

Model reaction system에서 가열조건이 acrylamide 및 기타 화합물들의 생성에 미치는 영향 이영근*

부산대학교 생명응용과학부

Received February 24, 2006 / Accepted March 28, 2006

Influence of Heating Conditions on the Formation of Acrylamide and Other Products in Asparagine-Glucose Model Reaction System. Young-Guen Lee*. *School of Applied Life Science, Pusan National University, Miryang 627-702, Korea* –The Formation of acrylamide was studied in Maillard model reaction systems based on asparagine-glucose. The mixture of asparagine and glucose in equal molar ratio, and then heated at 125, 150, 175 and 200°C for 10, 20 and 30 minute, respectively. The reaction products were extracted with ethyl acetate and methanol, and then isolated and detected on FFAP capillary column and HP-5MS 5% phenyl methyl siloxane column by using GC/MS. Acrylamide was detected only from methanol extracts and on FFAP capillary column, at retention time 23.53 min., and the detection limit was 4.6 ng. Acrylamide content mainly increased with increasing temperature and processing time till 175°C, therefore, maximal acrylamide formation occurred at 175°C for 10 minute (116 µg/g), while, above 175°C, higher temperatures or prolonged processing times caused a decrease of acrylamide levels, finally disappeared at 200°C for 30 minute. Three major compounds were identified as 1,3-dihydroxypropanone, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one and 5-hydroxymethylfurfural, and three minor compounds also as 5-methylfurfural, 2-acetylpyrrole and *N,N*-dimethylcyclohexamine, from ethyl acetate or methanol extracts on FFAP or HP-5MS capillary column.

Key words – Acrylamide, asparagine, glucose, model reaction, heating condition, GC/MS

서 론

아크릴아마이드는 산업체 및 건축자재 등 여러 가지 용도로 사용되어 왔으나, 근래 이의 유해성에 관하여 많은 보고가 있어 논란이 되고 있었다[4,9,10]. 이러한 아크릴아마이드가 식품에서도 검출되며 그 생성원인으로 식품의 조리 및 가공과정에서 가열과 연관이 있다는 사실이 2002년도에 Tareke 등[13]에 의해 보고된 이래, 많은 연구자들에 의해 감자튀김, 프렌치 후라이, 빵 및 커피 등에서도 검출되며 [1,3,6,8,13,14], 식품중의 아미노산과 포도당 등 환원당과의 마이알반응으로 생성된다는 보고[2,15,16,17]가 있었다.

또한, 식품의 가열제조과정에서 아스파라긴을 첨가할 경우 아크릴아마이드가 급증하고[12], 아스파라긴의 함량을 감소시키면 아크릴아마이드의 생성도 감소하는 것으로[17] 알려져 있으며, 글루타민 등 타 아미노산을 환원당과 반응시킨 연구에서는 아크릴아마이드의 생성이 미미한 것으로 밝혀져[15], 아스파라긴이 가장 유력한 전구물질로 주목 받고 있다.

그리고 식품조리시 아크릴아마이드 생성요인이 되는 가열에 관하여, 아크릴아마이드의 최대 생성온도는 175°C이며 그보다 고온에서는 오히려 감소한다는 보고[7]와, 감자의 튀김

과정에서 최대 생성온도는 160~180°C이었다는 보고[14]가 있는 반면, 제빵과정에서는 200°C 이상으로 높일수록 증가한다는 상반된 보고[12]가 있어, 식품의 재료 및 조리조건 등에 따라 아크릴아마이드의 생성에 미치는 가열의 영향이 다양하게 나타난다.

한편, 이의 생성 메카니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있으나, Friedman[4]에 의하면, 환원당과 아스파라긴의 가열 반응에서, 생성된 Schiff염기가 아마도리반응을 거쳐 갈변생성물로 전환되는 경로와, 달리 생성된 *N*-(D-glucose-1-yl)-2-asparagine이 여러 단계를 거쳐 아크릴아마이드가 생성되는, 두 가지 경로를 제시하였으나, Zyzak 등[17]은 Schiff염기에서 3-aminopropionamide(3-APA)을 거쳐 아크릴아마이드가 생성되는 한 개의 경로가 있으며, 이 3-APA가 중간체라고 제시하였다.

