

Analys av biomarkörer i urin för intag av fullkornsråg och vete

– En diabetespreventionsstudie hos män och kvinnor

Analysis of biomarkers in urine of whole grain rye and
wheat intake

– A diabetes prevention trial in men and women

Annika Kaija



Analys av biomarkörer i urin för intag av fullkornsråg och vete
– En diabetespreventionsstudie hos män och kvinnor

Analysis of biomarkers in urine of whole grain rye and wheat intake
– A diabetes prevention trial in men and women

Annika Kaija

Handledare: Rikard Landberg, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för molekylära vetenskaper

Examinator: Lena Dimberg, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för molekylära vetenskaper

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap - kandidatarbete

Kurskod: EX0669

Program/utbildning: Agronomprogrammet - Livsmedel

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Omslagsbild: Annika Kaija

Serietitel: Molecular Sciences

nr: 2017:19

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Alkylresorcinoler, metaboliter, biomarkörer, fullkorn, urin

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap
Institutionen för molekylära vetenskaper

Sammanfattning

Alkylresorcinoler (AR) är en molekylgrupp som finns i hög koncentration i klidelen av råg och vete men inte i betydande mängd i andra spannmål eller vanliga livsmedel. AR och dess metaboliter har föreslagits och utvärderats som biomarkörer för fullkornsintaget av dessa sädeslag. I denna studie har de redan beprövade AR-metaboliterna 3,5-dihydroxibensoesyra (DHBA) och 3-(3,5-dihydroxifenyl)-1-propansyra (DHPPA) kvantifierats i 24 timmars urin från deltagare i en tysk diabetespreventionsstudie. Syftet var att undersöka deltagarnas följsamhet till interventionsstudien respektive dieter. Dieter var en lågriskdiet (LR) bl.a. rik på fullkorn och en högriskdiet (HR) bl.a. fattig på fullkorn. De nyligen upptäckta metaboliterna 5-(3,5-dihydroxifenyl)-pentansyra (DHPPTA), 2-(3,5-dihydroxibensamid)-ättiksyra (DHBA-Gly) och 3,5-dihydrocyfenylkanelnsyra (DHCA) kvantifierades samtidigt för att undersöka deras potential som fullkornsbiomarkörer för vete och råg.

AR-metaboliterna dekonjugerades med β -glucuronidas och sulfatas över natt och extraherades sedan med lösningsmedel (etylacetat). Extrakten renades med fastfasextraktion kolonner (OASIS-MAX®) och analyserades med gaskromatografi-masspektrometri.

Resultaten visade att merparten av deltagarna i LR-gruppen hade höga mängder AR metaboliter och att deltagarna i HR-gruppen hade låga mängder efter dieter start. Mängderna varierade dock kraftigt inom grupperna. DHBA, DHPPA, DHCA och DHBA-Gly kunde uppmätas i nästan samtliga prover, medan DHPPTA återfanns i 81 % av proverna. För DHBA, DHPPA och DHCA var precisionen i analysen godtagbar medan precisionen för DHPPTA och DHBA-Gly var sämre. DHPPA och DHCA visade stark korrelation till övriga metaboliter, medan DHBA och DHBA-Gly uppvisade medelstarka korrelationer. DHPPTA var svagt korrelerade till övriga metaboliter. Metaboliterna visade liknande beteendemönster över tid. Båda gruppernas deltagare hade medelhöga metabolitnivåer vid baslinjen för att sedan stiga i LR-gruppen och sjunka i HR-gruppen. Efter dieter start skiljde sig grupperna signifikant ($p=0,001$) för alla metaboliter. Inga signifikanta skillnader kunde ses mellan kvinnor och män.

Slutsatserna var att flertalet deltagare i DDIET-studien tycktes följa sina dieter avseende fullkornsintaget, då profilen av AR metaboliter i urinen följde mönstret för respektive diet. Bland de nya metaboliterna var DHCA en god biomarkörkandidat tack vare sin höga detekterbarhet och medelhöga korrelation med biomarkörerna DHBA och DHPPA. DHBA-Gly och DHPPTA var inte lika starka som kandidater då de hade lägre korrelation. Metodoptimering krävs för bättre utvärdering av DHCA, DHPPTA och DHBA-Gly som biomarkörer för fullkornsintag av råg och vete.

