

Analyse af akrylamid, asparagin og reducerende sukker i hvedebrød

En nylig udviklet SPE-LC-MS/MS-metode kan give en samtidig bestemmelse af akrylamid og udgangsstofferne asparagin og reducerende sukker. Det kan bruges til at vurdere, hvorfor og hvornår der findes akrylamid i ristet hvedebrød

Af Nikoline Juul Nielsen og Kit Granby, Danmarks Fødevareforskning, Leif Skibsted og Rikke Vingborg Hedegaard, KVL

Der dannes akrylamid, når kulhydratholdige fødevarer udsættes for bruningsprocesser (bagning, stegning, fritering, ristning). Ud over temperaturen afhænger akrylamiddannelsen bl.a. af mængden af asparagin og reducerende sukker. Specielt asparagin kan opbruges under bruningsprocessen, hvorved dannelsen af akrylamid stopper.

Siden svenske forskere i april 2002 offentliggjorde fund af akrylamid i kulhydratholdige fødevarer udsat for bruningsprocesser har vi fået en betydelig større viden om, hvilke faktorer der har betydning for, hvor meget akrylamid vi finder i vores føde- og drikkevarer. Det er meget godt illustreret ved antallet af videnskabelige publikationer, der nu er over 50.

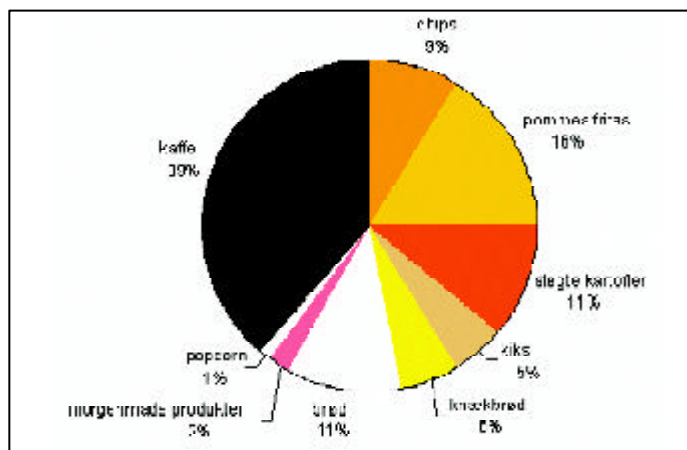
Hvor farligt er akrylamid?

Akrylamid er kræftfremkaldende i gnavere og klassificeret som »sandsynligvis kræftfremkaldende i mennesker«. Molekylet omsættes i kroppen til glycidamid, der er genotoksisk. Et genotoksin er bl.a. karakteriseret ved ikke at have en nedre grænse for effekt. Det betyder, at et enkelt molekyle kan inducere kræft, og at eksponering for højere koncentrationer øger kræft risikoen [1].

Risikoen for at få akrylamid-induceret kræft ligger mellem 200 og 800 i en population på 1 million, når den estimeres på baggrund af de risikoparametre, der anvendes af WHO, EPA og EU. Generelt indtager kvinder mindre akrylamid fra kosten end mænd, piger mindre end drenge og ikke-kaffedrikkere mindre end kaffedrikkere [2]. Akrylamid passerer moderkagen og kan overføres til modermælken. Især fostre og diende spædbørn kan udsættes for høje niveauer [3].

Sådan dannes akrylamid

Udgangsstofferne for akrylamid er aminosyren asparagin og de reducerende sukker fructose og glucose. Amin-N fra asparagin og carbonyl-C fra den reducerende sukker forbindes med en dobbeltbinding ved kondensation. Herved dannes en Schiff-base i ligevægt med N-glycosyl-asparagin. Schiff-basen stabiliseres som oxazolidin-5-on ved intramolekylær ringdannelse. Intermediatet decarboxylerer relativt let ved stuetemperatur - i modsætning til asparagin - og bliver til et stabilt azomethinylid, der tautomeriserer, protonerer og danner et decarboxyleret Amadori-produkt. Selvom Amadori-produktet kan dannes ved moderate tem-



Figur 1. Dagligt indtag af akrylamid fra fødevarer i Sverige fordelt på fødevaretyper. Data fra [10].

peraturer, er høje temperaturer en forudsætning for at bryde den kovalente C-N-binding, der medfører, at akrylamid dannes [4].