그리고, Yaylayan 등[16]은 Schiff염기에서 여러 단계를 거쳐 생성된 탈카아복실아마도리생성물이 아크릴아마이드로 전환되며, 이 과정에서 succinimide와 niacinamide 등의 파생적 부산물들이 생성된다고 하였다.

이와 같이, 환원당과 아미노산의 반응에서 아크릴아마이드가 생성되는 과정에 관하여 여러 연구자들의 연구결과가 일치하지 않고 있으며, 이는 실험과정에서 사용한 재료, 반응 조건 및 분석방법 등의 차이에서 비롯된 것으로 본다.

본 연구에서는 환원당과 아미노산의 반응에서 가열조건별 아크릴아마이드의 생성량과 기타 생성물들의 종류 및 함량

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5354, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : lyg5354@pusan.ac.kr

변화를 분석하여, 가열이 아크릴아마이드의 생성에 미치는 영향을 조사하고 함께 생성된 기타 화합물들로서 아크릴아마이드의 생성메카니즘을 추정하고자, 포도당과 아스파라긴의 모델반응을 이용하여 가열온도 및 시간을 달리하여 반응시키고 여기에서 생성된 반응물을 2종의 용매로 추출 후 2종의 capillary column을 사용하여 GC/MS로 분석하였다.

재료 및 방법

모델반응

모델반응 생성물을 얻기 위하여, asparagine monohydrate (Merk Co., Germany) 3.02 g과 glucose (Sigma Co., St. Louis, USA) 3.06 g을 200 ml 유리병에 취하여 혼합한 각 시료들에 1.0 ml 증류수를 가한 후, 125, 150, 175 및 200°C의 온도에서, 각각 10, 20 및 30분간 오븐에서 가열하였다. 막자사발을 이용하여 반응물을 분쇄하고 각 분쇄 시료들에서 700 mg 씩 각 2개의 시료를 취하여 1개의 시료에는 50 ml methanol, 또 다른 1개 시료에는 50 ml의 ethyl acetate를 가하고, 500 ppm의 4-decanol (Aldrich Co., USA, 97%) 1 ml을 내부표준물질로 각각 첨가한 후, 30분간 초음파 처리를 하고 4시간 동안 진탕추출을 하였다.

추출한 시료용액은 30 g의 무수황산나트륨으로 24시간 동안 탈수시키고 뷰크너 핀넬을 이용하여 여과한 후, 회전감압농축기로써 5 ml로 농축하고 0.22 µm membrane filter로 여과한 것을 GC/MS 분석용 시험액으로 하였다.

아크릴아마이드 분석

모델반응에서 생성되는 아크릴아마이드 분석을 위하여, 반응생성물을 methanol로 추출한 시험액을 GC/MS (HP 6890 series GC system+HP 5973 MSD, Hewlett Packard Co. USA)에서 FFAP-capillary column (free fatty acid phase; 30 m × 0.32 mm i.d. fused silica capillary, 0.25 µm; J & W Scientific, Agilent, Waldbronn, Germany), carrier gas는 He (20 ml/min.), 오븐 온도조건은 initial temp.(time) 70°C(5 min.), rate는 5°C/min., final temp.(time) 220°C(5 min.), 주입구 온도 250°C, interface 온도 240°C, 70 eV의 ionization voltage의 조건으로 분석하였다.

아크릴아마이드 분석은 아크릴아마이드(Sigma Chemical Co., St. Louis) 10 ppm methanol용액을 표준용액으로 하여 비교하였으며, 내부표준물질로 첨가한 4-decanol의 피크면적을 이용하여 내부표준법으로 정량하였다.

기타 화합물의 분석

모델반응에서 아크릴아마이드와 함께 생성되는 화합물들을 분석하기 위하여, ethyl acetate 및 methanol로 추출하

여 처리한 두 시험액을 GC/MS (HP 6890 series GC system+HP 5973 MSD, Hewlett Packard Co. USA)에서, HP-5MS 5% phenyl methyl siloxane column (30m×250 µm film thickness 0.25 µm)을 사용하였고, carrier gas는 He (20 ml/min.), 오븐 온도조건은 initial temp.(time) 60°C(5 min.), rate는 5°C/min., final temp.(time) 240°C(5 min.), 주입구 온도 250°C, interface 온도 240°C, 70 eV의 ionization voltage의 조건으로 분석하였다.

