i kave bili su isključeni iz LDA analize s obzirom na to da je se u obje kategorije nalazio po samo jedan uzorak (tablica 2). U tablici br. 3 prikazane su vrste proizvoda i način kodiranja proizvoda koji se koristio u LDA analizama. Rezultati LDA analiza prikazani su grafički kao projekcija uzoraka u prostor određen s prva dva LDA faktora. Također su za svaku LDA analizu prikazane matrice konfuzije podataka korištenih za učenje.

Za izradu kalibracijskih modela za predikciju udjela akrilamida u proizvodima, korištena je parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLSR). PLS regresija je provedena na izvornim spektrima svih uzoraka, umekšanim spektrima svih uzoraka i samo na izvornim

spektrima za uzorke krumpira i riže. U zadnjem slučaju su iz skupa podataka za izradu modela isključeni uzorci proizvoda na bazi kave i kukuruza. Isključeni su zbog toga što se u kategorijama proizvoda na bazi kave i kukuruza nalazio samo po jedan uzorak (tablica 2) te se htjelo ispitati hoće li isključivanje tih uzoraka rezultirati boljim modelima. Također, zbog tako malog broja uzoraka, ne bi se moglo tvrditi da je onaj model dobiven uključivanjem podataka o tim uzorcima reprezentativan za predikciju koncentracije akrilamida takvim proizvodima.

Pokušano je i korištenje samo dijela spektra za izradu modela. Pedreschi i sur. (2010) uspješno su koristili spektre snimljene uz pomoć dva uređaja koji su snimili spektre od valne duljine od 460 nm do 740 nm i 760 nm do 1040 nm za izradu modela za predikciju koncentracije akrilamida u čipsu, pa se htjelo utvrditi može li se dobiti bolji model korištenjem nižih valnih duljina. S obzirom na ograničenja korištenog mjernog instrumenta, u ovom istraživanju korišten je raspon valnih duljina od 904 nm do 1040 nm. Drugi raspon valnih duljina koji je korišten bio je od 1425 nm do 1525 nm. Ovaj raspon je područje drugog višeg tona i sadrži apsorpcijske vrpce amidnih i amino grupa (slika 3), pa se može pretpostaviti da se u ovom djelu spektra nalaze apsorpcijske vrpce čiji intenzitet ovisi o razini akrilamida u uzorcima. Htjelo se provjeriti hoće li se izolacijom ovih valnih duljina razviti uspješniji modeli predikcije. Izvorni i umekšani spektri korišteni su u PLS analizi bez pretprocesiranja i nakon pretprocesiranja u Unscrambler X-u kombinacijom SNV (standard normal variate) transformacije i detrendiranja te kombinacijom MSC (multiplicative scatter correction) transformacije i detrendiranja. Svrha pretprocesiranja bila je ukloniti efekte raspršenja u spektrima. Ukupno je razvijeno 15 modela koji će se evaluirati u ovom poglavlju. Od 15 modela, njih 5 je ocjenjeno pogodnima za upotrebu u svrhu kvantitativnog probira uzoraka s obzirom na udio akrilamida. Za tih 5 modela prikazani su grafovi PLS regresije sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida.

4.1. Rezultati sadržaja akrilamida

U tablici 4. prikazani su udjeli akrilamida utvrđeni UPLC-MS/MS metodom u ispitivanim uzorcima.

Tablica 4. Udio akrilamida u uzorcima

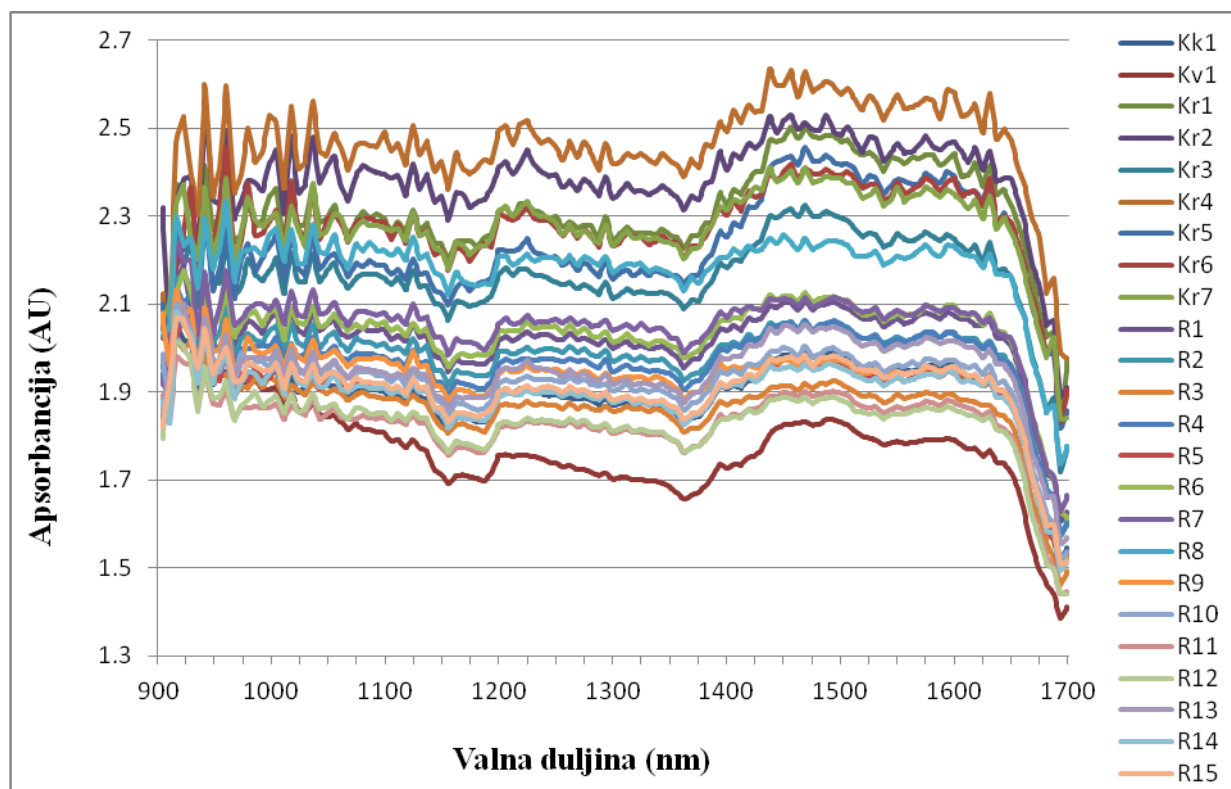
Šifra uzorka	Udio akrilamida (µg/kg)
Kk1	152
Kv1	302
Kr1	971
Kr2	841
Kr3	730
Kr4	956
Kr5	470
Kr6	651
Kr7	435
R1	214
R2	208
R3	325
R4	334
R5	254
R6	171
R7	200
R8	271
R9	303
R10	264
R11	127
R12	219
R13	120
R14	285
R15	231

U tablici 5. prikazane su minimalne, maksimalne, prosječne vrijednosti, medijan, standardna devijacija i koeficijent varijacije udjela akrilamida za sve uzorke i pojedinačno za kategorije proizvoda na bazi krumpira i riže. Iz tablice je vidljivo da su ispitivani uzorci na bazi krumpira imali značajno više udjele akrilamida od uzoraka na bazi riže, točnije svi uzorci na bazi krumpira imali su viši udio akrilamida, dok je varijabilnost u udjelima akrilamida bila podjednaka u obje kategorije proizvoda.

Tablica 5. Minimalne, maksimalne, prosječne vrijednosti, medijan, standardna devijacija i koeficijent varijacije za udjele akrilamida za sve uzorke i za kategorije uzoraka prema osnovnoj sirovini

uzorak	Udio akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					CV (%)
	min	max	prosjek	medijan	SD	
svi uzorci	120	971	376.4	267.5	254.5	67.61
Kk	152	152	152	152	0	0
Kv	132	132	132	132	0	0
Kr	435	971	722	730	216.8	30.03
R	120	334	235.1	231	65	27.65

4.2. Rezultati NIR spektroskopije

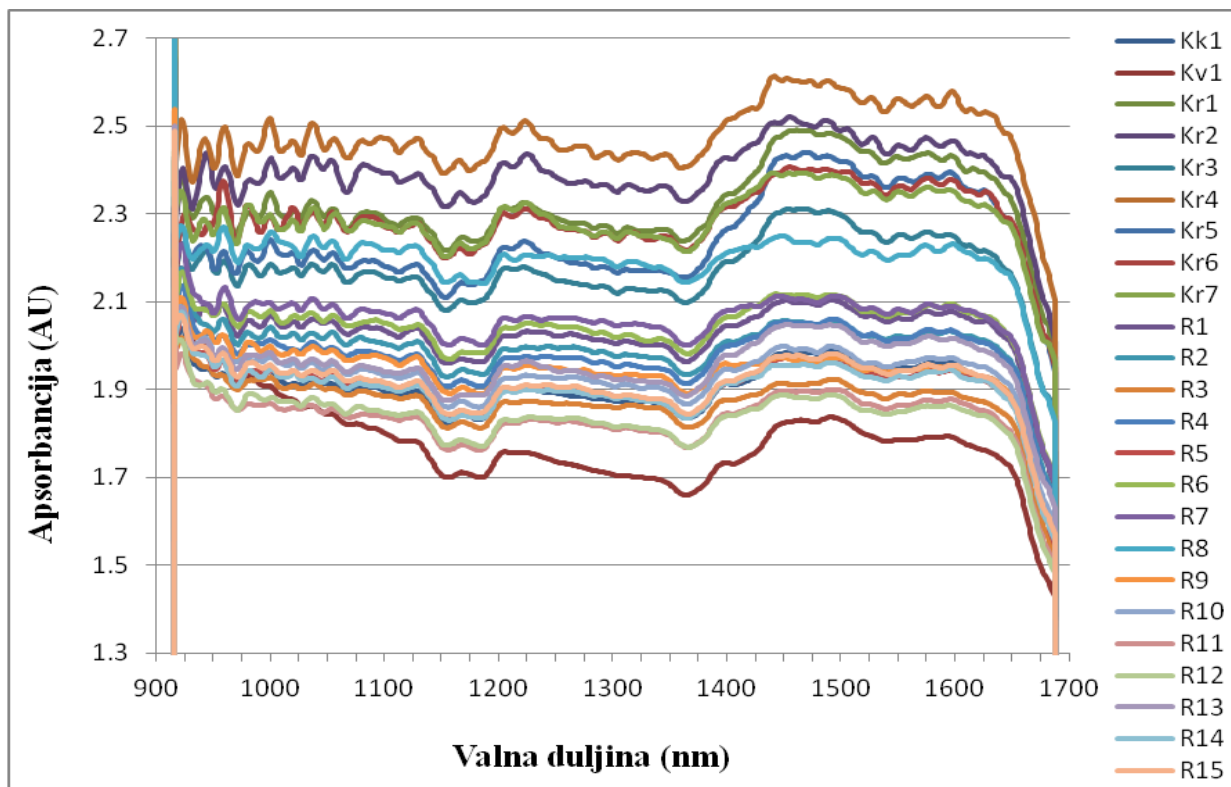


Slika br. 5 Izvorni NIR spektri svih ispitivanih uzoraka

Na slici br. 5 prikazane su srednje vrijednosti snimljenih izvornih NIR spektra za svaki uzorak. Može se vidjeti da su se uzorci grupirali u tri kategorije prema intenzitetu apsorbancije diljem čitavog spektra valnih duljina. Razlike u veličini čestica snimanih uzoraka utječu na raspršivanje zračenja i mogu znatno doprinijeti razlikama NIR spektara.

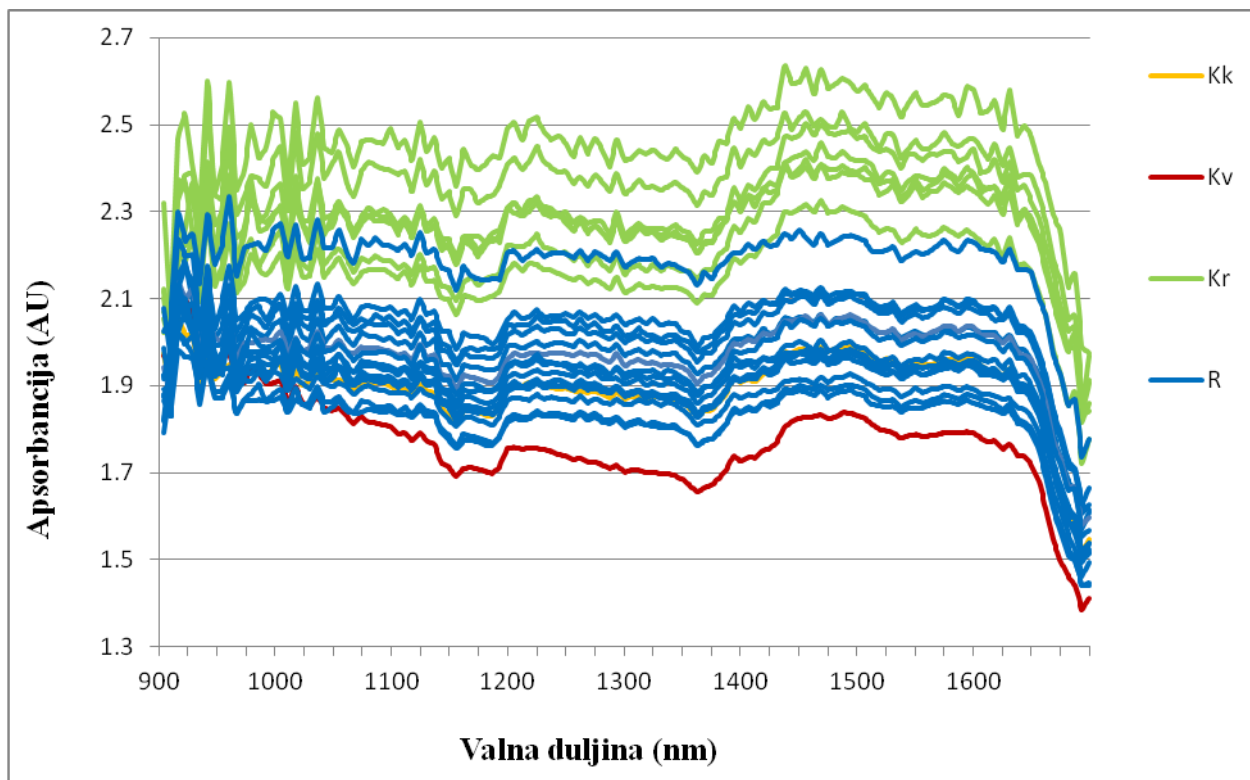
Ovi efekti variraju od uzorka do uzorka i mogu biti aditivni ili multiplikativni. Aditivni efekti dovode do vertikalnih pomaka NIR spektara dok multiplikativni efekti dovode do neujednačenog nagiba spektra u odnosu na "idealni" spektar (Dhanoa i sur. 1994). To su nepoželjne, a često i najveće varijacije unutar seta uzoraka. Uzrok vertikalnog pomaka NIR spektara najčešće je razlika u veličini čestica, gdje uzorci s većim česticama pokazuju više, a uzorci s manjim česticama niže apsorbancije diljem čitavog spektra (Rinnan i sur., 2009). Promatrajući spektre može se pretpostaviti da postoji varijacija u veličini čestica između uzoraka.