Da den reaktive asparagin-specie har uladet aminogruppe, accelereres akrylamiddannelsen af højere pH. Asparagins pKa₂-værdi sænkes ved stigende temperaturer, dvs. den uladete form indtræder ved lavere pH ved høje temperaturer.

Akrylamid fordampes ved 192°C, og da omsætningen forløber hurtigere ved høje temperaturer, er den endelige koncentration i fødevaren ikke altid forudsigelig.

Andre faktorer med indflydelse på akrylamidindholdet er koncentration af udgangsstoffer, tilberedningstid, overflade: volumenratio, vandindhold, bruningsgrad og fødevarematricens sammensætning.

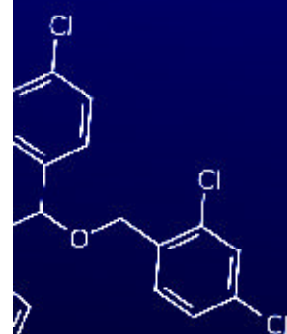
Udgangsstofferne

Der er sammenhæng mellem akrylamidindholdet i tilberedte fødevarer og udgangskoncentrationerne af asparagin og reducerende sukker. Fructose har dobbelt aktivitet sammenlignet med glucose [5].

Kartofler er en stivelsesholdig fødevare, der er rig på asparagin, og i tilberedte kartoffelprodukter ses høje akrylamidniveauer, men også en stor spredning.

Kemisk Ordbog

udgave



NY UDGAVER


Nyt Teknisk Forlag

Køb direkte
på nyttf.dk
eller ring på
63 15 17 00

www.nyttf.dk


Nyt Teknisk Forlag

Ingerslevsgade 44
1705 København V
Telefon 63 15 17 00
Fax 63 15 17 28
E-mail info@nyttf.dk
www.nyttf.dk

Kemisk Ordbog

Alfabetisk fortegnelse over mere end 13.000 stofnavne, stofklassebetegnelser, akronymer og forkortelser, E-nummerkoder samt navnedele (præfikser mv.) til brug ved opbygning af systematiske navne.

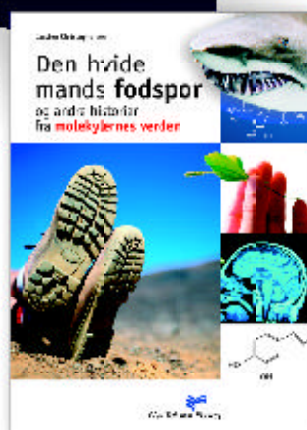
Bogen indeholder blandt andet en lang række ældre kemiske navne, ca. 900 fællesnavne for lægemiddelstoffer (herunder alle for tiden indregistrerede lægemidler i Danmark) og over 800 fællesnavne for pesticider med oversættelse til moderne kemiske navne, hvorfra strukturen kan afledes.

Ordbogen er opdelt i fire dele:

- Kemiske ord
- Kemirelaterede akronymer
- E-numre
- Tabeller

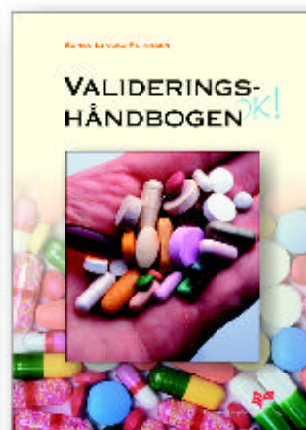
kemiord.dk

Med bogen følger 12 måneders adgang til opslagsværket www.kemiord.dk, der er en elektronisk udgave af Kemisk Ordbog.
199 kr. inkl. moms