Nyckelord: Alkylresorcinoler, metaboliter, biomarkörer, fullkorn, urin

Abstract

Alkylresorcinols (AR) is a molecular group found in high concentration in the bran part of wheat and rye grains, but not in other grains or common foods. AR and its metabolites has therefore been proposed and evaluated as biomarkers for whole grain intake of these grains. In this study, the already proven AR-metabolites 3,5- dihydroxybenzoic acid (DHBA) and 3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid (DHPPA) have been quantified in 24-hour urine of participants in a German diabetes prevention trial. The aim was to explore the participants' adherence to the diets they were assigned in the intervention trial. One diet was a low-risk diet (LR) rich in whole grains and the other was a high-risk diet (HR) poor in whole grains. The newly discovered metabolites 3,5- dihydroxyphenylcinnamic acid (DHCA), 5-(3,5-dihydroxyphenyl)pentanoic acid (DHPPTA) and 2-(3,5-dihydroxybenzamido)acetic acid (DHBA-Gly) were also quantified simultaneously to investigate their potential as whole grain biomarkers for wheat and rye.

AR-metabolites were deconjugated by β -glucuronidase and sulfatase overnight and then extracted with ethyl acetate. The extracts were purified by solid phase extraction (OASIS MAX®) and analysed by gas chromatography-mass spectrometry.

The results suggested that most participants adhered to their diets with regards to the grain intake based on high amounts of AR metabolites in the LR group and low amounts in the HR group during their diets, though there were large variations of amounts within both groups. DHBA, DHPPA, DHCA and DHBA-Gly were quantified in almost all samples whereas DHPPTA was found in 81% of the samples. For DHBA, DHPPA and DHCA the precision of the analysis was acceptable, while the precision of DHPPTA and DHBA-Gly was poor. DHPPA and DHCA showed strong correlation to other metabolites, while the DHBA and DHBA-Gly showed less strong correlations. DHPPTA was weakly correlated to other metabolites. The metabolites showed similar patterns over time. Both groups had average high metabolite levels at baseline, the values then rose for the LR group and decreased the HR group. During the diet the groups differed significantly ($p=0.001$) in amount for all metabolites. No significant differences were seen between men and women.

The conclusions were that most participants in the study followed their diets since the profile of AR metabolites in urine followed each diet. Among the new metabolites DHCA seemed to be a good biomarker candidate due to the high detectability and relatively good correlation with biomarkers DHBA and DHPPA. DHBA-Gly and DHPPTA were not as good candidates due to the lower correlation. Method optimization is required for further evaluation of DHCA, DHPPTA and DHBA-Gly as biomarkers of whole grain intake of rye and wheat.

Keywords: alkylresorcinols, metabolites, biomarkers, whole grain, urine

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	4
Figurförteckning	5
Förkortningar	6
1 Inledning	7
1.1 Fullkorn och diabetes	7
1.2 Diabetes- Diet- Interventions- och Energirestriktions- studien (DDIET)	7
1.3 Biomarkörer	7
1.4 Alkylresorcinoler	8
1.5 Metaboliter av alkylresorcinoler	8
1.6 Syfte	9
2 Material och metod	11
2.1 Material	11
2.1.1 Kemikalier	11
2.1.2 Instrument och glasvaror	11
2.2 Metod	11
2.2.1 Provförberedelser och hydrolys	11
2.2.2 Vätske-vätskefas extraktion	12
2.2.3 Fastfas extraktion av urinprov och QC-prov	12
2.2.4 Derivatisering	13
2.2.5 GC-MS analys	13
2.2.6 Dataanalys	13
3 Resultat	15
3.1 Detekterbarhet, spridning och korrelation	15
3.2 Metabolitvariation över tid	16
3.3 Resultat för kvinnor och män	17
4 Diskussion	19
4.1 Detekterbarhet, spridning och korrelation	19
4.2 Metabolitvariation över tid	20
4.3 Kvinnor och män	21
4.4 Slutsatser	21
4.5 Tack	22
Referenslista	23

Tabellförteckning

Tabell 1. Koncentrationerna för punkterna i standardkurvan för de analyserade metaboliterna	12
Tabell 2. De selekterade jonerna för de analyserade metaboliterna och syringinsyra (internstandard) som användes för kvantifiering.	13
Tabell 3. Variationskoefficienter inom batcherna för de olika metaboliterna i QC-proverna med hög respektive låg koncentration.	15
Tabell 4. Variationskoefficienter mellan batcherna för de olika metaboliterna i QC-proverna med hög respektive låg koncentration.	15
Tabell 5. AR-metaboliternas R^2 -värden visar hur de korrelerade gentemot varandra.	16