Samom vizualnom procjenom izvornog spektra mogu se uočiti područja u spektrima koja ukazuju na postojanje razlika u kemijskom sastavu uzoraka. U tom smislu, razlike između spektara najočitije su u područjima valnih duljina od 1050 nm do 1225 nm, 1425 nm do 1510 nm i 1550 nm do 1650 nm. Naravno, uzimajući u obzir to da su uzorci korišteni u ovom radu proizvedeni od različitih osnovnih sirovina, te da su se i unutar kategorija baznih sirovina proizvodi razlikovali prema proizvođaču, ostalim sastojcima, varijetetu osnovne sirovine, načinu prerade, proizvodnje, skladištenja i sl., pa tako i kemijskom sastavu, za očekivati je da će postojati razlike između njihovih NIR spektara. Zbog utjecaja svih tih faktora, pokušaj identifikacije područja valnih duljina gdje bi uzrok razlike između spektara mogao biti udio akrilamida samo vizualnom analizom spektara nije moguć. Općenito, NIR spektri sadrže veliku količinu podataka o fizikalnim i kemijskim karakteristikama uzoraka, ali kako su apsorpcijske vrpce široke te se preklapaju, nisu jako informativni bez upotrebe adekvatnih kemometrijskih metoda.



Slika br. 6 NIR spektri nakon korištenja „smoothing funkcije“ (umekšavanja) u programu SPEC32

Na slici br. 6 prikazane su srednje vrijednosti NIR spektara za svaki uzorak nakon korištenja umekšavanja (smoothing funkcije) u programu SPEC32. Umekšavanje spektra korišteno je u nastojanju da se smanji šum. Ovaj proces kao posljedicu ima gubitak dijela informacija s oba kraja spektra, u ovom slučaju od valne duljine 904 nm do 915 nm na jednom i od 1688 nm do 1699 nm na drugom kraju spektra. Zbog toga su u daljnjim kemometrijskim analizama u kojima su korišteni umekšani spektri korištene valne duljine od 916 nm do 1687 nm.

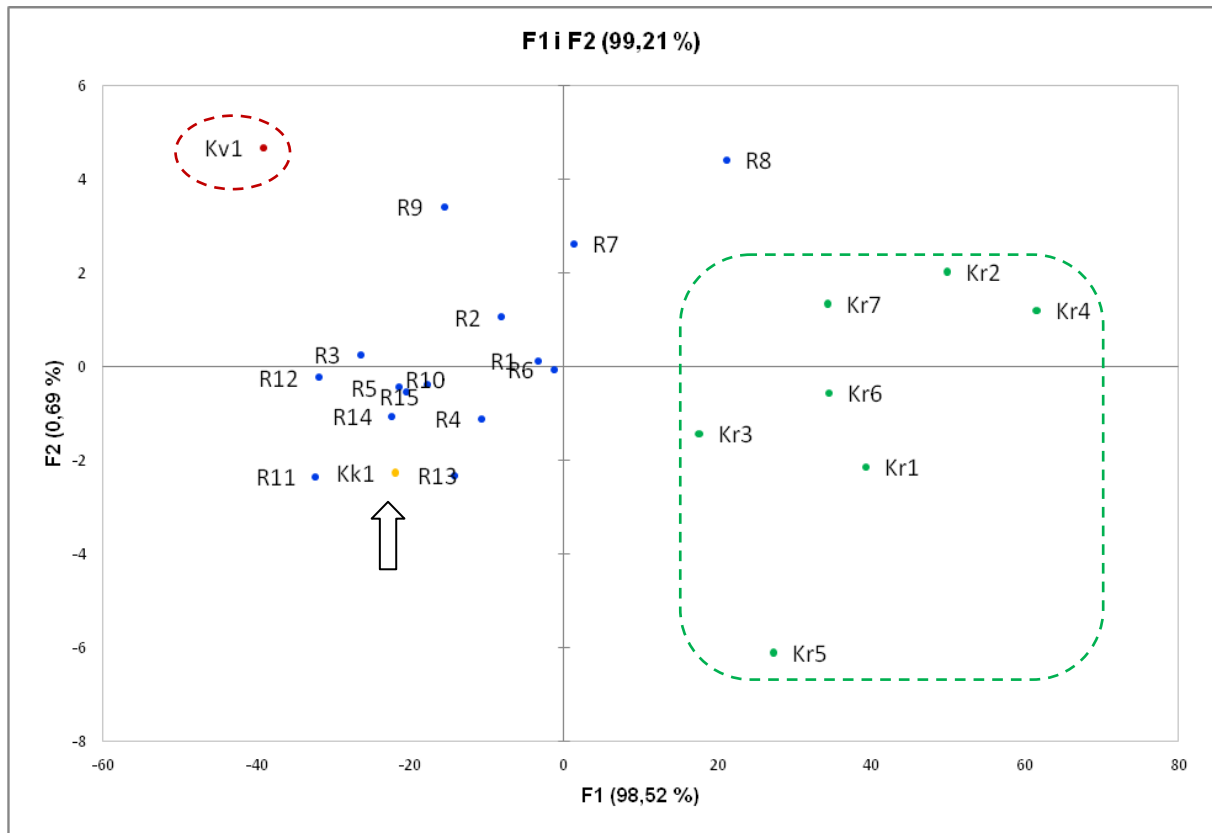


Slika br. 7 Izvorni NIR spektri svih ispitivanih uzoraka grupirani prema osnovnoj sirovini: kukuruz (Kk), kava (Kv), krumpir (Kr) i riža (R)

Grupiranjem NIR spektara uzoraka prema osnovnoj sirovini na slici br. 7 vidljivo je da je intenzitet apsorbancije diljem čitavog spektra valnih duljina povezan s osnovnom sirovinom. Na grafičkom prikazu jasno je vidljivo da su se spektri uzoraka na bazi krumpira, riže i kave grupirali i međusobno odvojili prema osnovnoj sirovini, uz iznimku jednog uzorka na bazi riže koji se grupirao s uzorcima na bazi krumpira. Također, spektar uzorka na bazi kukuruza (označen žutom bojom na grafu) nije se odvojio već se grupirao s uzorcima na bazi riže. S obzirom da je poznato da razlike u veličini čestica mogu dovesti do vertikalnog pomaka između NIR spektara, gdje uzorci s većim česticama pokazuju više, a uzorci s manjim česticama niže apsorbancije diljem čitavog spektra, može se pretpostaviti da su najveću veličinu čestica imali uzorci na bazi krumpira nakon čega slijede uzorci na bazi riže i na kraju kava.

4.3. Rezultati kemometrije

4.3.1. PCA analiza



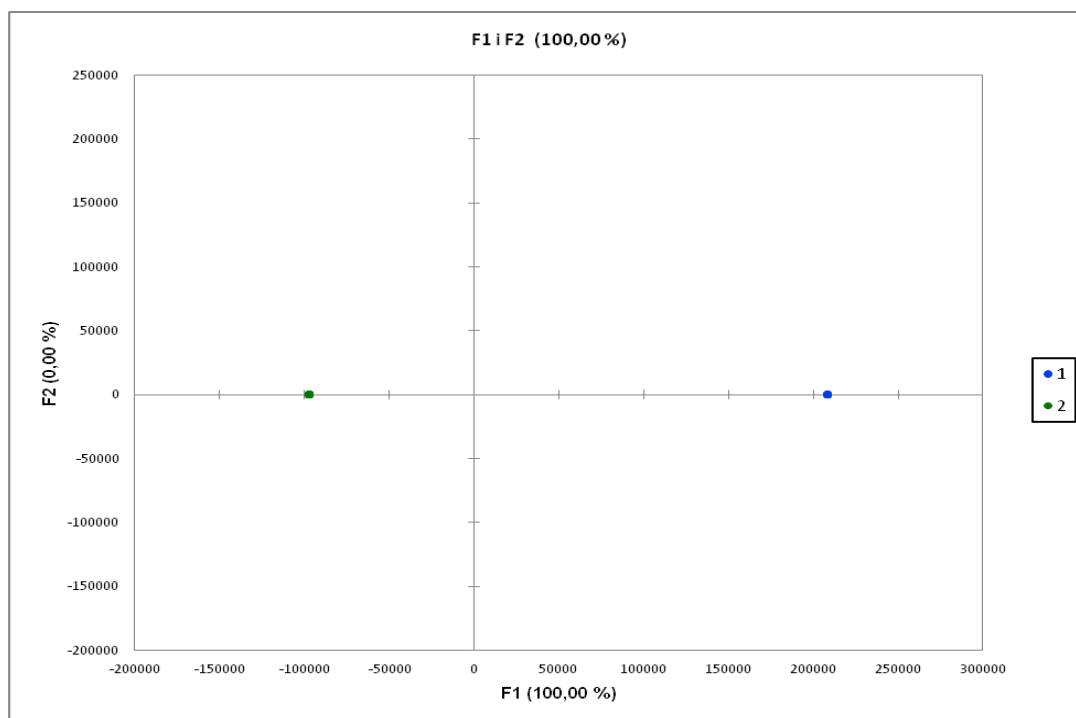
Slika br. 8 PCA analiza izvornih NIR spektara svih uzoraka

Na slici br. 8 prikazana je projekcija uzoraka u prostor određen prvim dvjema glavnim komponentama označenim na grafu s F1 i F2. Glavne komponente F1 i F2 objašnjavaju 99,21% varijance između podataka za sve uzorke. Zbog lakšeg vizualnog razlučivanja, na slici br. 8 uzorci su označeni različitim bojama ovisno o osnovnoj sirovini te prate prikaz rezultata slike br. 7. Može se primijetiti tendencija grupiranja uzoraka prema osnovnoj sirovini. U zelenom liku su grupirani uzorci čija je osnovna sirovina krumpir. Uzorci na bazi riže većinom su grupirani uzduž lijeve strane PC koordinatnog prikaza, većinom u trećem, a djelomično i u drugom kvadrantu, iako su se dva uzorka na bazi riže našla i u prvom kvadrantu, dok su uzorci na bazi krumpira grupirani na desnoj strani, u prvom i četvrtom kvadrantu. Uzorak na bazi kukuruza, na slici označen strelicom, smjestio se u treći kvadrant s uzorcima na bazi riže, dok se uzorak kave izdvojio od ostalih uzoraka u drugom kvadrantu. Analizom glavnih komponenata uspješno su kvalitativno razdijeljeni uzorci na bazi riže, kave i krumpira, dok se za uzorke na bazi kukuruza zahtjeva dodatna obrada ulaznih podataka.

4.3.2. LDA analiza

LDA analiza je kemometrijska metoda koja koristi informacije o pripadnosti uzoraka nekoj kategoriji za izradu modela koji bi služio za klasifikaciju novih uzoraka u jednu od poznatih kategorija na temelju rezultata mjerenja. Obrada podataka PCA analizom pokazala je grupiranje unutar i razdvajanje između kategorija uzoraka prema baznoj sirovini. S obzirom na to da se LDA, za razliku od PCA, temelji na odabiru onih linearnim kombinacija originalnih varijabli koje maksimiziraju varijancu između i minimiziraju varijancu unutar pojedinih kategorija, htjelo se utvrditi može li se uz pomoć LDA kreirati model koji bi uzorke razdvojio prema osnovnim sirovinama i dodatno prema vrsti proizvoda. U tablici 3. prikazane su vrste proizvoda i pripadajući kodovi dodijeljeni uzorcima koji su korišteni u LDA analizi. Osim prema osnovnoj sirovini, uzorci su podijeljeni i detaljnije (prema vrsti proizvoda) kako bi se vidjelo hoće li doći i do razdvajanja tih kategorija.

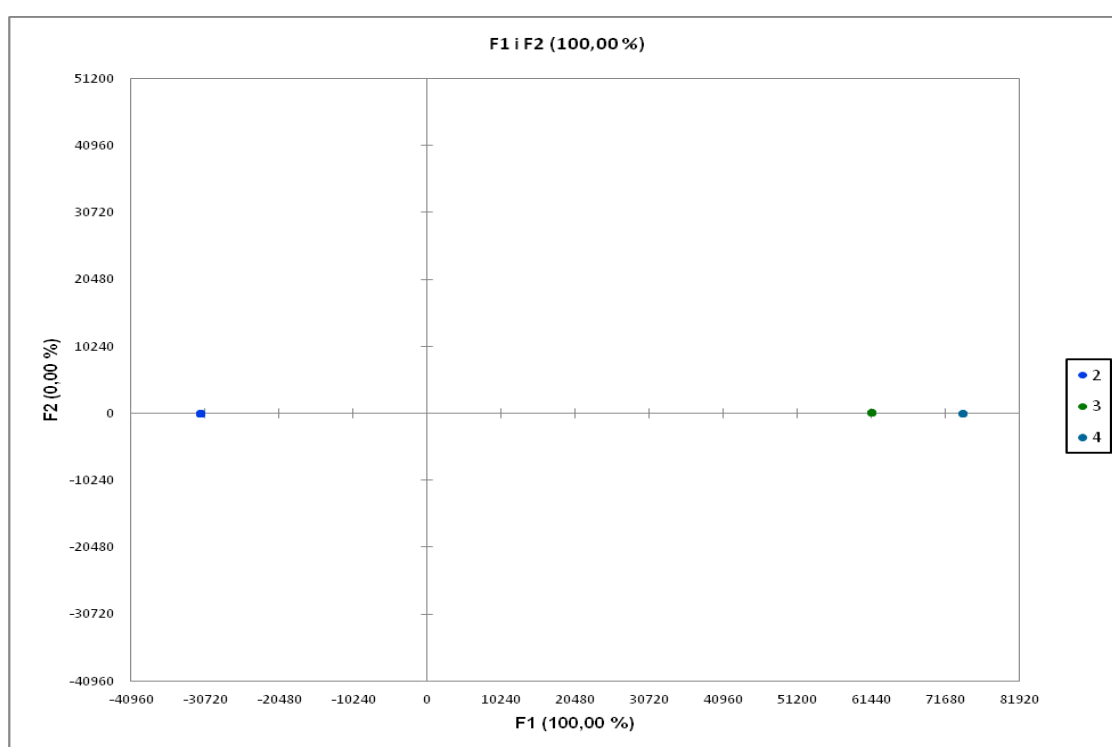
U LDA analizi korištene su srednje vrijednosti izvornih NIR spektara za proizvode na bazi krumpira i riže. Također, uzorci na bazi kukuruza i kave isključeni su iz LDA analize s obzirom na to da je se u obje kategorije nalazio po samo jedan uzorak (tablica 2).