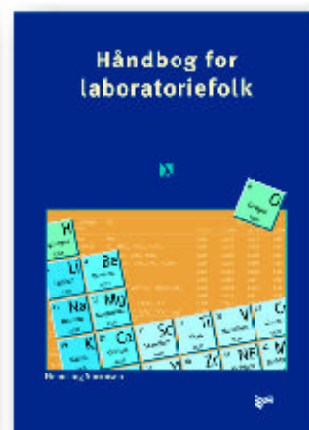
Den hvide mands fodspor

Carsten Christophersen har samlet en række artikler om kemi "i øjenhøjde". Samlingen er en række fascinerende historier om naturens forunderlige verden: Naturmedicin – overtro eller viden; 55 millioner år gammel drivhus-effekt; Arsenik til frokost styrker halbredet og mange flere historier til lystlæsning eller gymnasieundervisning.
130 kr. inkl. moms



Valideringshåndbogen

En praktisk vejledning i forståelse og udførelse af valideringsaktiviteter i den farmaceutiske og medicinske industri. Henvender sig primært til personer, der kommer i berøring med emnet validering, enten som udførende i valideringsaktiviteter, eller fordi en grundlæggende viden om validering er nødvendig at have.
157 kr. inkl. moms



Håndbog for laboratoriefolk 2. udgave

Formel- og tabelsamling til brug under arbejdet i det analytiske laboratorium. Et let håndterbart opslagsværk, hvor man nemt kan hente informationer om kemiske og fysiske størrelser.
Ny og udvidet udgave af den tidligere Laboratoriehåndbogen.
149 kr. inkl. moms

F.eks. er der i danske pommes frites målt koncentrationer mellem 50 og 4000 mg kg⁻¹ [6]. I kartoffelprodukter er sukkerindholdet ofte den begrænsende faktor for akrylamiddannelsen [5]. Da kornprodukter generelt indeholder mindre asparagin (0,15-0,4 g kg⁻¹ (vv)) end kartofler (2-4 g kg⁻¹ (vv)), er forholdene måske anderledes for fødevarer baseret på korn.

Derfor undersøgte vi asparaginnæmængdens indflydelse på akrylamidindholdet i uristet og ristet hvedebrød.

Analyse af akrylamid og udgangsstofferne

Analyse af akrylamid i fødevarer udføres hovedsageligt med LC-MS/MS eller GC-MS/MS. På Danmarks Fødevareforskning implementeredes der i 2002 med få modifikationer en SPE-LC-MS/MS-metode [7].

I akrylamidforskning bestemmes asparagin ved:

- kommercielt tilgængelige EZ-faast kit og GC-MS [8],
 - derivatisering med FMOCCl, separation på C8-kolonne og fluorescens detektion [5] eller
 - ionkromatografi med postkolonne derivatisering med ninhydrin og spektrofotometrisk detektion [9].
- Sukkerbestemmelser er udført enzymatisk [5] eller med ionkromatografi og amperometrisk detektion [8].

For at kunne reducere akrylamidindholdet i spiseklare fødevarer, var der behov for en analysemetode til samtidig bestemmelse af akrylamid, asparagin, fructose, glucose og sucrose. Det var af mange grunde naturligt at tage udgangspunkt i den allerede etablerede akrylamidmetode, idet den repræsenterer state-of-the-art, er meget anvendt, godt valideret, LC og MS er baseret på generelt anvendelige separations- og detektionsprincipper og udstyr og knowhow var til stede.

Metodeudvikling

Der blev afprøvet fire ekstraktionssolventer, prøveoprensning ved proteinfældning med Carrez-reagens, to forskellige SPE-kolonner, SPE-konditionering med og uden prøveopløsning, forskellige SPE-elueringssolventer og volumener, to forskellige LC-kolonner, tre forskellige mobile faser og diverse parametre i forbindelse med optimal MS-detektion. Den endelige metode er kort opridset i faktaboksen.

Det viste sig at proteinfældning med Carrez-reagens øger signal-støjforholdet for akrylamid, men fælder både asparagin og sukker. Introduktion af jern- og zinkioner i MS'en er ikke en god løsning på længere sigt, hvorfor Carrez-oprensning ikke bruges her.