각 화합물들의 동정은 mass spectrum을 해석한 결과를 토대로 Willey library 및 문헌을 참고하였으며, 각 화합물의 정량은 각 피크의 면적을 내부표준물질인 4-decanol의 피크 면적과 비교하여 이때의 response factor는 1로 가정하여 산출하였다. 또한, 아크릴아마이드 분석에서 같이 검출된 기타 화합물들의 동정과 정량도 동일하게 행하였다.

결과 및 고찰

아크릴아마이드의 생성

온도 및 시간을 달리하여 아스파라긴과 포도당의 모델반응에서 생성된 아크릴아마이드를 GC/MS로 분석한 TIC(Total Ion Chromatogram; Fig. 1)에서 아크릴아마이드는 retention time 23.53분에서 검출되었으며, 표준용액으로 구한 최저검출한계(Minimum detection limit=2×noise peak area)는 4.6 ng 이었다. 또한, 5-methylfurfural, 2-acetylpyrrole, 1,3-dihydroxypropanone 등도 함께 검출되었다.

각 반응조건에서 시료량에 대한 아크릴아마이드의 생성량을 산출한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 아크릴아마이드의 생성은 125°C에서부터 온도를 높일수록 증가하여 150°C에서는 가열시간을 늘릴수록 뚜렷하게 증가하며, 175°C에서 10분간 가열한 시료에서 최대량인 116 µg/g이 검출되어, 환원당과 아미노산의 모델반응에서 아크릴아마이드의 최대 생성온도는 175°C이며 그 보다 고온에서는 감소하였다는 Mottram 등 [7]과, 감자의 튀김과정에서 최대 생성온도는 160~180°C 이었다는 Taubert 등[14]의 결과와 대체로 일치하였다.

그리고, 보다 고온인 200°C에서는 175°C에 비하여 그 생성량이 크게 줄어 들었으며 특히 시간을 30분으로 늘릴 경우 거의 소멸되는 것으로 나타나서, 감자칩을 200°C에서 가열시간을 늘릴수록 아크릴아마이드의 함량이 감소하였다는 보고 [8]와 일치하였으며, 이러한 결과는 175°C 이상에서 녹아 분해되거나 중합반응을 일으키는 아크릴아마이드의 물리적 특성[14]과 일치한 것으로 보였다.

그러나, Surdyk 등[12]은 제빵과정에서 200°C 이상으로 높일수록 증가한다고 보고한 반면, 200°C에서 시간이 경과할수록 식품중의 단백질과의 공유결합 또는 경합에 의하여 아크릴아마이드의 생성이 저해된다는 보고[8]도 있어, 일반식품

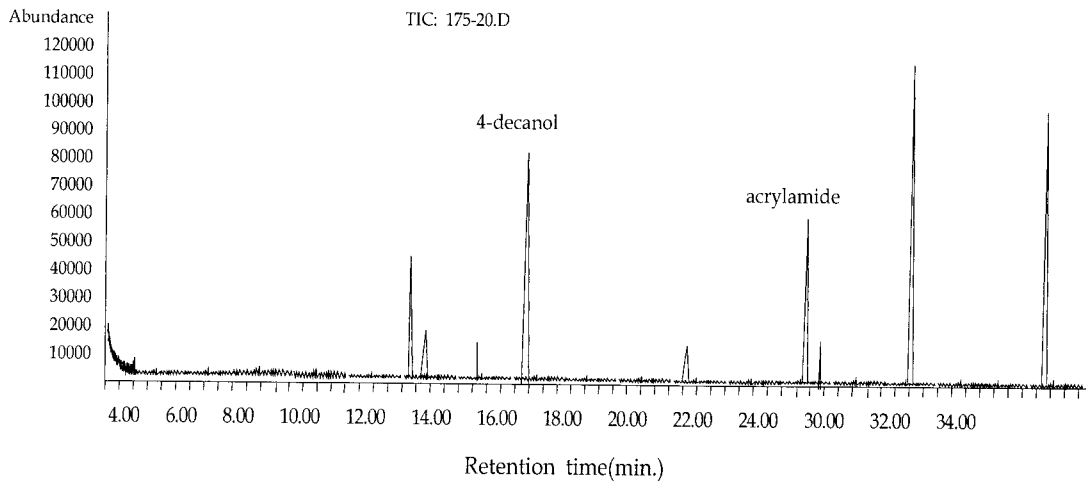


Fig. 1. Total ion chromatogram of a methanol extract sample (175°C for 20 min.) from model reaction systems for analysis of acrylamide by using FFAP capillary column on GC/MS.