Slika br. 9 LDA analiza izvornih NIR spektara s kodiranjem uzoraka kodovima 1 i 2

Tablica br. 6 Matrica konfuzije za LDA analizu s kodiranjem uzoraka kodovima 1 i 2

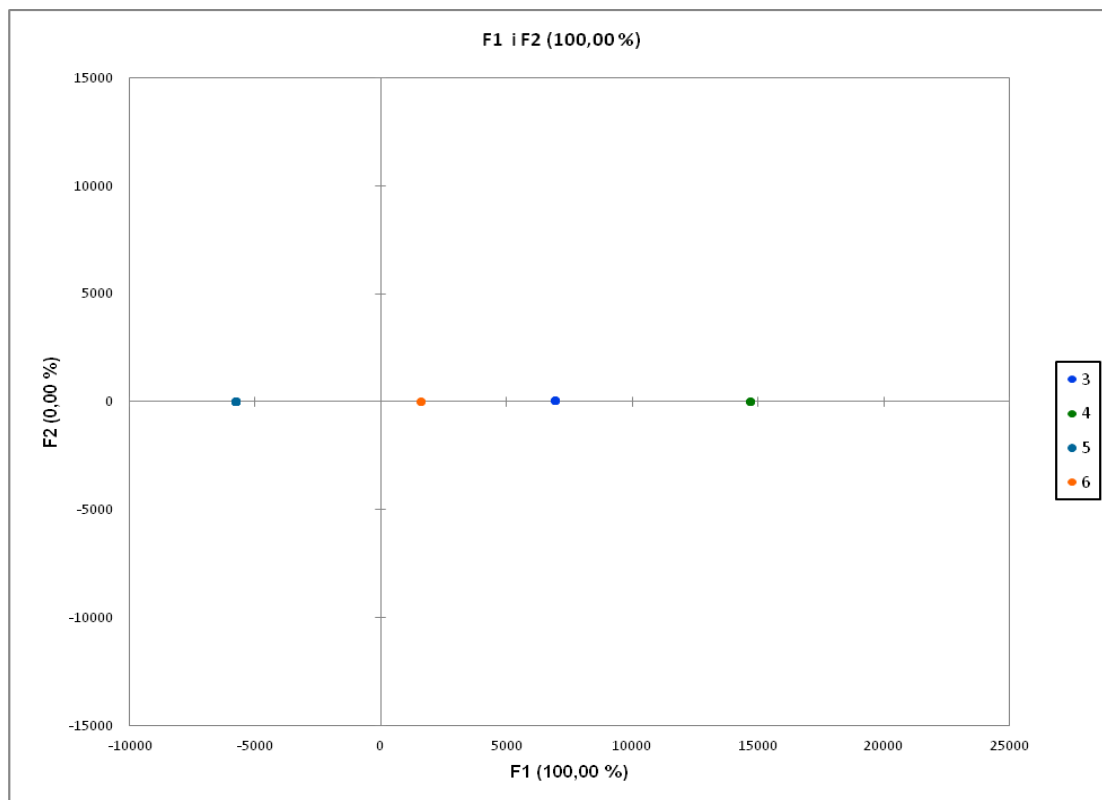
Stvarno\ predviđeno	1	2	Ukupno	Stopa točnosti (%)
1	28	0	28	100
2	0	60	60	100
Ukupno	28	60	88	100



Slika br. 10 LDA analiza izvornih NIR spektara s kodiranjem uzoraka kodovima 2, 3 i 4

Tablica br. 7 Matrica konfuzije za LDA analizu s kodiranjem uzoraka kodovima 2, 3 i 4

Stvarno\ predviđeno	2	3	4	Ukupno	Stopa točnosti (%)
2	15	0	0	15	100
3	0	4	0	4	100
4	0	0	3	3	100
Ukupno	15	4	3	22	100



Slika br. 11 LDA analiza izvornih NIR spektara s kodiranjem uzoraka kodovima 3, 4, 5 i 6

Tablica br. 8 Matrica konfuzije za LDA analizu s kodiranjem uzoraka kodovima 3, 4, 5 i 6

Stvarno\ predviđeno	3	4	5	6	Ukupno	Stopa točnosti (%)
3	4	0	0	0	4	100
4	0	3	0	0	3	100
5	0	0	13	0	13	100
6	0	0	0	2	2	100
Ukupno	4	3	13	2	22	100

Iz prikazanih rezultata (slika 9, 10 i 11) vidljivo je da je LDA analiza podataka pokazala izvrsne rezultate u klasifikaciji uzoraka prema određenim kategorijama prikazanim u tablici br. 3. U sve tri provedene analize, samo prvi faktor objašnjavao je 100% varijacije između kategorija uzoraka, te su sve tri analize postigle 100%-tnu točnost u kategoriziranju uzoraka. LDA analiza je pokazala da postoje značajne razlike između spektara uzoraka, ovisne o kategoriji i vrsti proizvoda, na temelju kojih je moguće razdvojiti spektre. Na slici br. 9 vidi se razdvajanje uzoraka čipsa od krumpira od uzoraka rižinih krepera, na slici br. 10 razdvajanje uzoraka slanog čipsa od krumpira, čipsa od krumpira s paprikom i rižinih krepera, a na slici

br. 11 razdvajanje uzoraka slanog čipsa od krumpira, čipsa od krumpira s paprikom, rižinih krepera bez začina i rižinih krepera sa začinima. Tablice br. 6, 7 i 8 prikazuju matrice konfuzije za LDA analize. U sve tri analize, uzorci su sa 100%-tnom točnošću klasificirani u pripadajuće klase.

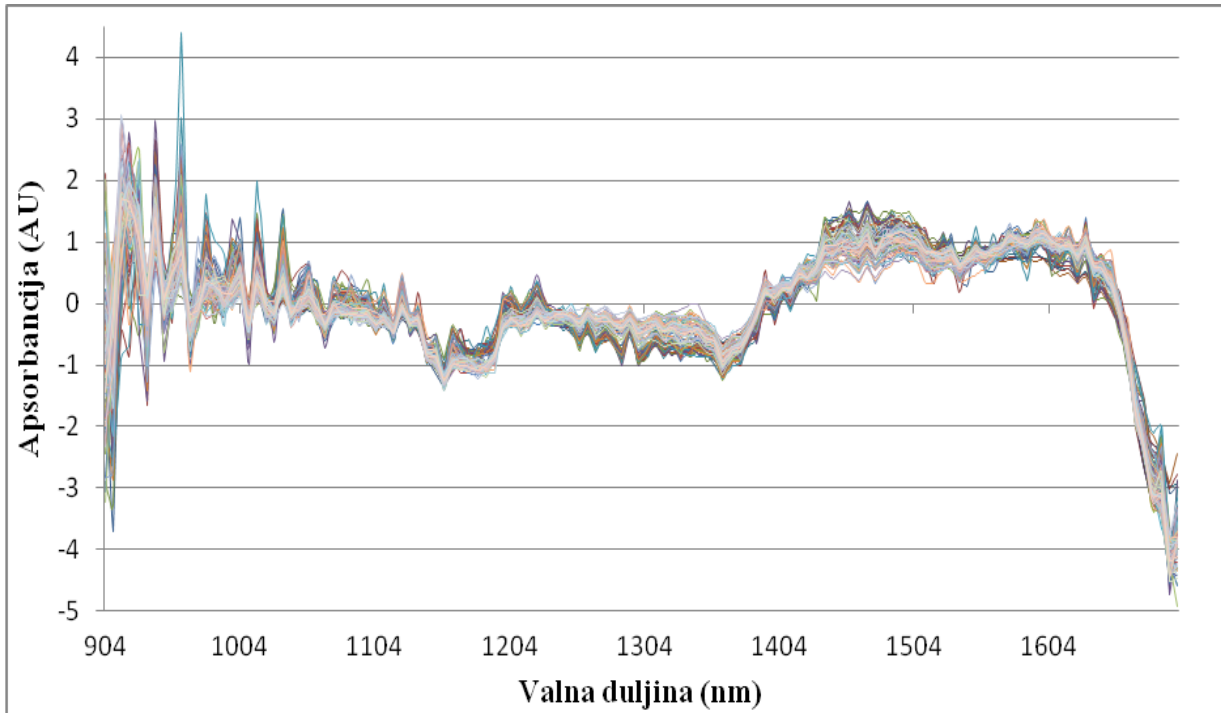
4.3.3. PLS regresija

Cilj ovog rada bio je ispitati primjenjivost NIR spektroskopije u svrhu predikcije udjela akrilamida u prehrambenim proizvodima. Za razvijanje predikcijskih modela korištena je parcijalna regresija metodom najmanjih kvadrata (PLSR). Matrica podataka s kojom se radilo sadržavala je podatke o NIR spektrima i podatke o sadržaju akrilamida. Svaki uzorak sniman je tri puta te je izračunata srednja vrijednost što rezultira sa 4 retka podataka za svaki uzorak i čini matricu od 96 redaka i 797 stupaca. PLS regresija provedena je uz pomoć programa Unscrambler X (verzija 10.4). Model je izrađen na temelju seta podataka za učenje koji se sastojao od 48 mjerenja kada su korišteni svi uzorci, odnosno 44 mjerenja kada su korišteni samo uzorci iz kategorije krumpira i riže, a predikcija modela je testirana na cjelokupnom setu mjerenja, odnosno 96 i 88 mjerenja.

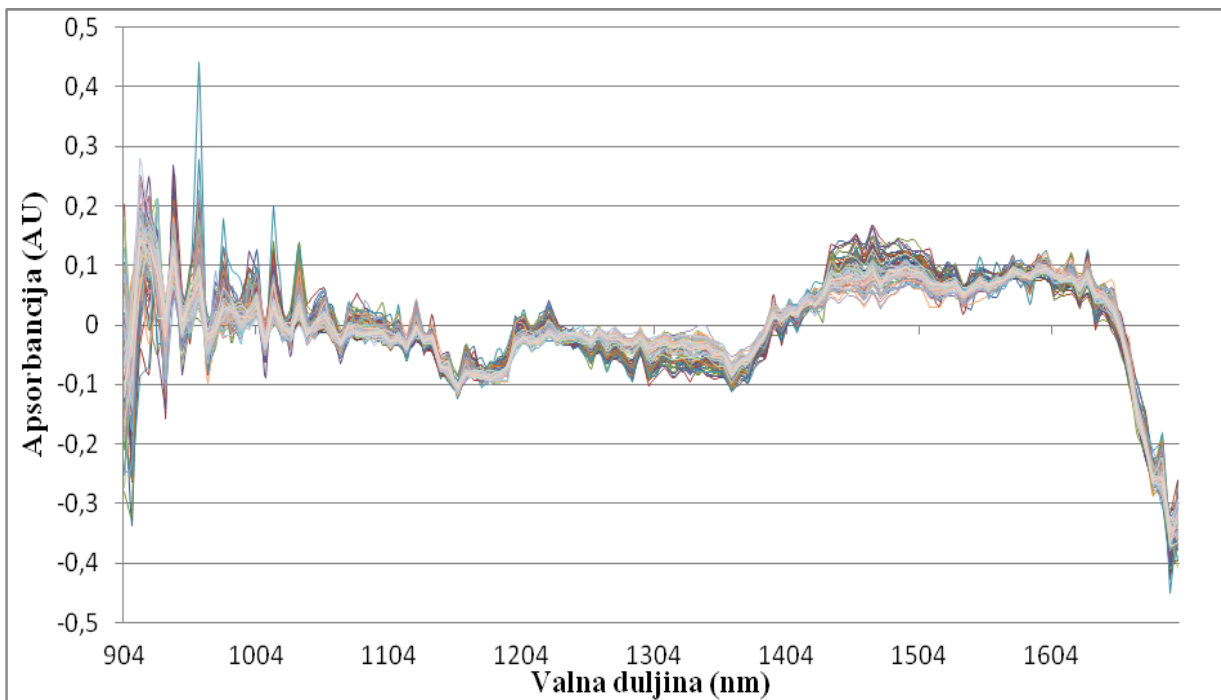
Modeli su razvijeni korištenjem izvornih spektara i spektara nakon pretprocesiranja. Pretprocesiranje NIR spektralnih podataka je proces koji često prethodi izradi modela. Cilj pretprocesiranja je povećanje izraženosti spektralnih karakteristika (Metrohm, 2013) i korekcija efekata raspršenja u svrhu izrade kvalitetnijih modela (Rinnan i sur., 2009). Pretprocesiranje spektara provedeno je u Unscrambler X programu, a korišteni su SNV (standard normal variate) transformacija kombinirana s detrendiranjem (SNV+DE) i MSC (multiplicative scatter correction) transformacija kombinirana s detrendiranjem (MSC+DE). U izvornim spektrima (slika 5) vidljivo je da postoje vertikalni pomaci između spektara, odnosno takozvani efekti raspršenja. Osnovne metode pretprocesiranja koje se koriste za korekciju spektara u kojima se pojavljuju efekti raspršenja su MSC i SNV. Također, ove metode pokazale su se dobrima za pretprocesiranje spektralnih podataka sličnih uzoraka korištenih u izradi modela u istraživanjima Adedipe i suradnika (2016) i Pedreschi i suradnika (2010).

Na slikama br. 12 i 13 prikazani su grafovi izvornog NIR spektra nakon pretprocesiranja korištenjem kombinacijom SNV transformacije i detrendiranja i MSC transformacije i

detrendiranja. Može se vidjeti da su obje metode pretprocesiranja dale su slične rezultate i dovele do smanjenja efekata raspršenja u izvornom spektru.