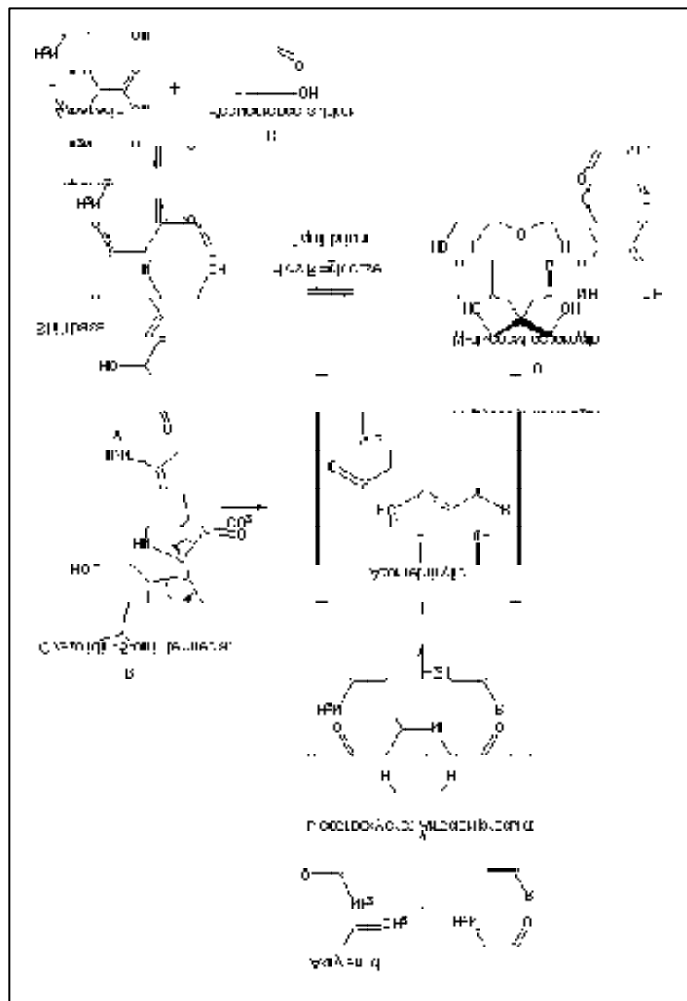
Endelig metode til akrylamidanalyse

Den homogeniserede prøve ekstraheres med vand, centrifugeres, oprenses på C18-fase (SPE)-kolonne, filtreres og detekteres ved LC-MS/MS med elektrospay i positiv ion mode (akrylamid og sukker) og negativ ion-mode (asparagin).

LC-MS/MS

Analytterne detekteres ved væskkromatografi tandem massepektrometri. Der analyseres på specifikke produktioner, der dannes ved kollision med argon i en kollisionscelle ud fra stoffer med et specifikt masse-ladningsforhold adskilt i det første massespektrometer (Multiple Reaction Monitoring (MRM)).

Analytterne kunne alle detekteres ved elektrospay i positive ion-mode. Asparagin gav et bedre signal-støjforhold i negativ ion-mode efter introduktion af prøvematrix, selvom MRM-respons var højest i positiv ion-mode. Det var ikke muligt at detek-



Figur 2. Mekanisme for dannelse af akrylamid under fødevarer tilberedning. Fra [4].

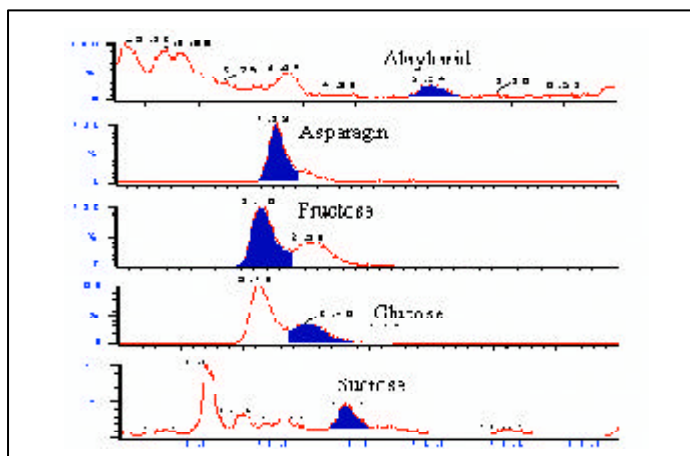
tere samtidig i positiv og negativ ion-mode, da spændingsskiftet resulterede i gnistdannelse ved kapillarnålen.