의 경우 아크릴아미드의 생성조건이 식품의 화학적 조성 과 물리적 형태 등의 요인에 의하여 다르게 나타나는 것으로 추정된다.

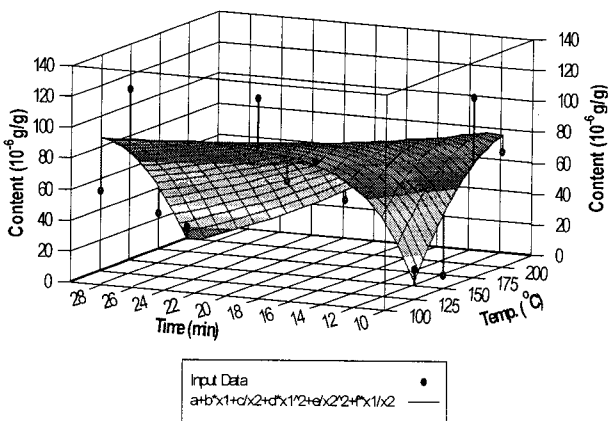


Fig. 2. Yield of acrylamide on various heating condition in the asparagine-glucose model reaction system.

기타 화합물들의 생성

모델반응물을 ethyl acetate 또는 methanol로써 용매를 달리 추출하고, FFAP 또는 HP-5MS의 2종 capillary column으로 분리하여 GC/MS로 분석한 결과, 각 TIC에서는 15~23종의 화합물들이 검출되었다. 분리된 각 화합물들의 mass spectrum 해석 및 Willey library 조사 결과에서 구조가 확인된 것은 6종의 화합물들이며, 이 화합물들의 화학명, 주요 mass ion peak, 검출된 시험액의 추출용매 및 column의 종류를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에 나타난 바와 같이, 확인된 화합물들은 당의 카라멜반응 산물인 5-methylfurfural 및 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), 그리고 질소화합물인, 2-acetylpyrrole과 N,N-dimethylcyclohexamine, 기타 기원을 추정하기 어려운 1,3-dihydroxypropanone과 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, 2종이었다.

그러나, 아스파라긴과 당의 반응에서, 아크릴아미드 생성과정에서 부산물로 생성된다고 제시한 succinimide 및

Table 1. Mass Spectrometric data of compounds identified in ethyl acetate or methanol extracts from the model systems by using FFAP or HP-5MS GC/MS column

compound	m/z(relative intensity)	solvent used	column used
5-methylfurfural	110(100), 109(78), 81(10), 53(32), 50(11), 43(9), 39(7), 29(8)	ethyl acetate	FFAP HP-5MS
2-acetylpyrrole	110(8), 109(81), 94(100), 66(54), 53(8), 43(13), 39(20)	methanol	FFAP
1,3-dihydroxypropanone	90(2), 88(3), 72(18), 60(14), 43(19), 31(100)	methanol	FFAP
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	144(68), 126(2), 115(3), 101(48), 73(28), 55(24), 44(51), 43(100)	methanol	FFAP HP-5MS
5-hydroxymethylfurfural	126(66), 109(8), 97(100), 69(30), 53(16), 41(44), 39(37)	methanol ethyl acetate	FFAP HP-5MS
N,N-dimethylcyclohexamine	127(13), 99(7), 84(100), 71(22), 67(3), 57(20), 42(17)	ethyl acetate	HP-5MS

niacinamide[16]가 확인되지 않았으며, 위의 두 보고에서 제시한 화합물들의 mass spectrum과 본 실험에서 확인되지 않은 화합물들의 mass spectrum을 대조한 결과에서도 일치하는 것이 없어, 실험조건이 반응생성물의 형성여부에 크게 영향을 미치는 것으로 추정되었다.

구조가 밝혀진 6종 화합물들의 모델반응조건별 함량을 분석한 결과를, Fig. 3에, 많은 양으로 검출된 1,3-dihydroxypropanone, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyrane-4-one 및 5-hydroxymethylfurfural을, 그리고 미량으로 검출된 5-methylfurfural, 2-acetylpyrrole과 N,N-dimethylcyclohexamine을 Fig. 4에 나타내었다.

