

# HR MAS NMR-spektroskopi: En hel ny verden for fødevareforskningen

Mulighederne er mange ved anvendelse af *high resolution magic angle spinning* på intakte fødevarer

Af Nanna Viereck<sup>1</sup>, Helene F. Seefeldt<sup>2</sup>, Merete H. M. Nielsen<sup>1</sup> og Søren B. Engelsen<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Kvalitet & Teknologi, Institut for Fødevarevidenskab, Levnedsmiddelcentret (LMC), KVL. <sup>2</sup>Afd. Genetik og Bioteknologi, Danmarks Jordbrugsforskning, Flakkebjerg

Der er en stigende interesse hos forbrugeren og i fødevareindustrien for at sikre, at vores fødevarer er sunde, af høj kvalitet og ikke mindst sikre. Dette kræver hurtige, pålidelige analysemetoder, gerne med mulighed for at automatisere analysen direkte *at-* eller *online*. Spektroskopi er særdeles velegnet til sådanne formål, og forskellige former for spektroskopi bruges allerede i fødevareindustrien, f.eks. fluorescens, infrarød og nærinfrarød samt lavfelts kernemagnetisk resonans (LF

ningen og den kvantitative information i sådanne komplekse systemer er det dog ofte nødvendigt at kombinere NMR-spektroskopiske resultater med avancerede multivejs kemometriske metoder. Kombinationen NMR og kemometri har et stort uudnyttet potentiale og åbner for helt nye muligheder inden for spektroskopisk kvalitetskontrol.

## NMR og HR MAS på fødevarer

Strategien er derfor at studere en række udvalgte problemstillinger inden for fødevareforskningen vha. HR NMR-spektroskopi og samtidig udvikle dataanalyseprogrammer specifikt til kvantitativ NMR-signalbehandling.

Hidtil har brugen af NMR-spektroskopi til kvantitative formål været begrænset. Størst udvikling har der været inden for den farmaceutiske forskning, hvor begrebet metabonomics blev introduceret for få år siden [1,2].

Metabonomics dækker over »kvantitative målinger af det

NMR) spektroskopi. Hidtil har der dog ikke været tradition for at anvende højopløst (*high resolution*, HR) NMR-spektroskopi inden for fødevarevidenskab.

Dette på trods af en udbredt anvendelse fra opklaring af kemiske strukturer for små molekyler i opløsning, strukturoptælling af mediumstørrelse proteiner til medicinsk anvendelse ved magnetisk resonans skanning (MR-scanning).

Netop det faktum, at NMR-spektroskopi er ikke-destruktiv og alligevel giver kvantitativ information om hele prøvens sammensætning, struktur samt vandmobilitet og fordeling i endog meget komplekse matricer, gør metoden særdeles anvendelig til kvalitetskontrol i fødevareindustrien.

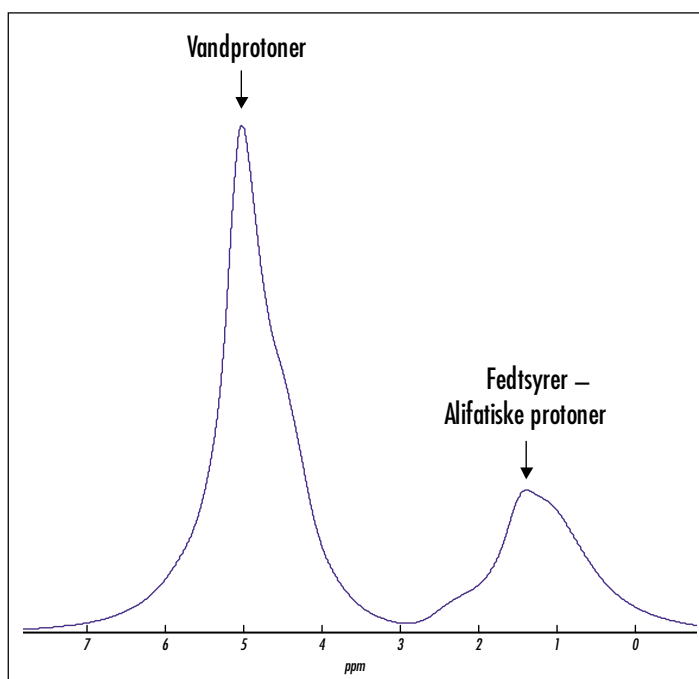
For at øge fortolk-

**4916 3388**  
**CLAUS DAMM**  
Udstyr til:  
\* steril produktion  
\* bioteknologi  
\* forskning  
[www.clausdamm.dk](http://www.clausdamm.dk)