Sucroses retentionstid og den efterfølgende ekvibreringstid er bestemmende for analysenetiden. Sucrose eluerede efter 30 minutter med vand. Dette forbedredes noget ved at tilsætte 0,1% myresyre. Brug af acetonitrilgradient viste sig at være svær at reproducere. Et apolært solvent transporter sandsynligvis også flere interferencer til detektoren end et rent vandigt system. Fructose og glucose eluerer som en dobbelttop i vandig mobil fase. Vi forsøgte at tilsætte en smule methanol til den mobile fase, da det giver en anelse højere akrylamidrespons, men det resulterede i sammenfald af fructose- og glucosetoppene. Både kolonnens evne til at tilbageholde sucrose og adskille fructose og glucose mindskedes jo flere prøver, der kørt på kolonnen.

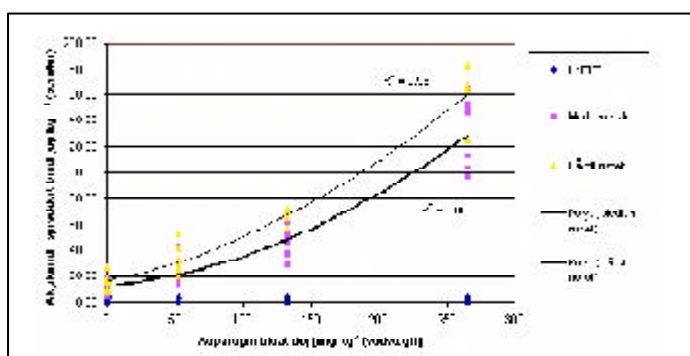
Sukkerstofferne ioniseredes i »clustre« med natrium- eller ammoniumderivater, hvoraf natriumderivater altid gav højest respons.

Validering

Standardkurver fremstilles i vand. Kalibreringskurven for akrylamid og asparagin fittes lineært, mens kalibreringskurverne for sukkerne fittes kvadratisk. Mærkede interne standarder for akrylamid og asparagin er kvantificerede for at kompensere for matrixeffekter og variation i detektorrespons. Dynamisk interval ligger på 10-50.000 µg kg⁻¹ for akrylamid, 1,8-500 mg kg⁻¹ for asparagin, 100-1.000 mg kg⁻¹ for fructose og glucose og 20-300 mg kg⁻¹ for sucrose. Ved spike-forsøg på tre niveauer udført på tre dage af to personer (studerende og kemiker) gen fandtes mel-



Figur 3. Kromatogrammer fra analyse af hvedebrød. Akrylamid detekteres ved MRM 72>55 her under detektionsgrænsen, asparagin ved 131>114, fructose og glucose ved 383>203 og sucrose ved 365>203.



Figur 4. Korrelationen mellem asparagin tilsat dej og akrylamid dannet i brød efter medium eller hård ristning.

lem 82 og 93% af akrylamiden og mellem 96 og 120% af asparaginen. Store afvigelser fra 100% sås ved laveste spike-niveau, der lå nær detektionsgrænsen. Detektionssgrænsen for akrylamid var $13 \mu\text{g kg}^{-1}$ og for asparagin $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$. Acceptable sukker-genfindinger opnåedes efter prøvafortynding. Ved kvantificering af sukker er analyseresultaterne korrigeret for genfinding.