Slika br. 12. NIR spektar nakon pretprocesiranja kombinacijom SNV transformacije i detrendiranja



Slika br. 13. NIR spektar nakon pretprocesiranja kombinacijom MSC transformacije i detrendiranja

Tablica 9. Statistički pokazatelji razvijenih PLS modela za predikciju udjela akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

br.	spektar	uzorci	pretprocesiranje	valna duljina (nm)	R^2 kal	R^2 pred	RMSEP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SEP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RPD
1	izvorni	svi	bez	904-1699	0,93	0,81	109	110	2,3
2	izvorni	svi	bez	904-1040	0,88	0,72	134	134	1,9
3	izvorni	svi	bez	1425-1525	0,83	0,72	133	132	1,9
4	izvorni	svi	SNV + DE	904-1699	0,96	0,82	107	107	2,4
5	izvorni	svi	SNV + DE	904-1040	0,86	0,68	143	143	1,8
6	izvorni	svi	SNV + DE	1425-1525	0,60	0,58	163	164	1,6
7	izvorni	svi	MSC + DE	904-1699	0,93	0,85	99	99	2,6
8	izvorni	svi	MSC + DE	904-1040	0,85	0,69	141	141	1,8
9	izvorni	svi	MSC + DE	1425-1525	0,60	0,58	163	163	1,6
10	umekšani	svi	bez	904-1699	0,87	0,78	120	120	2,1
11	umekšani	svi	SNV + DE	904-1699	0,87	0,74	128	128	2,0
12	umekšani	svi	MSC + DE	904-1699	0,87	0,74	130	130	2,0
13	izvorni	Kr i R	bez	904-1699	0,96	0,87	94	94	2,8
14	izvorni	Kr i R	SNV + DE	904-1699	0,95	0,86	96	97	2,7
15	izvorni	Kr i R	MSC + DE	904-1699	0,95	0,85	100	100	2,6

Pokazatelji na temelju kojih su vrednovani svi razvijeni modeli prikazani su u tablici br. 9. Uključuju koeficijent determinacije za kalibraciju i predikciju (R^2_{kal} , R^2_{pred}), standardnu pogrešku predikcije (SEP), korijen standardne kvadratne pogreške predikcije (RMSEP) i omjer standardne pogreške predikcije i standardne devijacije (RPD). Koeficijent determinacije pokazuje koliko se dobro podaci uklapaju u model. Vrijednosti koeficijenta determinacije kreću se od 0 do 1, a što su bliže jedinici, to je model reprezentativniji. RMSEP mjeri prosječnu točnost predikcije, a SEP je mjera preciznosti predikcije. (Celnis Analytical, 2018) SEP je izraz pogreške koja se očekuje kada se kalibracijski model primjenjuje za predikciju novih uzoraka (Adedipe i sur., 2016). RPD je jednostavan statistički pokazatelj koji se računa kao omjer standardne devijacije podataka iz skupa korištenog za učenje i SEP-a (Adedipe i sur., 2016). Poželjno je da RPD vrijednost bude što viša. Za modele koji se nastoje koristiti za kontrolu kvalitete, poželjno je da imaju SEP vrijednosti barem pet puta niže od standardne devijacije, odnosno da im je RPD vrijednost viša od 5. U svrhu probira (eng.

screening) RPD vrijednosti modela mogu se kretati od 2.4 do 4.9, dok se korištenje modela s RPD vrijednostima nižim od 2.4 ne preporuča (Williams, 2012). Prema drugim autorima, vrijednosti RPD-a od 1.5 do 2 ukazuju na mogućnost modela da razlučuje između niskih i visokih vrijednosti, a vrijednosti od 2 do 2.5 znače da model može pomoći u kvantitativnim predikcijama. (Pedreschi i sur., 2010).

Pokazatelji za modele su u tablici odvojeni prema tome je li se u izradi modela koristio cijeli snimljeni spektar (904 nm do 1699 nm) ili samo dio spektra (904 nm do 1040 nm i 1425 nm do 1525 nm), jesu li se uključili svi uzorci ili samo uzorci iz kategorija riže i krumpira (K i R) i prema vrsti pretprocesiranja spektara.

Razvijeni modeli imali su koeficijent determinacije za kalibraciju u rangu od 0.60 do 0.96, dok je koeficijent determinacije za predikciju rangirao od 0.58 do 0.87. RMSEP za razvijene modele rangirao je od 94 $\mu\text{g/kg}$ do 163 $\mu\text{g/kg}$, SEP od 94 $\mu\text{g/kg}$ do 164 $\mu\text{g/kg}$, a RPD je rangirao od 1.6 do 2.8. Pet modela imalo je RPD vrijednost višu od ili jednaku 2.4, te bi mogli imati primjenu u kvantitativnom probiru proizvoda s obzirom na udio akrilamida. Općenito, korištenje umekšanih spektara dalo je manje kvalitetne modele od korištenja izvornih spektara, korištenje cijelog opsega snimljenih valnih duljina dalo je kvalitetnije modele od korištenja samo djela spektralnih podataka i izbacivanje uzoraka proizvoda od kukuruza i kave iz podataka za izradu modela dalo je kvalitetnije modele od onih razvijenih uključujući te podatke.

Najnereprezentativniji modeli dobiveni su korištenjem ograničenog broja valnih duljina (904 nm do 1040 nm i 1425 nm do 1525 nm). RMSEP i SEP za ove modele imali su najviše vrijednosti, a RPD im rangira od 1.6 do 1.9 što znači da ovi modeli ne bi mogli biti primijenjeni za kvantitativnu analizu proizvoda s obzirom na sadržaj akrilamida, te bi eventualno mogli biti korisni za razlučivanje između uzoraka s visokim i niskim sadržajima akrilamida. Korištenje samo dijela spektra koji sadrži apsorpcijske vrpce primarnih amida i spojeva s amino skupinom nije rezultiralo boljim predikcijskim modelima. Naprotiv, korištenje opsega valnih duljina u području od 1425 nm - 1525 nm dalo je jednako (model na spektru bez pretprocesiranja) ili manje reprezentativne modele od korištenja raspona valnih duljina od 904 nm - 1040 nm koji nije povezan s apsorpcijskim vrpcama kemijskih grupa karakterističnih za akrilamid. Ipak, ovakav rezultat nije u potpunosti neočekivan. U pravilu, u NIR spektroskopiji, smanjenje broja valnih duljina neće nužno dovesti do modela sa boljim predikcijskim mogućnostima. Naprotiv, NIR spektar sadrži suptilne informacije u

intenzitetima apsorpcije zračenja koje nisu vidljive kao pojedinačni pikovi (Adedipe i sur., 2016), tako da se smanjenjem broja valnih duljina, smanjuje i količina informacija o uzorcima.

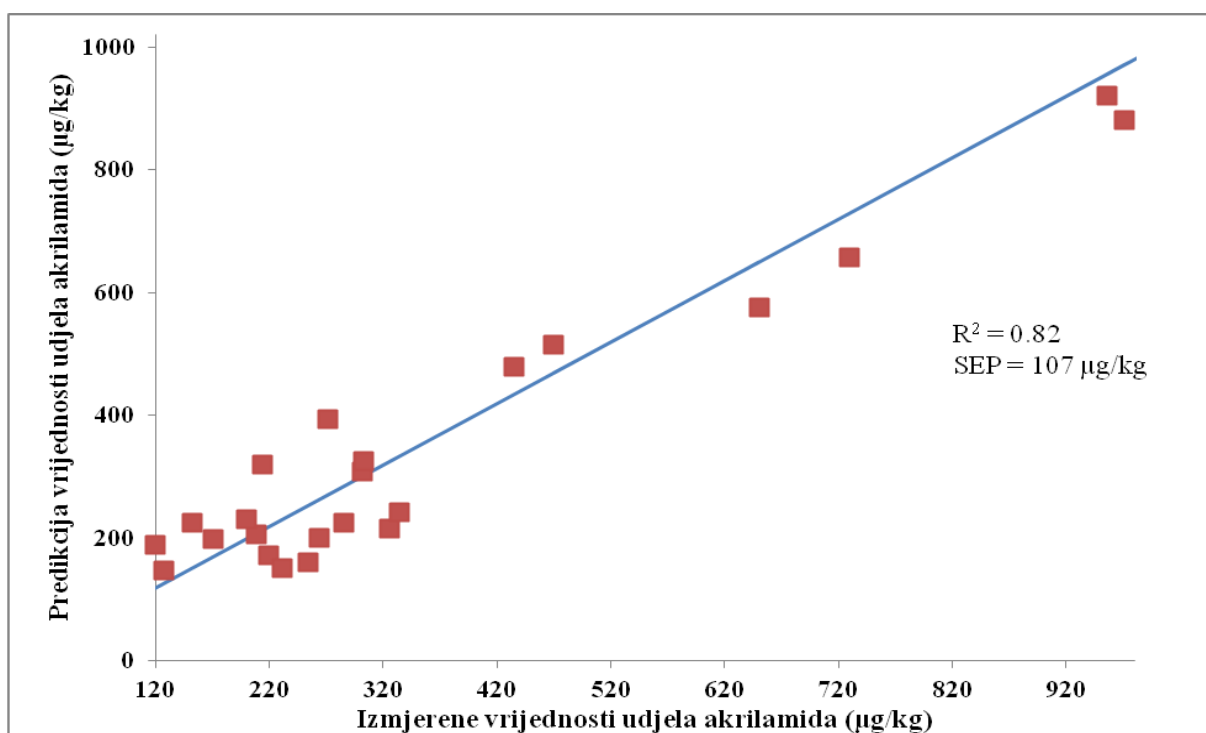
Modeli izrađeni korištenjem umekšanih spektara u rangu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm su u usporedbi s izvornim spektrima manje učinkoviti u predikciji udjela akrilamida u proizvodima. Imaju niže vrijednosti koeficijenta determinacije i RPD, a više vrijednosti RMSEP i SEP. Moguće je da je umekšavanje spektara, osim šumova, uklonilo i neke važne spektralne karakteristike povezane s koncentracijom akrilamida u proizvodima. Također, kao što je već spomenuto, funkcija umekšavanja spektara dovodi i do gubitka djela spektralnih podataka sa svakog kraja spektra što je u nekoj mjeri moglo utjecati na kvalitetu modela. RPD vrijednosti za ove modele kreću se od 2.0 do 2.1 te modeli nisu pogodni za primjenu u kvantitativnom probiru proizvoda s obzirom na razinu akrilamida, a mogli bi biti korisni za razlučivanje između uzoraka s visokim i niskim sadržajima akrilamida.

Modeli razvijeni na temelju izvornih spektara svih uzoraka korištenjem svih snimljenih valnih duljina (904 nm do 1699 nm) imali su koeficijente determinacije za predikciju u rangu od 0.81 do 0.85 i RPD vrijednosti od 2.3 do 2.6. Modeli razvijeni korištenjem pretprocesiranja (SNV+DE i MSC+DE) bili su bolji u predikciji udjela akrilamida u uzorcima od modela razvijenog na spektru bez pretprocesiranja i mogli bi se koristiti u svrhu probira na temelju udjela akrilamida u proizvodima. Pri tome je pretprocesiranje spektra uz pomoć MSC transformacije u kombinaciji s detrendiranjem rezultiralo najboljim predikcijskim modelom u ovoj kategoriji sa RPD vrijednosti 2.6 i SEP vrijednosti 99 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U izradi ovog modela korišteni su, uz spektre uzoraka na bazi krumpira i riže, spektri uzoraka na bazi kukuruza i kave. Uključenje ovih uzoraka daje modelu veću robusnost, ali zbog činjenice da se u svakoj od ovih kategorija nalazio samo po jedan uzorak, ovi modeli vjerojatno ne bi bili reprezentativni za predikciju udjela akrilamida u proizvodima iz tih kategorija.

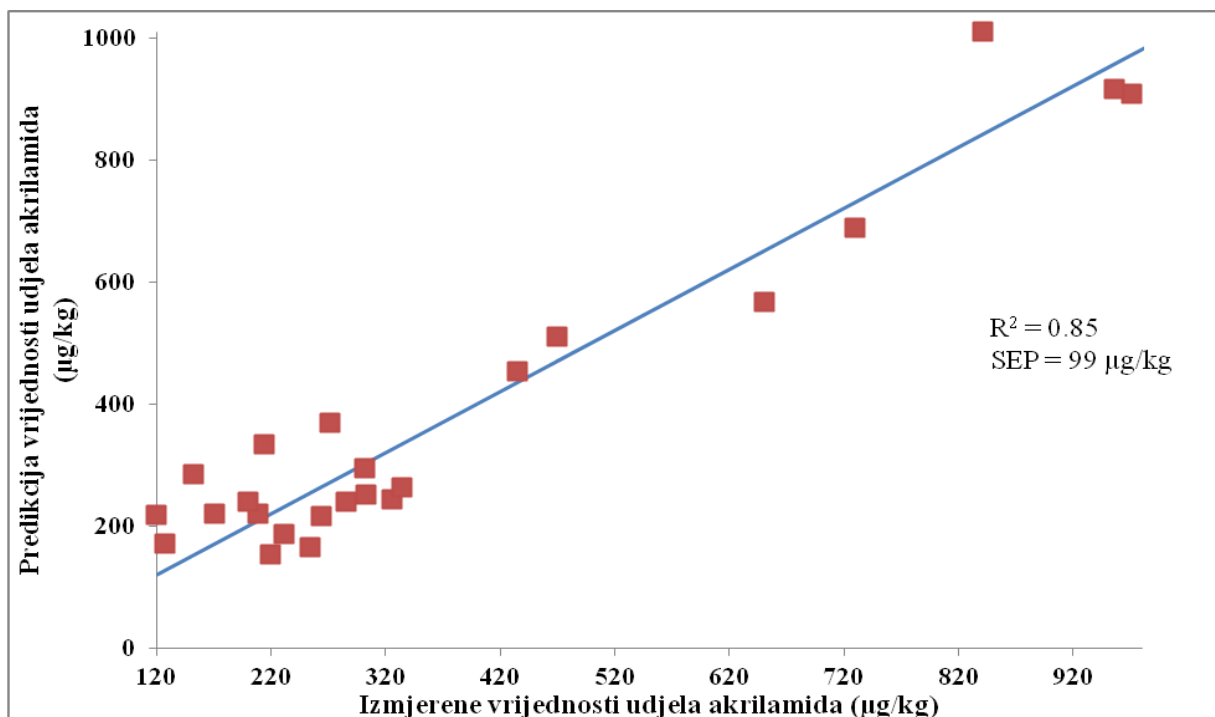
Najbolje vrijednosti statističkih pokazatelja predikcije imali su modeli dobiveni korištenjem svih snimljenih valnih duljina izvornih spektara nakon izbacivanja podataka o uzorcima proizvoda od kave i kukuruza. Kod ovih modela je pak pretprocesiranje negativno utjecalo na uspješnost predikcije. Općenito, svi modeli razvijeni na ovom skupu podataka imali su RPD vrijednosti veće ili jednake 2.6 što ih čini pogodnima za probir na temelju udjela akrilamida u proizvodima. Model razvijen korištenjem izvornog spektra bez pretprocesiranja imao je najvišu vrijednost koeficijenta determinacije za predikciju (0.87), najnižu SEP vrijednost (94

$\mu\text{g/kg}$) i najvišu RPD vrijednost (2.8) od svih razvijenih modela, odnosno najbolje statističke pokazatelje predikcije.