**DE GULE SIDER**  
findes det findes det her

Kontaktinformationer på 125.000 danske virksomheder  
Find din næste leverandør af varer og tjenester på

TDC Forlag [fagbogdanmark.dk](http://fagbogdanmark.dk)



Figur 1. Væske <sup>1</sup>H NMR-spektrum af fast gul Klovborg ost, 25% fedt.

multiparametriske metaboliske respons fra levende organismer til patofysiologiske stimuli eller genetisk modifikation. Responsen studeres vha. sammenkoblingen af NMR på biologiske væsker og multivariat dataanalyse«. I praksis betyder dette, at NMR-spektre af f.eks. blod og urin kan anvendes til at forudsige patienters diagnose på et meget tidligt stadie ud fra små variationer i spektrene, der kan findes med multivariat dataanalyse.

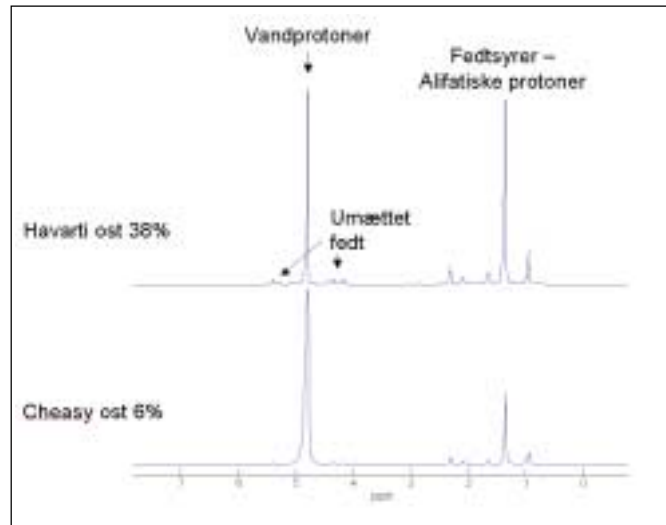
Tilsvarende udfordringer møder vi i analyser af intakte levnedsmidler. Med inspiration fra metabonomics har vi derfor introduceret begrebet bromatonomics. Bromatonomics dækker over »kvantitative målinger af levnedsmidlers funktionelle kvalitetsparametre, studeret vha. NMR på intakte levnedsmidler evalueret med multivariat dataanalyse«. Der er dog stor forskel på kropsvæsker og levnedsmidler, idet levnedsmidler ofte findes på fast form. Det giver problemer ved brug af NMR, der ud over at give kemisk information også er mobilitetsfølsom, dvs. prøvens viskositet betyder meget for spektrenes kvalitet. Mange levnedsmidler er hverken helt faste stoffer eller væsker i

NMR-spektroskopisk forstand. De vil ved almindelig væske-NMR-spektroskopi give dårligt opløste spektre med meget brede linjer (som osten i figur 1). Derimod giver sådanne prøver højt opløste NMR-spektre, når der anvendes »rotation ved den magiske vinkel,  $54.7^\circ$ «, *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR MAS) NMR (figur 2). Her roteres prøven i en vinkel på  $54.7^\circ$  til det statiske magnetfelt. Ved denne teknik elimineres linjeforbredning fra magnetisk følsomhed (susceptibilitet) og bidrag fra dipolære vekselvirkninger. Det skyldes, at de matematiske udtryk for kemisk skift anisotropi og dipol-dipol-vekselvirkninger begge indeholder et vinkelafhængigt led (ligning 1).

$$3\cos^2\theta - 1 = 0 \quad (1)$$

Vælges vinklen til  $54.7^\circ$ , er  $3\cos^2\theta - 1 = 0$  og man opnår alene et signal ved det isotropiske kemiske skift uden dipolær opsplnitning. Roterer prøven derudover, får den hurtige bevægelse prøven til at opføre sig næsten som en væske, hvor der midles over hele prøven.