Metoden har været anvendt til brødforsøg

Metoden har været anvendt til at kvantificere asparagin, fructose, glucose, sucrose og akrylamid i uristet og ristet brød bagt med forskellige udgangsniveauer af asparagin. Brødene er bagt i test-bageri hos en brødproducent i forbindelse med et samarbejds-projekt om at reducere akrylamid i fødevarer. Der var tydelig korrelation mellem:

- mængden af akrylamid dannet i uristet og ristet brød og mængden af asparagin tilsat dejen inden bagning.
- mængden af akrylamid dannet i ristet brød og mængden af asparagin eller produktet af asparagin og reducerende sukker i brødet før ristning.

Både asparaginniveauet og ristningsgraden var signifikante faktorer for akrylamidindholdet i det færdige produkt. Sucrose-niveauet er en faktor 10^3 lavere end fructose- og glucoseniveauet og giver ikke et væsentligt bidrag til hvedebrødets sukkerind-

hold. En stor del af asparaginen omsættes allerede ved fermentering og bagning uden nogen nævneværdig akrylamiddannelse. På de laveste tilsætningsniveauer udtømmes asparaginniveauet efter hård ristning, hvilket er en klar indikation af, at asparagin er den begrænsende faktor i akrylamiddannelse i hvedebrød.

Er akrylamid i hvedebrød et problem?

Akrylamidniveauet i hvedebrød er generelt lavt, men afhænger i høj grad af melets indhold af asparagin og af om brødet ristes eller ej. Vores forsøg illustrerer, hvordan akrylamidindholdet i det færdige brødprodukt øges en faktor 20 ved høje udgangskoncentrationer af asparagin og hård ristning. Akrylamid fra hvedebrød udgør omkring 10% af vores daglige indtag fra fødevarer [10]. Denne andel samt det totale indtag fra fødevarer kan øges betydeligt ved valg af brødprodukter med høje akrylamidkoncentrationer.

E-mail-adresser

Nikoline Juul Nielsen: nikoline@dsr.kvl.dk

Kit Granby: kgr@dfvf.dk

Referencer

1. Friedman, M. (2003): Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, bind 51, s. 4504-4526.
2. Dybing, E.; Sanner, T. (2003): Risk Assessment of Acrylamide in Foods. *Toxicological Sciences*, bind 75(1), s. 7-15.
3. Sörge, F.; Weissenbacher, R.; Kinzig-Schnippers, M.; Hofmann, A.; Illauer, M.; Skott, A.; Landersdorfer, C. (2002): Acrylamide: Increased Concentrations in Homemade Food and First Evidence of Its Variable Absorption from Food, Variable Metabolism and Placental and Breast Milk Transfer in Humans. *Chemotherapy*, bind 48(6), s. 267-274.
4. Yaylayan, V. A.; Wnorowski, A.; Locas, C. P. (2003): Why Asparagine Needs Carbohydrate to Generate Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, bind 51(6), s. 1753-1757.
5. Amrein, T. M.; Bachmann, S.; Noti, A.; Biedermann, M.; Barbosa, M. F.; Biedermann-Brem, S.; Grob, K.; Keiser, A.; Realini, P.; Escher, F.; Amado, R. (2003): Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free Asparagine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, bind 51(18), s. 556-5560.
6. Granby, K. (2004): Personlig kommunikation. Danmarks Fødevareforskning, Mørkhøj Bygade 19, 2860 Søborg. Korrespondance på kgr@dfvf.dk.
7. Rosén, J.; Hellenäs, K.-E. (2002): Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, bind 127, s. 880-882.
8. Elmore, J. S.; Koutsidis, G.; Dodson, A. T.; Mottram, D.S.; Wedzicha, B.L. (2005): Measurement of Acrylamide and Its precursors in Potato, Wheat, and Rye Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, bind 53(4), s. 1286-1293.
9. Frederiksson, H.; Tallving, J.; Rosén, J.; Åman, P. (2004): Fermentation Reduces Free Asparagine in Dough and Acrylamide Content in Bread. *Cereal Chemistry*, bind 81(5), s. 650-653.
10. Svensson, K.; Abrahamsson, L.; Becker, W.; Glynn, A.; Hellenäs, K.-E.; Lind, Y.; Rosen, J. (2003): Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, bind 41(11), s. 1581-1586.

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Nyt Laboratorium?
- Så er det også os!

Thermo
FISHER CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