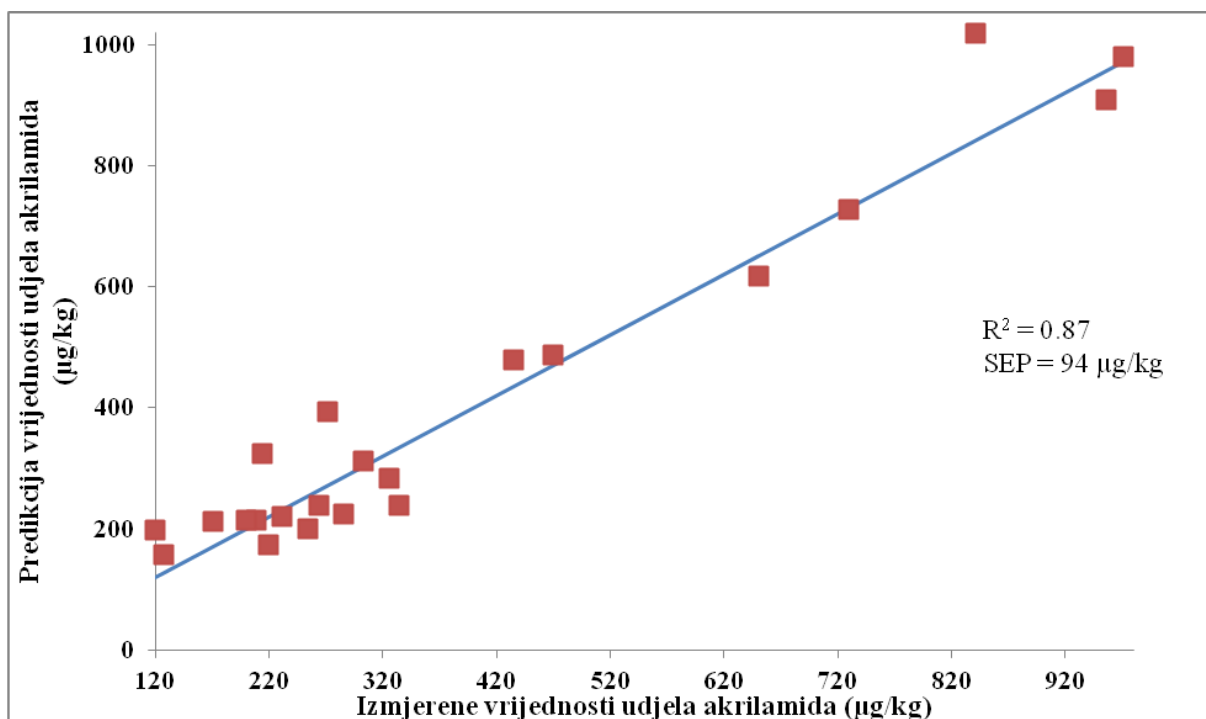
Slike br. 14 do br. 18 prikazuju grafove PLS regresijskih modela s odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za pet modela s RPD vrijednostima višim od 2.4. Na grafovima su prikazane predikcijske vrijednosti akrilamida samo za srednje vrijednosti NIR spektara za svaki uzorak, s navedenim vrijednostima predikcijskog koeficijenta determinacije i standardnom pogreškom predikcije.



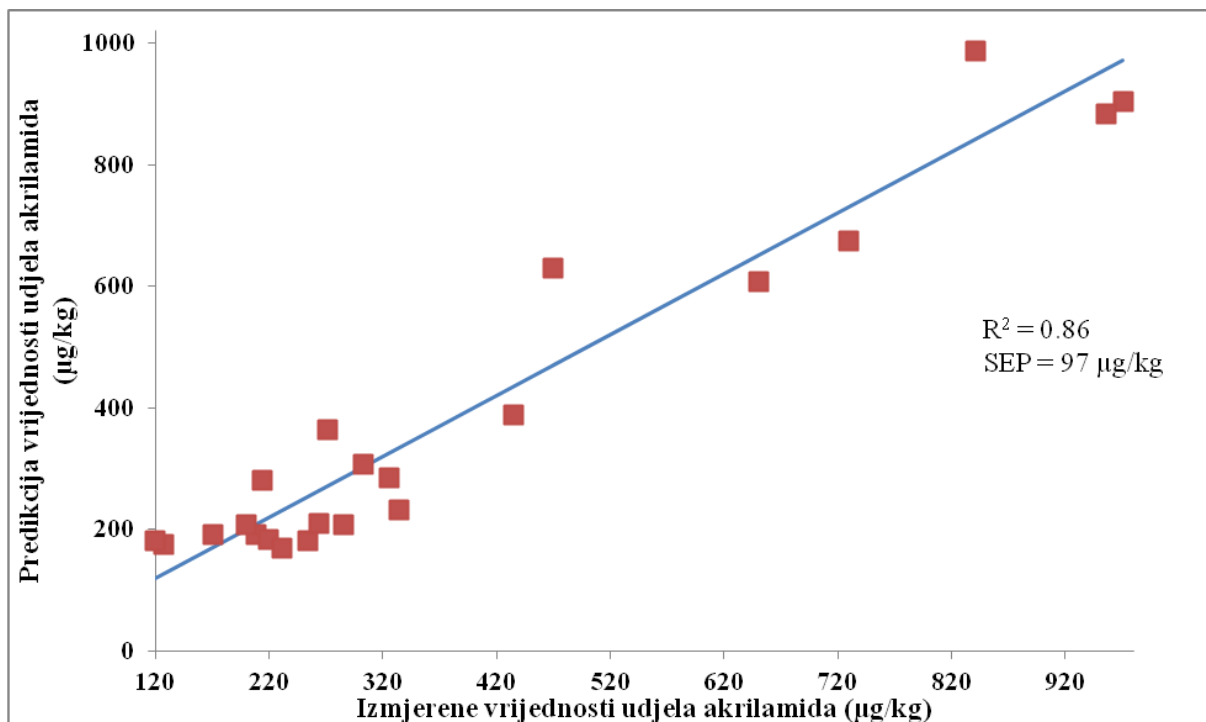
Slika br. 14 Graf PLS regresijskog modela sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za model razvijen na izvornim spektrima svih uzoraka u rasponu valnih duljina od 904nm - 1699 nm preprocesiranih sa SNV+DE



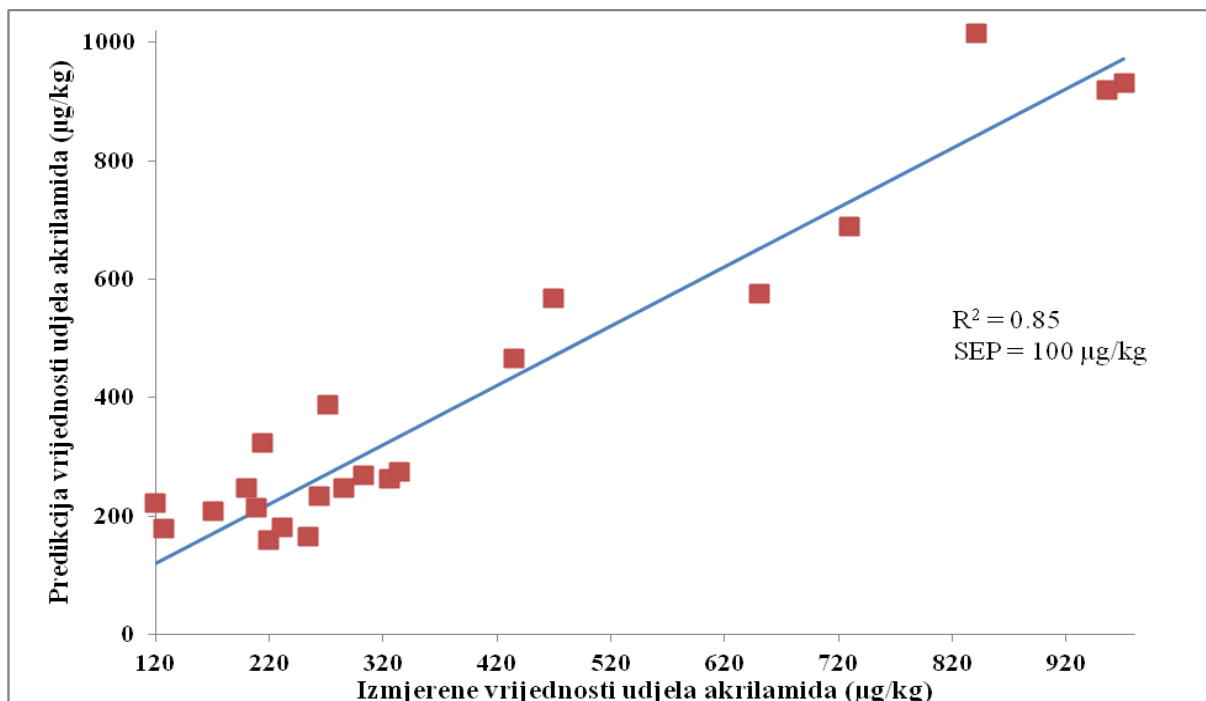
Slika br. 15 Graf PLS regresijskog modela sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za model razvijen na izvornim spektrima svih uzoraka u rasponu valnih duljina od 904nm - 1699 nm pretprocesiranih s MSC+DE



Slika br. 16 Graf PLS regresijskog modela sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za model razvijen na izvornim spektrima uzoraka Kr i R u rasponu valnih duljina od 904nm - 1699 nm bez pretprocesiranja



Slika br. 17 Graf PLS regresijskog modela sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za model razvijen na izvornim spektrima uzoraka Kr i R u rasponu valnih duljina od 904nm - 1699 nm pretprocesiranih s SNV+DE



Slika br. 18 Graf PLS regresijskog modela sa odnosom predviđenih i izmjerenih vrijednosti udjela akrilamida ($\mu\text{g/kg}$) za model razvijen na izvornim spektrima uzoraka Kr i R u rasponu valnih duljina od 904nm - 1699 nm pretprocesiranih s MSC+DE

Pretraživanjem literature, pronađeni su radovi u kojima su se NIR spektri koristili za razvoj modela za predikciju udjela akrilamida u proizvodima od krumpira, tj. u čipsu i prženim krumpirićima. Segtnan i suradnici (2006) razvili su model na NIR spektru uzoraka prženih krumpira u području valnih duljina od 400 do 2500 nm s prosječnom pogreškom predikcije 247 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i koeficijentom korelacije 0,952 ($R^2_{\text{pred}} = 0.91$). Ayvaz i Rodriguez-Saona (2014) razvili su modele na uzorcima čipsa koristeći stolne i ručne NIR spektroskope i spektre raspona valnih duljina 1000 nm - 2500 nm i 1600 nm - 2400 nm kojima je koeficijent korelacije (r) za predikciju varirao od 0.91 - 0.94 (R^2_{pred} 0.83 - 0.88), a RPD od 2.0 - 2.5 (uzimajući u obzir samo modele kod kojih je uz validaciju provedena i predikcija). Pedreschi i suradnici (2010) razvili su modele na vidljivom spektru (VIS)+NIR spektru (460 nm - 740 nm i 760 nm - 1040 nm) prženih krumpira s koeficijentom korelacije 0.83 ($R^2_{\text{pred}} = 0.69$), RPD 1.85 i SEP = 266 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok su Adedipe i suradnici (2016) razvili modele na prženim krumpirićima sa R^2_{pred} koji je rangirao od 0.74 do 0.97 i SEP od 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 475 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Od svih navedenih radova, samo u dva su korišteni uzorci iz maloprodaje, dok su u ostalim studijama uzorci pripremani od istih sirovina pod kontroliranim uvjetima prženja. Adedipe i suradnici (2016) razvili su modele na temelju NIR spektara za uzorke prženih krumpirića iz restorana s udjelima akrilamida od 211-3381 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Najreprezentativniji model dobiven korištenjem te skupine uzoraka imao je $R^2_{\text{pred}} = 0.86$, SEP = 255 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i RPD = 3. Ayvaz i suradnici (2015) razvili su modele na uzorcima čipsa iz maloprodaje s udjelima akrilamida od 178-1109 $\mu\text{g}/\text{kg}$, kojima je koeficijent korelacije (r) za predikciju varirao od 0.91 - 0.94 (R^2_{pred} 0.83 - 0.88), a RPD od 2.0 - 2.5, ako se uzmu u obzir samo modeli na kojima je provedena predikcija. Usporedbom modela razvijenih u ovom radu s dostupnim podacima iz literature, RPD vrijednosti i koeficijenti determinacije za modele iz ovog rada slažu se s rezultatima dosadašnjih istraživanja na sličnim uzorcima.

Segtnan i suradnici (2006) su u svom istraživanju uočili da su se, u EMSC-transformiranim spektrima raspona 400 nm do 2500 nm za 36 uzoraka, najveće razlike koje se mogu povezati sa razinom akrilamida nalazile u rasponu valnih duljina od 1900 nm do 2200 nm što se podudara s područjima prvog višeg tona i kombinacijskih vrpce u kojima se nalaze apsorpcijske vrpce za amide (slika br. 4). Zbog ograničenja korištenog spektrometra, ovaj raspon valnih duljina nije se nalazio u spektrima korištenima u ovom radu, ali moguće je da bi proširenje raspona valnih duljina u kojima su snimani spektri na ovu regiju imalo pozitivan učinak na reprezentativnost razvijenih modela.

Pet modela razvijenih u ovom radu imalo je RPD vrijednosti više od ili jednake 2.4, što znači da bi se mogli upotrijebiti u probiru uzoraka s obzirom na sadržaj akrilamida. Najreprezentativniji modeli izrađeni su korištenjem spektralnih podataka uzoraka na bazi krumpira i riže. Ovi uzorci obuhvaćali su proizvode iz maloprodaje koji su se osim prema osnovnoj sirovini razlikovali i prema ostalim sastojcima, varijetetu korištenih sirovina, načinima prerade, proizvodnje i skladištenja i sl. U odnosu na modele razvijene na uzocima između kojih je varijabilnost između uzoraka minimizirana upotrebom uzoraka dobivenih od iste sirovine istog varijeteta, podvrgnutima jednakim procesima skladištenja, rezanja i prženja kao u istraživanjima Segnan i suradnika (2006), Adedipe i suradnika (2016) i Pedreschi i suradnika (2010), modeli razvijeni u ovom radu imali su veću robusnost i primjenjivi su za analizu šireg raspona proizvoda.

Kako se akrilamid tijekom pečenja formira na površini proizvoda, njegova je koncentracija na površini uvijek veća nego u unutrašnjosti. Kako bi se udio akrilamida ujednačio u cijelom uzorku uzorci se često usitnjavaju prije snimanja spektara, pogotovo oni sa velikim omjerom volumena i površine. NIR metode koje se razvijaju za analizu i nadgledanje procesa u industrijskoj proizvodnji moraju biti brze i jednostavne za provedbu i zbog toga je uklanjanje koraka pripreme uzoraka poželjno. Zbog toga prije snimanja NIR spektara nije bilo nikakve pripreme uzoraka, već su spektri snimani na površini proizvoda. Utvrdilo se da se i bez prethodne pripreme, mogu razviti reprezentativni modeli za probir uzoraka s obzirom na udio akrilamida.