Mange fødevarer indeholder vand, og vandprotonerne giver også signaler i  $^1\text{H}$ -spektrene. I mange tilfælde er det ønskeligt at slippe af med det kraftige signal fra vand, f.eks. for at kunne identificere andre signaler i



Figur 2. HR MAS  $^1\text{H}$  NMR-spektre af to faste gule oste, 6% og 38% fedt.

## VAKUUM-TEKNIK

### Komplet program i vakuum og læksøgning fra LEYBOLD




- Grovvakuumpumper, 1013-0,1 mbar
- Finvakuumpumper, 1013-0,002 mbar
- Høj- og ultrahøjvakuumpumper
- Vakuum måleudstyr, analogt og digitalt
- Div. Vakuumkomponenter, ventiler, fittings etc.
- Læksøgningsudstyr indenfor forskning og industri
- Stor serviceorganisation

Granzow dimensionerer, konstruerer, monterer og servicerer alle former for vakuumpumper og anlæg.

## GRANZOW AS

Ejby Industrivej 26 2600 Glostrup  
Dalgårdsvej 14 8220 Brabrand

Tlf: 4320 2600 Fax: 4320 2699  
Tlf: 8624 2600 Fax: 8624 2699

info@granzow.dk  
www.granzow.dk



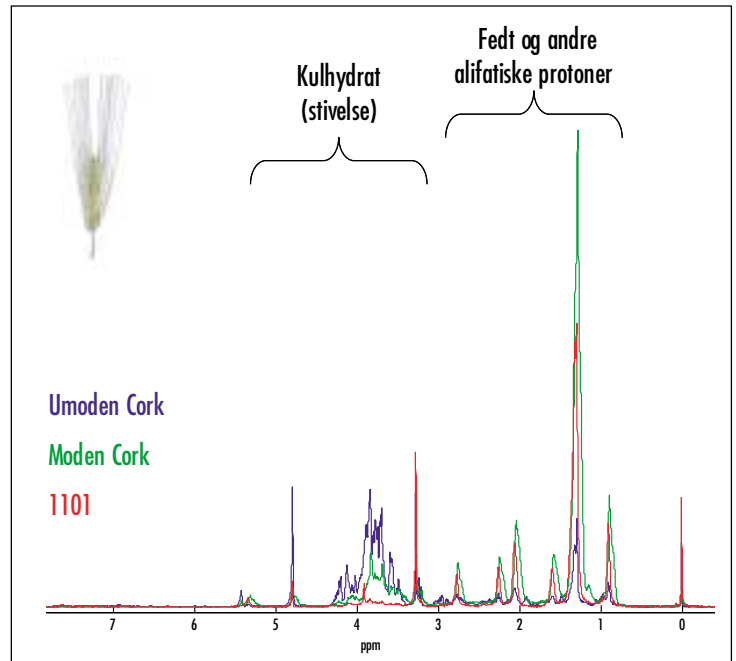
centrationen samt protein-/fedtkoncentrationen. Disse små variationer kunne anvendes til at opdele yoghurtprøverne i stabile og ustabile prøver, men dette kunne ikke forklare mekanismen bag stabiliseringen af yoghurt med pektin alene. For at løse problemet var det nødvendigt at inddrage andre spektroskopiformer samt målinger af zetapotentiale [6].