5-methylfurfural의 경우 125 및 150°C의 저온에서는 시간 증가에 따라 함량도 증가하였으나, 175 및 200°C의 고온에서는 상반된 양상을 보여 아크릴아마이드의 함량 변화(Fig. 2)와 매우 유사하였다. 그리고 N,N-dimethylcyclohexamine과 2-acetylpyrrole은 질소를 함유하고 분자량으로 볼 때 아스파라긴과 포도당의 마이알반응에 의한 생성물로 판단되지만 그 함량이 아크릴아마이드의 함량(Fig. 2)보다 훨씬 적어서 아크릴아마이드의 중간체로는 보기 어려웠다.

1,3-dihydroxypropanone의 경우, 저온에서 초기에 다량 생성되고 온도와 시간이 증가될수록 감소되어 아크릴아미드의 함량변화와 상반되는 경향을 뚜렷하게 나타내어, 저온에서 형성되어 대부분 열에 의해 신속하게 분해 또는 다른 화합물로 전환되는 것으로 추정된다.

또한, Stadler 등[11]에 의하면 α-hydroxycarbonyl 및 dihydroxycarbonyl화합물이 아스파라긴에서 아크릴아미드로의 전환에 크게 기여한다고 하여, 본 연구에서 확인된 1,3-dihydroxypropanone이 비록 전구체는 아닐지라도 아크릴아미드의 생성과 관련이 있는 것으로 추정된다.

최근 Zyzak 등의 보고[17]에 의하면, 아스파라긴과 환원당

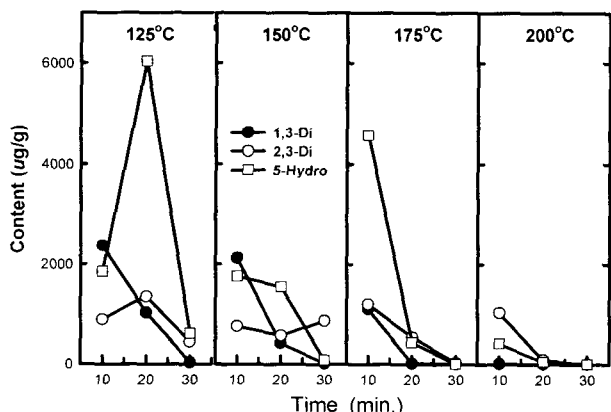


Fig. 3. Effect of heating condition on the content of major compounds identified from model reaction products. Symbol abbreviation represents as, 1,3-Di; 1,3-dihydroxypropanone, 2,3-Di; 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyrane-4-one, 5-Hydro; 5-hydroxymethylfurfural.

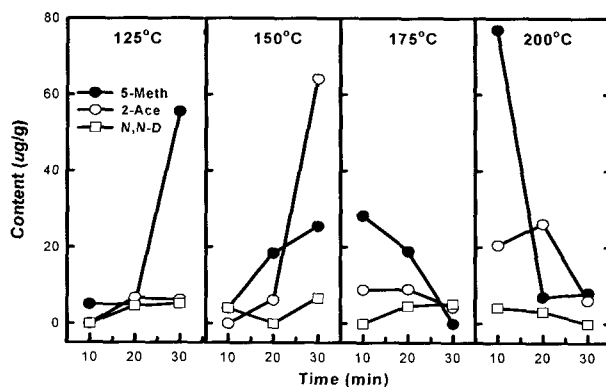


Fig. 4. Effect of heating condition on the content of minor compounds identified from model reaction products. Symbol abbreviation represents as, 5-Meth; 5-methylfurfural, 2-Ace; 2-acetylpyrrole, N,N-D; N,N-dimethylcyclohexamine.

또는 알데히드류의 가열반응에서 Schiff염기가 형성되며, Schiff염기는 가열에 의해 탈카아복실화 하여 decarboxylated Schiff base로 된 후, 가수분해로 3-aminopropionamide(3-APA)를 형성하고 3-APA에서 암모니아의 이탈로 아크릴아미드가 형성되는 경로와 decarboxylated Schiff base에서 이민이 이탈되어 직접 아크릴아미드가 형성되는 메카니즘을 제시하였다.

그러나 Granvogl 등[5]은 3-APA를 거치는 단일경로를 제시하고 가장 유력한 아크릴아미드 전구체라고 보고하면서, 일반식품중의 아스파라긴이 효소에 의하여 탈카아복실 반응으로도 이 3-APA를 생성할 수 있다고 하였다.