Zbog malog broja uzoraka, u ovom radu su za potrebe izrade modela korištena po tri izmjerena spektra i srednja vrijednost spektra za svaki uzorak. Treba se uzeti u obzir da je izrada modela na ovakvom skupu podataka mogla dovesti do toga da su dobivene pogreške predikcijskog modela manje nego je realno.

5. ZAKLJUČCI

1. Nakon PCA analize provedene na NIR spektrima u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm za uzorke na bazi krumpira, riže, kukuruza i kave, vidljiva je tendencija grupiranja uzoraka iz kategorija prema osnovnoj sirovini. Analizom glavnih komponenata postiglo se kvalitativno razdjeljivanje između uzoraka na bazi riže, krumpira i kave, a uzorak na bazi kukuruza grupirao se s uzorcima na bazi riže. PCA analiza je pokazala da postoje značajne razlike u NIR spektrima uzoraka na temelju osnovne sirovine.

2. LDA analizom provedenom na NIR spektrima uzoraka iz kategorija proizvoda na bazi krumpira i riže, uspješno su klasificirani uzorci s obzirom na vrstu proizvoda. U tri provedene LDA analize, sa 100%-tnom stopom točnosti, uspješno su klasificirani uzorci prema vrstama proizvoda na:

1. čips i rižine krekeri
2. slani čips, čips od paprike i rižine krekeri
3. slani čips, čips od paprike, rižine krekeri sa začinima i rižine krekeri bez začina

3. Pretprocesiranje NIR spektara provelo se korištenjem dvije metode: SNV transformacijom u kombinaciji s detrendiranjem i MSC transformacijom u kombinaciji s detrendiranjem. Obje metode dovele su do smanjenja efekata raspršenja u spektrima. Pretprocesiranje se u nekim slučajevima odrazilo pozitivno, a u nekima negativno na reprezentativnost razvijenih modela.

4. PLS regresijom razvijeno je ukupno 15 modela za predikciju sadržaja akrilamida. Pet modela razvijenih u ovom radu imalo je RPD vrijednosti više od ili jednake 2.4, što znači da bi se mogli upotrijebiti u probiru uzoraka s obzirom na sadržaj akrilamida. Ostalih 10 modela imalo je RPD vrijednosti u rasponu od 1.6 do 2.4 te bi eventualno mogli poslužiti za razlučivanje između niskih i visokih vrijednosti akrilamida. Najreprezentativniji model ($R^2_{\text{pred}} = 0.86$, $\text{SEP} = 255 \mu\text{g}/\text{kg}$ i $\text{RPD} = 3$) razvijen je na NIR spektrima uzoraka na bazi riže i uzoraka na bazi krumpira pretprocesiranim pomoću MSC transformacije u kombinaciji s detrendiranjem.

5. Korištenje dijelova spektra u usporedbi sa cijelim rasponom valnih duljina dalo je manje reprezentativne modele, čak i kada je korišteno područje valnih duljina (1425-1525 nm) u kojemu bi se teoretski trebale nalaziti apsorpcijske vrpce akrilamida. Može se zaključiti da ograničenjem područja valnih duljina prilikom razvoja modela dolazi do gubitka važnih spektralnih informacija povezanih sa udjelom akrilamida.

6. LITERATURA

Abdi, H. (2010) Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2**, 97-106.

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2**, 433-459.

Adedipe, O. E., Johanningsmeier, S. D., Truong V-D., Yencho, G. C. (2016) Development and Validation of a Near-Infrared Spectroscopy Method for Prediction of Acrylamide Content in French-Fried Potato. *J. Agr. Food Chem.* **64**, 1850-1860.

Anese, M., Manzocco, L., Calligaris, S., Cristina Nicoli, M. (2013) Industrially Applicable Strategies for Mitigating Acrylamide, Furan, and 5-Hydroxymethylfurfural in Food. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 10209-10214.

Ayvaz, H., Rodriguez-Saona, L. E. (2015) Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. *Food Chem.* **174**, 154-162.

McClements, D. J. (2003) Analysis of food products. <<https://people.umass.edu/~mcclemen/581Introduction.html>> Pristupljeno 13. ožujka 2018.

LibreTexts (2016) Combination bands, Overtones and Fermi Resonances. <[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Combination_Bands%2C_Overtones_and_Fermi_Resonances](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Combination_Bands%2C_Overtones_and_Fermi_Resonances)> Pristupljeno 26. rujna 2017.

Badanjak Sabolović, M., Rimac Brnčić, S. (2016) Utjecaj procesa pripreme na udio akrilamida u prerađenoj hrani. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 79-84.

Berrueta, L. A., Alonso-Salces, R. M., Héberger (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *J. Chromatogr., A* **1158**, (196-214).

Blanco, M., Villarroya, I. (2002) NIR Spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends Analyt. Chem.* **21**, 240-250.

Celignis Analytical (2018) Near Infrared Spectroscopy. <<https://www.celignis.com/NIR.php#>> pristupljeno 04. rujna 2018.

Dhanoa, M. S., Lister, R., Sanderson, R., Barnes, R. J. (1994) The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra. *J. Near Infrared Spec.* **2**, 43-47.

Dybing E., Farmer, P. B., Andersen, M., Fennell, T. R., Lalljie, S. P. D., Müller, D. J. G., Olin, S., Petersen, B. J., Schlatter, J., Scholz., G., Scimeca, J. A., Slimani, N., Törnqvist, M., Tuijtelaars, S., Verger, P. (2005) Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 365-410.

EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA J.* **10**, 2938.

EFSA (European Food Safety Authority) (2015) Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* **13**, 4104.

Esteve Agelet, L., Hurburgh Jr., C., R. (2010) A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **40**, 246-260.

Commission Recommendation of 3 May 2007 on the monitoring of acrylamide levels in food (2007/331/EC) Official Journal of the European Union, L123/33.

Cen, H., He, Y. (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Tech.* **18**, 72-83.

HAH (Hrvatska agencija za hranu) (2015) Znanstveno izvješće o rezultatima istraživanja akrilamida u hrani za 2014. godinu. <<https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-izvjesce-o-rezultatima-istrazivanja-akrilamida-u-hrani-za-2014-godinu.pdf>> Pristupljeno 28. rujna 2017.

Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y. (2008) Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *J. Food. Eng.* **87**, 303-313.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994) Acrylamide. U: Some Industrial Chemicals, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v. 60, International Agency for Research on Cancer, Lyon, str. 389-435.

IFST (Institute of Food Science and Technology) (2017) Acrylamide in foods. <<https://www.ifst.org/knowledge-centre/information-statements/acrylamide-foods-1>> Pristupljeno 29.07.2018.

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.

Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., Soltanizadeh, N. (2011) Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 340-363.

Metrohm (2013) NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes, Metrohm Ltd., Herisau.

Pasquini, C. (2003) Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Brazil. Chem. Soc.* **14**, 198-219.

Pedersen, M., von Stedingk, H., Botsivali, M., Agramunt, S., Alexander, J., Brunborg, G., Chatzi, L., Fleming, S., Fthenou, E., Granum, B., Gutzkow, K. B., Hardie, L. J., Knudsen, L. E., Kyrtopoulos, S. A., Mendez, M. A., Merlo, D. F., Nielsen, J. K., Rydberg, P., Segerbäck, D., Sunyer, J., Wright, J., Törnqvist, M., Kleinjans, J. C., Kogevinas, NewGeneris Consortium (2012) Birth Weight, Head Circumference, and Prenatal Exposure to Acrylamide

from Maternal Diet: The European Prospective Mother-Child Study (NewGeneris). *Environ. Health Persp.* **120**, 1739-1745.

Pedreschi, F., Mariotti, M. S., Granby, K. (2014) Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 9-20.

Pedreschi, F., Segtnan, V. H., Knutsen, S. H. (2010) On-line monitoring of fat, dry matter and acrylamide contents in potato chips using near infrared interactance and visual reference imaging. *Food Chem.* **121**, 616-620.

Preporuka Komisije od 8. studenoga 2013. o ispitivanju razina akrilamida u hrani (2013/647/EU) Službeni list Europske unije, L301/15.

Rinnan, Å., van der Berg, F.W., Balling Engelsen, S. (2009) Review of the Most Common pre-Processing Techniques for Near-Infrared Spectra. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **28**, 1201-1222.

Segtnan, V. H., Kita, A., Mielnik, M., Jørgensen, K., Knutsen, S., H. (2006) Screening of acrylamide contents in potato crisps using process variable settings and near-infrared spectroscopy. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 811-817.

Stadler, R. H., Scholz, G. (2004) Acrylamide: An update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control. *Nutrition Reviews* **62**, 449-467.

Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R. H., Gondé, P., Eijck, P., Lalljie, S., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Müller, D., Tallmadge, D., O'Brien, J., Thompson, S., Silvani, D., Whitmore, T. (2004) A Review of Acrylamide: An industry Perspective on Researchm Analysis, Formation, and Control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 323-347.

Uredba komisije (EU) 2017/2158 od 20. studenog 2017. o uspostavi mjera za ublažavanje učinaka i razina referentnih vrijednosti radi smanjenja prisutnosti akrilamida u hrani. Službeni list Europske Unije, L304/24.

Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R., Barnes, S., Groopman, J. (2014) Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature. *Nutr. Cancer* **66**, 774-790.

Wenzl, T., Beatriz de la Calle Guntiñas, M., Anklam, E. (2003) Overview of Analytical Methods for the Determination of Acrylamide in Food Products. *Food Addit. Contam.* **20**, 885-902.

Williams, P. (2010) The RPD Statistic: A Tutorial Note. *NIR News* **25**, 22-26.

Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **58**, 109-130.

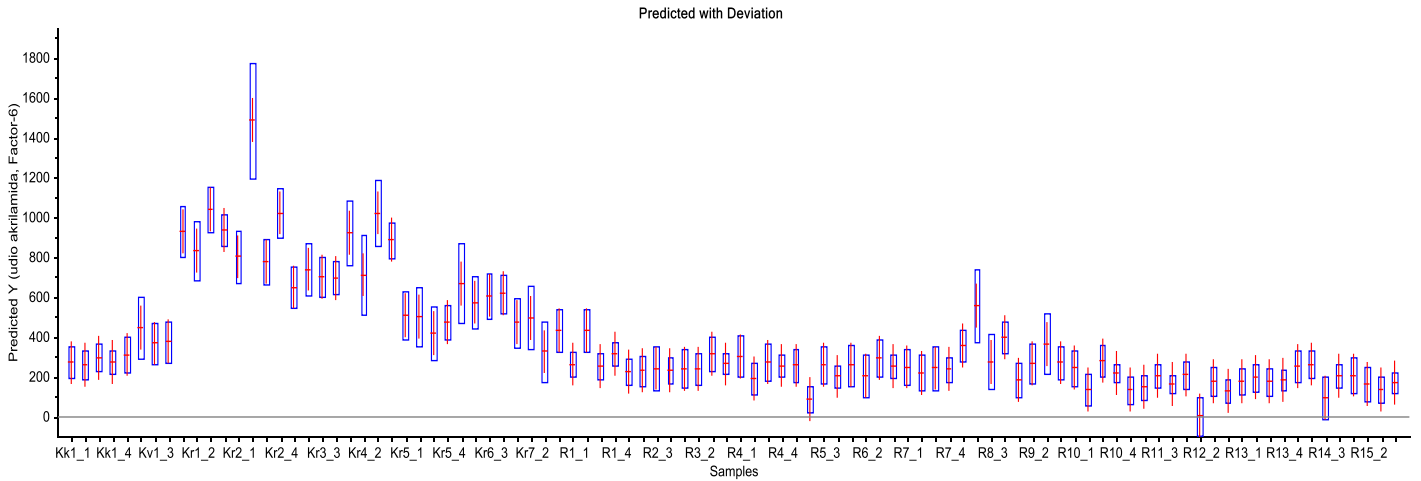
Xu, Y., Cui, B, Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., Shi, J. (2014) Risk assesment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food Chem. Toxicol.* **69**, 1-12.

Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., Villagran, M. D. (2003) Acrylamide Formation Mechanisms in Heated Foods. *Agric. Food. Chem.* **51**, 4782-4787.

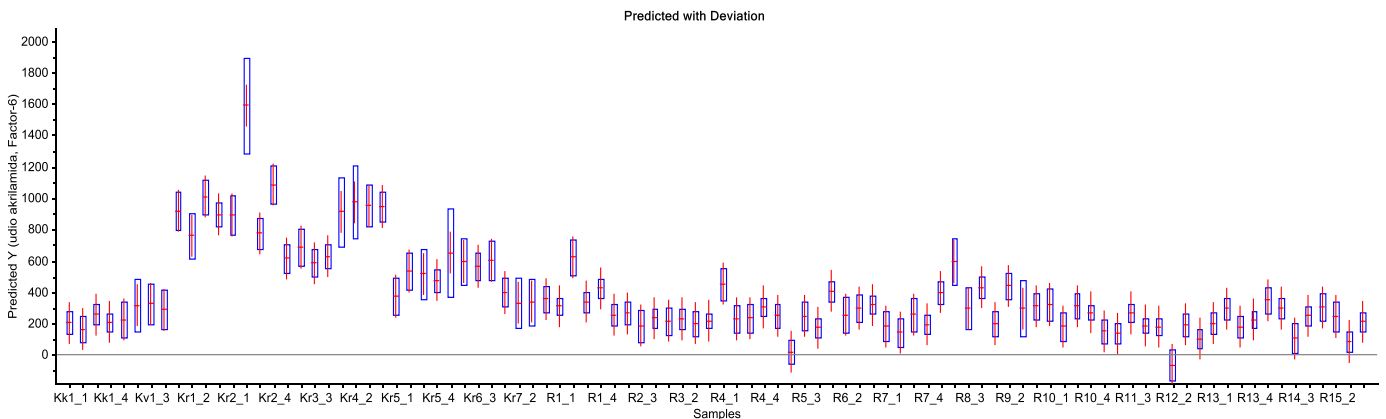
7. PRILOZI

U prilogima su prikazani rezultati predikcije korištenjem modela iz programa Unscrambler X. Modeli su numerirani kako je prikazano u tablici br. 9.