### Muligheder med HR MAS NMR på hele kerner

Et af de vigtigste mål for dansk landbrug er at producere sunde og ernæringsrigtige afgrøder. For at kunne det er det vigtigt at have en detaljeret viden om sammensætningen og ernæringsværdien af det modne korn og karakteren af protein og stivelse. Udviklingen af enkeltkerne HR MAS NMR-spektroskopi er oplagt. Med enkeltkerne HR MAS NMR-spektroskopi er det muligt at undersøge sammensætningen af forskellige sorter og forskellige kernefyldningstrin uden at forstyrre det biologiske system nævneværdigt – dvs. systemet undersøges næsten som *in vivo*. I figur 5 ses vandundertrykte HR MAS NMR-spektre af tre forskellige bygkerner. Sorten Cork er en helt almindelig bygsort, og i figuren ses to forskellige kernefyldningstrin, af hhv. en umoden grøn blød kerne og en moden, hård kerne. Det ses, at mængden af stivelse aftager, mens indholdet af fedt og andre alifater stiger under kernens modning. Det tredje spektrum er af en moden hård høj  $\beta$ -glycan mutant bygkerne kaldet lys5f [7]. Denne type kerne har en hel anden NMR-profil, hvor indholdet af protein og fedt ikke er så forskelligt fra Cork-kerner, mens stivelsesindholdet er meget mindre, og hvor et signal ved 3.3 ppm bliver meget dominerende. Dette signal har betydning for forståelsen af forskellene på de to bygsorter, f.eks. af deres indhold af  $\beta$ -glycan, og er således højt prioriteret.

### Når korn bliver til brød

Ikke kun metabolismen i afgrøderne inden høst er interessant set ud fra et fødevarerindustrielt- og forbrugersynspunkt. Også forarbejdningen af afgrøden til den endelige fødevarer kan være gavnlig for den ernæringsmæssige værdi eller for produktets holdbarhed. Det sidste HR MAS-eksempel er derfor fra et ➤



Figur 5. Hel kerne HR MAS  $^1\text{H}$  NMR-spektre af forskellige bygsorter.



# BESØG OS PÅ STAND NR. J7370



LANCER Labexia 910 LX  
laboratorieopvaskemaskine



Met One 3400  
50 liter/min.  
partikelæller



Petriswiss PS20 Mini  
Petriskålfydemaskine



Oplev vores nyheder..



..mens du nyder en  
soft ice - igen i år!



Bakkegårdsvej 202  
DK-3050 Humlebæk  
www.clausdamm.dk  
mail@clausdamm.dk  
**Tel. 4916 3388**  
Fax. 4916 3330

Få en CappAero™ Comfort pipette

**CAPP**  
GRATIS på prøve!

... og deltag i lodtrækningen om 10 boxe filterspidser fra greiner bio-one.



Indsend eller fax kuponen til In Vitro, så sender vi en brochure og bestillingsseddel. Vælg den pipette du ønsker at have på prøve i 14 dage og deltag samtidig i lodtrækningen om 10 boxe filterspidser fra greiner bio-one efter eget valg.

Tilbudet gælder til 1. dec. 2005.

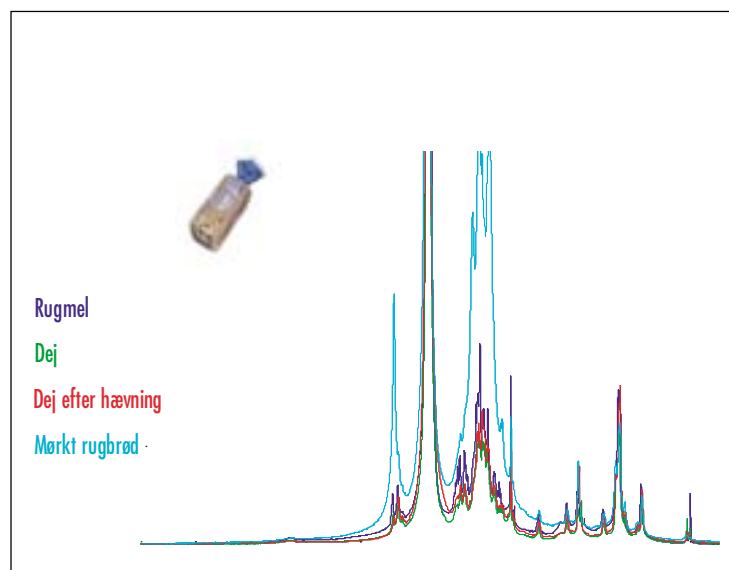
Navn: \_\_\_\_\_  
Firma/Inst.: \_\_\_\_\_  
Afdeling: \_\_\_\_\_  
Evt. bygning: \_\_\_\_\_  
Adresse: \_\_\_\_\_  
Postnr./By: \_\_\_\_\_  
Telefon: \_\_\_\_\_  
Evt. e-mail: \_\_\_\_\_

Capp A/S er en 100% dansk producent af pipetter, hvor funktionalitet, ergonomi og kvalitet er sat i højsædet. Capp produkter markedsføres af mere end 100 forhandlere i 80 lande Verden over.