또한, Yaylayan 등[16]이 아스파라긴과 여러 가지 카아보닐화합물과의 모델반응결과에서 확인한 화합물들에서 3-APA를 보고하지 않았으며, 본 실험결과에서도 확인 및 미확인 화합물의 mass spectrum과 일치하는 화합물이 없어, 이 화합물에 관한 차후의 검토가 더 많아야 할 것으로 사료된다.

요 약

아크릴아미드의 형성과정에서 가열조건이 아크릴아미드의 생성량과 아크릴아미드 형성에 관여 또는 동반 생성하는 화합물을 조사하기 위하여, 아스파라긴과 포도당의 등량 혼합물을 125, 150, 175 및 200°C에서 각각 10, 20 및 30분간 가열하는 모델반응을 이용하였다.

가열한 반응물을 ethyl acetate 및 methanol 2종의 용매로 달리 추출하고 FFAP capillary column과 HP-5MS 5% phenyl methyl siloxane column으로 GC/MS에서 분석한 결과, 아크릴아미드는 methanol추출물을 FFAP capillary column으로 분석한 결과에서 retention time 23.53분에서 검출되었고 최저검출한계는 4 ng 이었다. 아크릴아미드 생성량은 175°C보다 낮은 125 및 150°C에서는 온도와 가열시간을

증가시킬수록 점차 증가하여, 175℃에서 10분간 처리하였을 때 최대량인 116 µg/g을 생성하였지만 175 및 200℃에서는 온도 및 가열시간을 증가시킬수록 감소하는 결과를 나타내었다.

아크릴아마이드의 반응생성물들로서, 1,3-dihydroxypropanone, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one 및 5-hydroxymethylfurfural이 다량으로 검출되었으며, 또 다른 화합물인 5-methylfurfural, 2-acetylpyrrole 및 N,N-dimethylcyclohexamine 등은 소량 생성되었음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 구 밀양대학교 교내학술연구비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Andrzejewski D., J. A. G. Roach, M. L. Gay and S. M. Musser. 2004. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1996-2002.
- Becalski, A., B. P.-Y. Lau, D. Lewis and S. W. Seaman. 2003. Acrylamide in foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 802-808.
- Becalski, A., B. P.-Y. Lau, D. Lewis, S. W. Seaman, S. Hayward, M. Sahagian, M. Ramesh and Y. Leclerc. 2004. Acrylamide in french fries: Influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3801-3806.
- Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A Review. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4504-4526.
- Granvogl, M., M. Jezussek, P. Koehler and P. Schieberle. 2004. Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes-A minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4751-4757.
- Kim, C. T., E. S. Hwang and H. J. Lee. 2005. Analysis of acrylamide in processed foods obtained from Korean markets. *J. Food Hyg. Safety*, **20**, 191-198.
- Mottram, D. S., B. L. Wedzicha and A. T. Dodson. 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **419**, 448-449.
- Rydberg, P., S. Eriksson, E. Tareke, P. Karlsson, L. Ehrenberg and M. Tornqvist. 2003. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7012-7018.
- Smith, E. A., S. L. Prues and F. W. Oehme. 1995. Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**, 121-135.
- Smith, E. A., S. L. Prues and F. W. Oehme. 1995. Environmental degradation of polyacrylamides. 2. Effects of artificial environmental(outdoor) exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**, 76-91.
- Stadler, R. H., F. Robert, S. Riediker, N. Varga, T. Davidek, S. Devaud, T. Goldmann, J. Hau and I. Blank. 2004. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5550-5558.
- Surdyk, N., J. Rosen, R. Andersson and P. Aman. 2004. Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2047-2051.
- Tareke, E., P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson and M. Tornqvist. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4998-5006.
- Taubert, D., S. Harlfinger, L. Henkes, R. Berkels and E. Schomig. 2004. Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2735-2739.
- Yasuhara, A., Y. Tanaka, M. Hengel and T. Shibamoto. 2003. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3999-4003.
- Yaylayan, V., A. Wnorowski and C. Perez Locas. 2003. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1753-1757.
- Zyzak, D. V., R. A. Sanders, M. Stojanovic, D. H. Tallmadge, B. L. Eberhart, D. K. Ewald, D. C. Gruber, T. R. Morsch, M. A. Strothers, G. P. Rizzi and M. D. Villagran. 2003. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4782-4787.