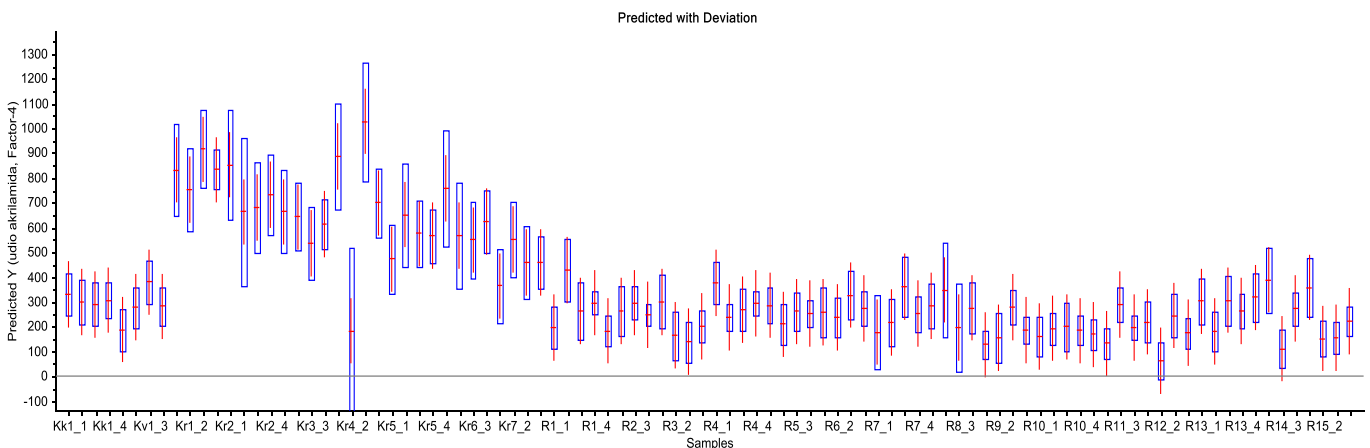
Prilog 1. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 1



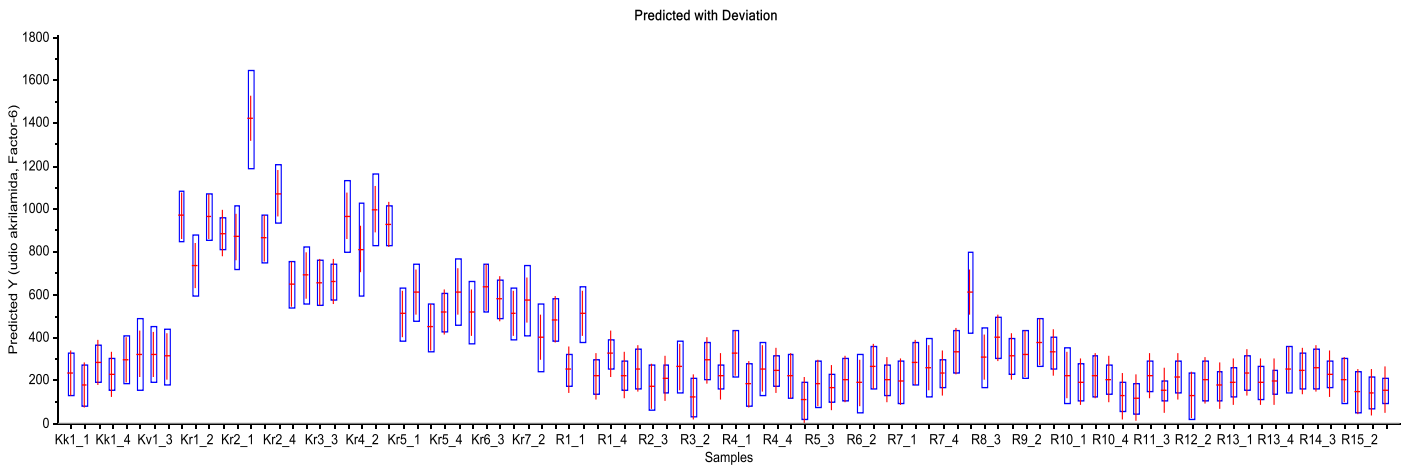
Prilog 2. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 2



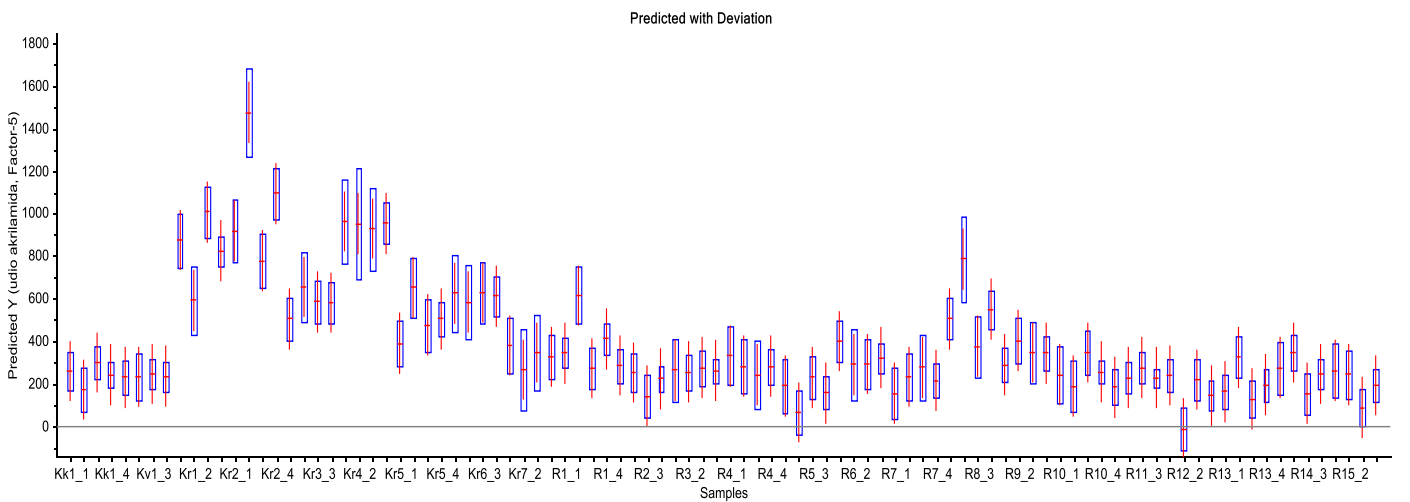
Prilog 3. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 3



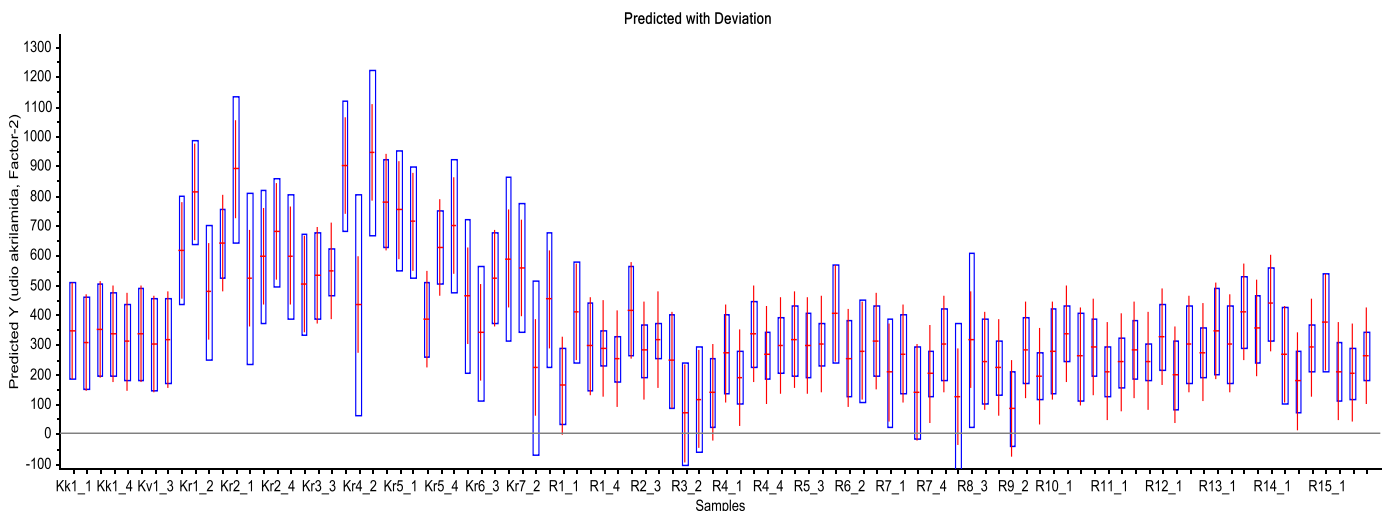
Prilog 4. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 4



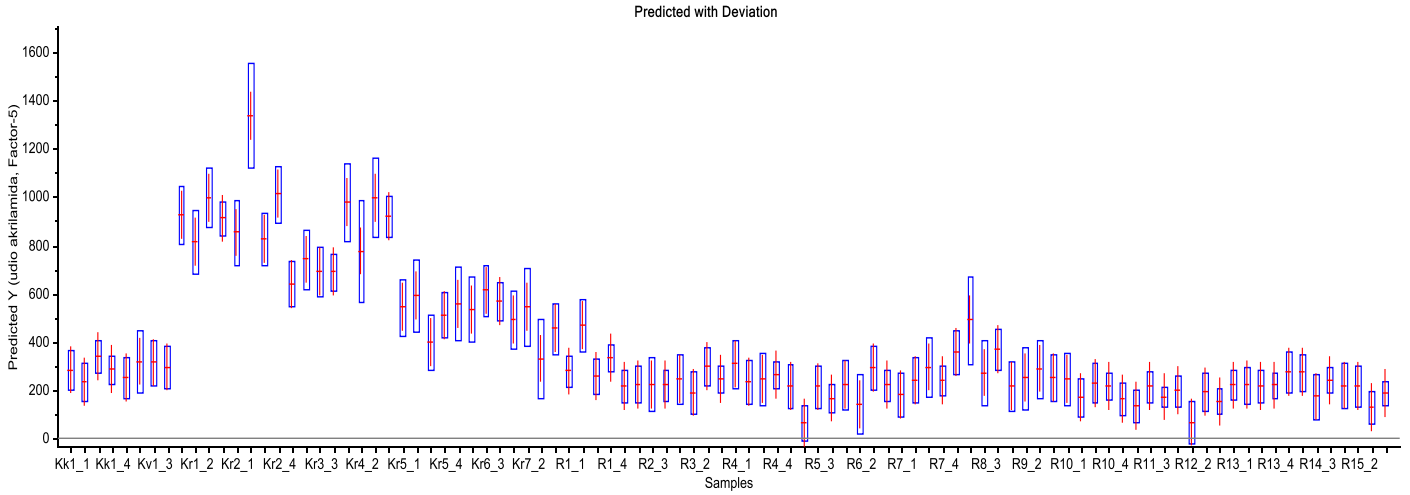
Prilog 5. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 5



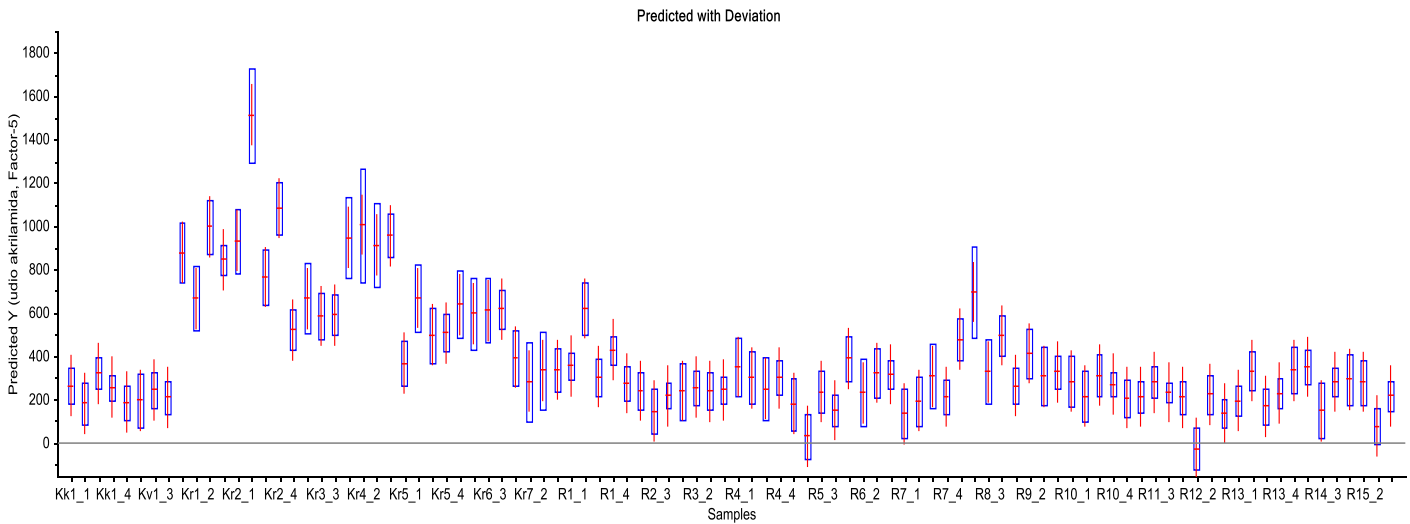
Prilog 6. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 6



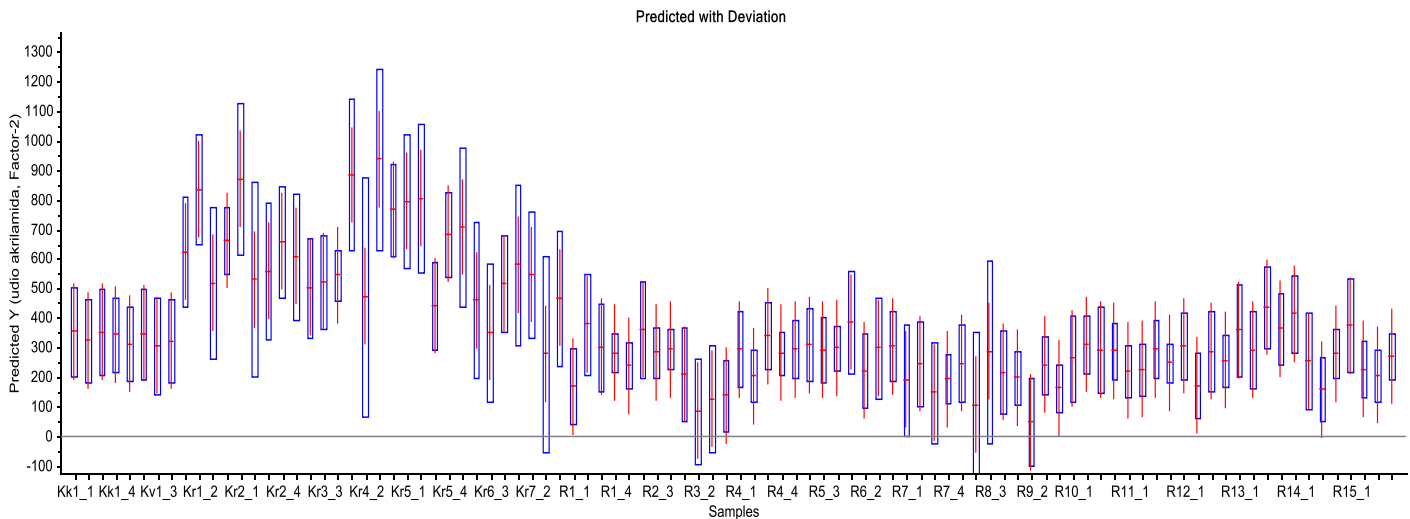
Prilog 7. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 7