Capp pipetterne får du kun fra In Vitro, der nu er eneforhandler i Danmark

**In Vitro as**

Krotbjerg 336, 3480 Fredensborg  
Telefon 4847 5070 • Fax 4847 5775  
info@in-vitro.dk • www.in-vitro.dk



Figur 6. HR MAS <sup>1</sup>H NMR på mørkt rugbrød.

HR MAS NMR-forsøg på rugmel under forarbejdning til rugbrød. I dej- og bageprocessen nedbrydes bl.a. fytinsyre, der binder vitaminer og mineraler komplekst. Ved en effektiv nedbrydning af fytinsyren vha. enzymer frigives de bundne vitaminer og mineraler, så de gøres tilgængelige for mennesker [8]. I figur 6 ses HR MAS NMR-spektre kørt ved samme rotationsfrekvens (5000 Hz) af rugmel, dej før og efter hævning samt af det færdige rugbrød. I alle tilfældene er prøverne helt tørre, inden de umiddelbart før en måling er blevet opløst i tungt vand. Rugmel og dej har sammenlignelige NMR-spektre, hvor kun enkelte signaler i kulhydratområdet adskiller sig for alvor. Derimod har det færdige rugbrød en helt anden NMR-profil, med meget forbrede signaler i kulhydratområdet. Det skyldes sandsynligvis rotationsfrekvensen, idet signalformen som nævnt ovenfor påvirkes og forbrede ved en for lille spiningshastighed. Det kunne således se ud til, at en rotationshastighed på 5000 Hz er for lav til kvantitativt at sammenligne tørrede mel-, dej- og brødprøver. Desuden kan det ikke undgås, at prøverne opsuger det tilsatte vand under målingerne. Systemet, der undersøges, er derfor en samlet matrice, hvor vandet er fordelt i hele prøven. Et sådant dynamisk system betyder også noget for kvaliteten af spektrene. Som vist er det godt at være på forkant med de mange faldgruber, der kan være i udøvelsen af HR MAS NMR-spektroskopi på komplekse fødevarer.

### Perspektiver

NMR er vel den mest alsidige og informationsrige analytiske teknik, og anvendelsesmulighederne inden for fødevarerområdet er langt fra udforskede. Vi har her nævnt nogle få lovende ap-

**SKANLAB**

**Retsch**  
Reproducerbar formaling og kornstørrelsesanalyse

Planetkugle-mølle PM 100  
Til formaling og homogenisering

Til mekanisk legering.

Tlf. 47 38 10 14 www.skanlab.com

plikationer, men potentialet i HR MAS NMR er meget større, f.eks. inden for studier af hvordan fødevarer smager og føles. Meget tyder på, at vi har flavorneuroner, der reagerer specifikt på tekstur, og en af de store udfordringer for HR MAS NMR i levnedsmiddelsammenhæng (bromatonomics) er derfor at klarlægge de intermolekylære interaktioner i fødevarematricen, der f.eks. skaber *mouth feel* funktionalitet.

Tak til Mejeribrugets Forskningsfond, der økonomisk støtter denne satsning, samt til Arla Foods, CP Kelco, Forskningscenter Flakkebjerg og Schulstad for prøverne anvendt til spektrene i de viste figurer.