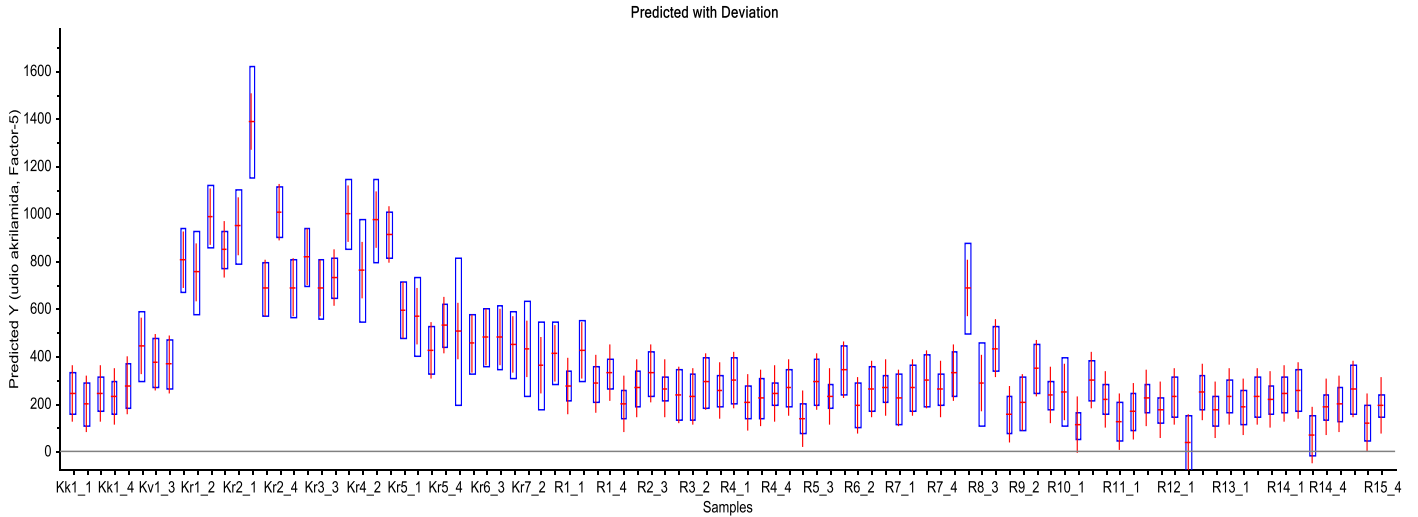
Prilog 8. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 8



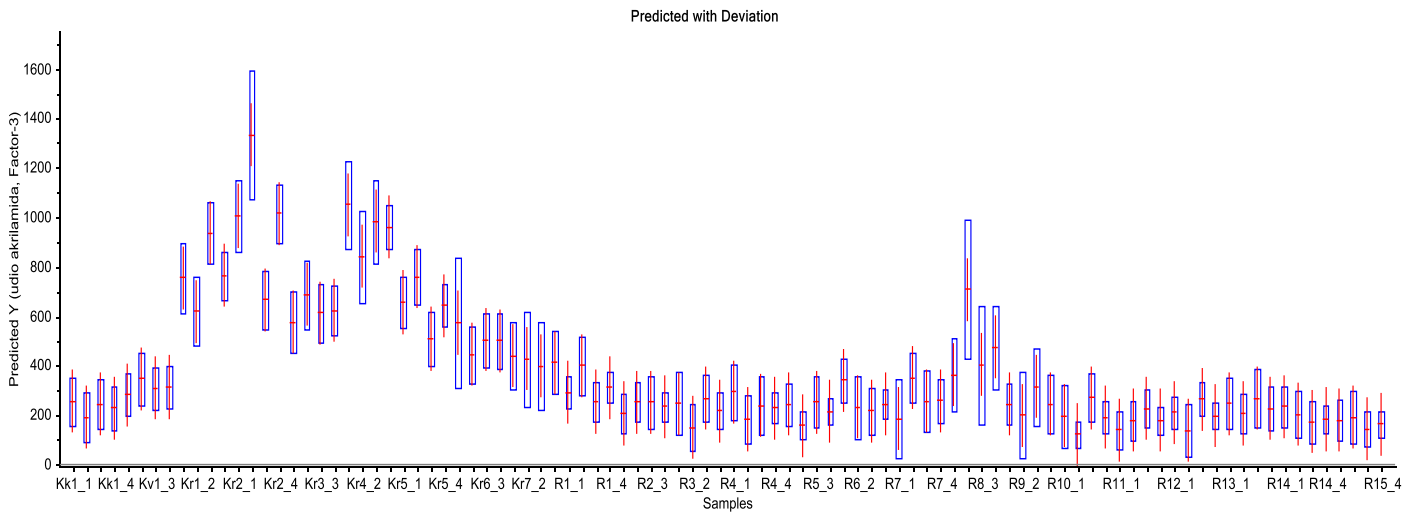
Prilog 9. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 9



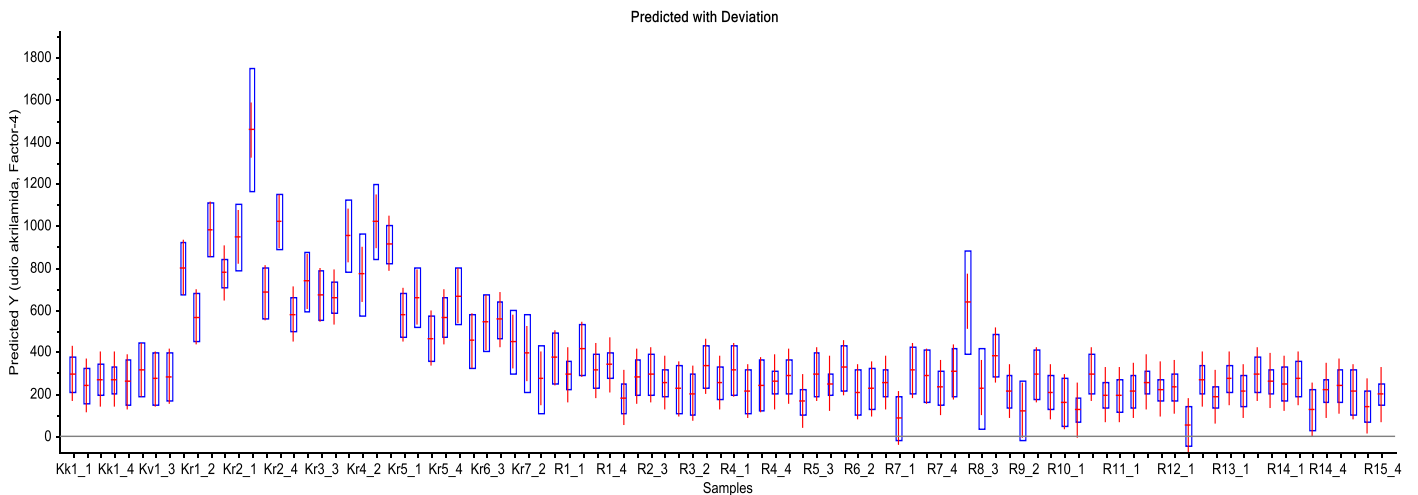
Prilog 10. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 10



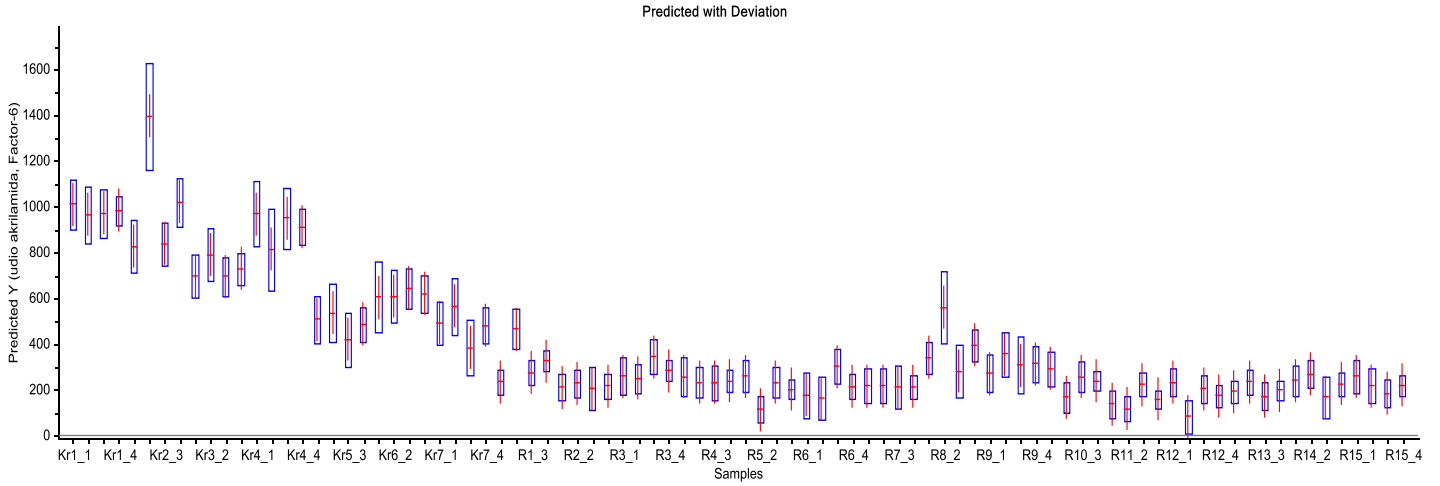
Prilog 11. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 11



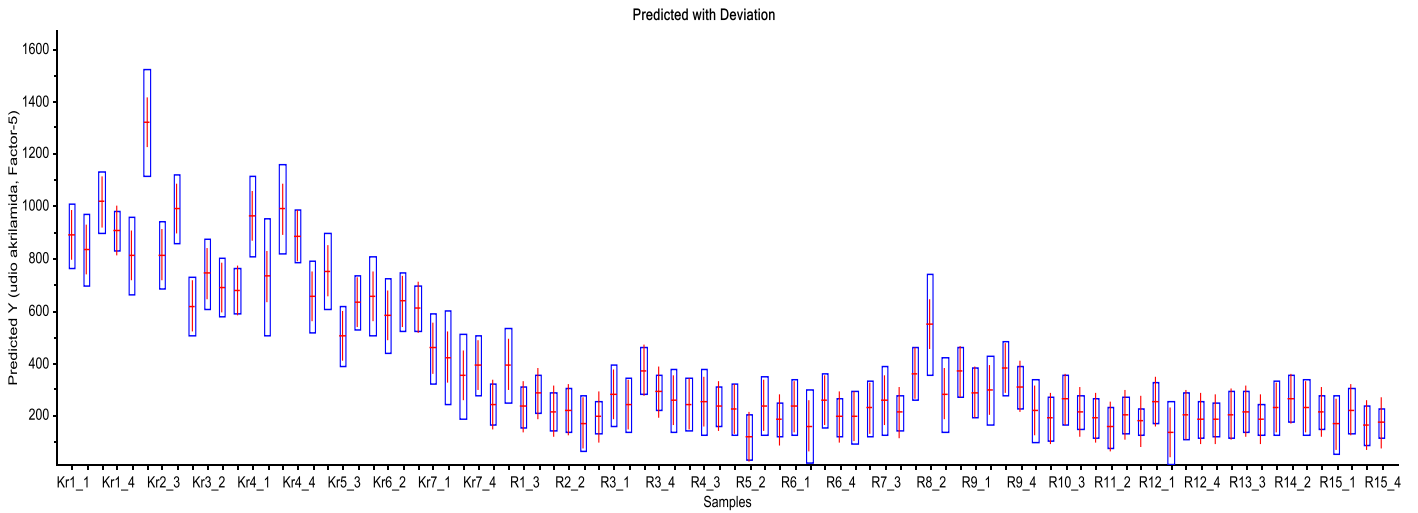
Prilog 12. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 12



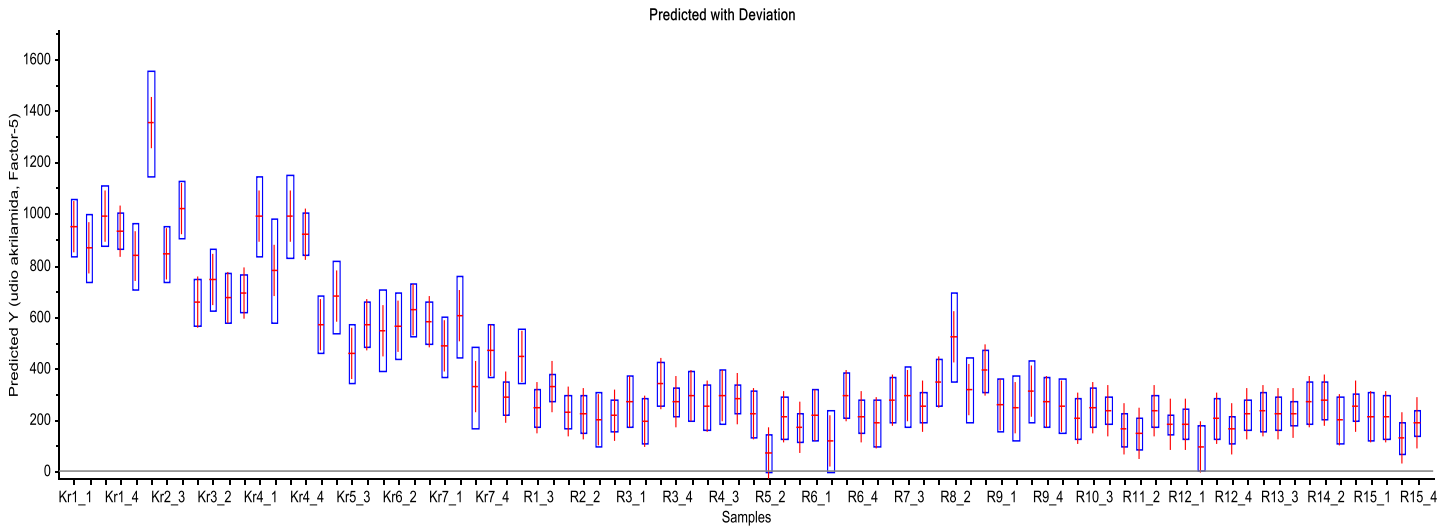
Prilog 13. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 13



Prilog 14. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 14



Prilog 15. Predviđene vrijednosti akrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) korištenjem modela br. 15



IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mateja Pavlinić