E-mail-adresse  
Nanna Viereck: nav@kvl.dk

Referencer:

1. Gartland, K.P.R., Beddell, C.R., Lindon, J.C. and Nicholson, J.K. (1991) Application of pattern-recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of urine. *Molecular Pharmacology* **39**(5), 629-642.
2. Nicholson, J.K., Lindon, J.C. and Holmes, E. (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR data. *Xenobiotica* **29**(11), 1181-1189.
3. Gil, A.M., Duarte, I., Cabrita, E., Goodfellow, B.J., Spraul, M. and Kerssebaum, R. (2004) Exploratory applications of diffusion ordered spectroscopy to liquid foods: an aid towards spectral assignment. *Analytica Chimica Acta* **506**, 215-223.
4. Garrod, S., Humphreys, E., Connor, S.C., Connelly, J.C., Spraul, M., Nicholson, J.K. and Holmes, E. (2001) High-resolution  $^1\text{H}$  NMR and Magic Angle Spinning NMR Spectroscopic Investigation of the Biochemical Effects of 2-bromoethanamine in Intact Renal and Hepatic Tissue. *Magnetic Resonance in Medicine* **45**, 781-790.
5. Griffin, J.L., Pole, J.C.M., Nicholson, J.K. and Carmichael, P.L. (2003) Cellular environment of metabolites and a metabonomic study of tamoxifen in endometrial cells using gradient high resolution magic angle spinning  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1619**, 151-158.
6. Salomonsen, T. and Sejersen, M.T. (2005) Master thesis: Investigations of the mechanisms behind stability of yoghurt with pectin. An explorative study with emphasis on spectroscopy.
7. Munck, L., Møller, B., Jacobsen, S. and Søndergaard, I. (2004) Near infrared spectra indicate specific mutant endosperm genes and reveal a new mechanism for substituting starch with (1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  4)-beta-glucan in barley. *Journal of Cereal Science* **40**, 213-222.
8. Reddy, N.R. (2002) Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In Food phytates. Eds. Reddy, N.R & Sathe, S.K., CRC Press, Inc., Florida, USA

Nyt om...

...interplanetarisk støv

Hver dag kommer der 8 ton støv til jorden fra rummet. Christine Floss, der er geokemiker ved Washington University i St-Louis, har sammen med medarbejdere undersøgt sammensætningen af støv fra jordens stratosfære.

Støvet indeholder carbon C. Dels  $^{12}\text{C}$ , og dels det tungere  $^{13}\text{C}$ . Floss har opdaget, at støvet i stratosfæren indeholder forholdsvis mindre af det tungere nuclid. De fandt for stratosfærestøv  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C} = 96$  og for almindeligt jordisk støv  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C} = 87$ .

Har denne opdagelse forbindelse med de organiske stoffer, der var basis for livets opståen på jorden – spørger Floss.

Bos

Carbon anomaly from deep space. *Chemical & Engineering News*. 1. marts 2004: 27



Specialister i

- Automatiseret Fastfaseoprensning Gilson ASPEC XL, ASPEC XLi, ASPEC XL4.
- Automatisering af væskehåndtering.
- HPLC, LC, SFC kromatografi.
- ERWEKA Dissolution systemer.
- Avancerede systemer til tabletkontrol.
- Salg og kalibrering af Gilson pipetter.



Biolab A/S · Sindalsvej 29 · DK-8240 Risskov  
Telefon 8621 2866 · Telefax 8621 2301  
E-mail: sales@biolab.dk

**Bühl & Bonhoefer** [www.buhl-bonhoefer.dk](http://www.buhl-bonhoefer.dk)

- Hurtige højpræcisions-elektroder.
- Op til 5 parametre i ét instrument.
- pH-nøjagtighed op til 0,001.
- Komplette pakkeløsninger til mælk, fødevarer, medicinvarer, almen laboratoriebrug m.m.
- Bærbare og stationære modeller.
- Intuitiv betjening med indbygget brugervejledning.
- Understøtter FDA 21 CFR Part 11.
- Softwareopdatering via Internettet.
- IP67 vandtæt (bærbare modeller).

Med os på FoodTech

**Nye komplette måleløsninger til pH, ORP, ISE, DO og ledningsevne**

Thermo Orions nye Star Series er gennemtænkt kvalitet med standard- og skræddersyede pakkeløsninger til en lang række forskellige applikationer.

Hver pakke består af meter, elektrode(r), kalibreringsvæsker samt applikationsbeskrivelser. **Ring og hør nærmere.**

Virumgårdsvej 12 · 2830 Wrum · Tlf.: 45 95 04 10 · info@buhl-bonhoefer.dk