Figurförteckning

- Figur 1.* Alkylresorcinolerna metaboliseras i flera steg för att till slut bilda de metaboliterna som analyserades i denna studie. Metabolismen som leder till DHCA är ännu inte känd. Figuren är modifierad från Ross *et al.*(2004a) och Zhu *et al.* (2014). 10
- Figur 2.* Från vänster till höger: DHBA, DHPPA, DHCA, DHPPTA, DHBA-Gly. Staplarna visar de olika metaboliternas medelmängder ($\mu\text{mol/dygn}$) samt spridningsstaplar med standardavvikelse för HR- och LR-gruppen. Gruppernas mängder före dieten visas i mitten för att tydliggöra likheter och skillnader mellan grupperna för respektive metabolit med mängderna under respektive diet på var sida. 16
- Figur 3.* AR-metaboliternas medelutsöndring över dygnet vecka för vecka med spridningsstaplar visande standardavvikelse för LR- samt HR-gruppen vid olika tidpunkter i före och under dieterna. 17
- Figur 4.* Metaboliternas medelmängder samt spridningsstaplar för standardavvikelse före och efter studiens början för kvinnor respektive män med HR- respektive LR-dieter. 18

Förkortningar

AR	Alkylresorcinol
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
CV	Variationskoefficient
DDIET	Diabetes- diet- interventions- och energirestriktions- studien
DHBA	3,5-Dihydroxibensoesyra
DHBA-Gly	2-(3,5-Dihydroxibensamid)-ättiksyra
DHCA	3,5-Dihydrocyfenylkanelsyra
DHPPA	3-(3,5-Dihydroxifenyl)-1-propansyra
DHPPTA	5-(3,5-Dihydroxifenyl)-pentansyra
DSQ	Tvåstegs quadruple (Dual stage quadruple)
GC	Gaskromatografi
GC-MS	Gaskromatografi-masspektrometri
Gly	Glycin
HPLC	Hög prestanda vätskekromatografi
HR	Hög risk
IS	Intern standard
LC-MS	Vätskekromatografi-masspektrometri
LR	Låg risk
PTV	Temperaturprogrammerad vaporisator (Programmed Temperature Vaporizer)
QC	Kvalitetskontroll (Quality control)
SIR	Selekterad jonregistrering (Selected ion recording)
SPE	Fastfasextraktion (Solid Phase Extraction)
TMCS	Trimetylklorosilan

1 Inledning

1.1 Fullkorn och diabetes

Epidemiologiska studier har konsekvent visat att ett högt fullkornsintag jämfört med ett lågt är förenat med en lägre risk att utveckla typ 2 diabetes (de Munter *et al.*, 2007; Aune *et al.*, 2013). Mekanismerna bakom detta samband är dock inte kartlagda än. Fullkorn har i vissa studier, men inte i andra, visat sig påverka insulinresistens, d.v.s. vävnadens känslighet för insulin och andra riskfaktorer för typ 2 diabetes (Pereira *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2012).

1.2 Diabetes- Diet- Interventions- och Energirestriktions- studien (DDIET)

Den tyska studien DDIET hade som mål att undersöka om och i vilken utsträckning två hypokaloriska dieter, en ”låg risk” (LR) kontra en ”hög risk” (HR), kunde förbättra insulinkänsligheten hos överviktiga vuxna med relativt nyligen diagnostiserad typ 2 diabetes. Under studien fick deltagarna äta antingen HR-dieten (HR-gruppen) eller LR-dieten (LR-gruppen) i en parallell design med 20 respektive 17 deltagare i grupperna. LR-dieten bidrog med ett högt koffeinintag, högt fullkornsintag (150 g från råg och vete) samt frånvaro av rött kött (fjäderfä tilläts). HR-dieten bestod av lågt fullkornsintag, inget koffein samt minst 150 g nötkött per dag. Veckovisa undersökningar av olika metabola parametrar utfördes före studien samt under de 8 veckor studien pågick (Nowotny *et al.*, 2015).

I projektet som beskrivs i denna rapport analyserades biomarkörer i urinprover från DDIET-studien i syfte att undersöka om deltagarna i studien verkade ha följt den föreskrivna dieten. Urinproverna var 24-timmarsurin uppsamlad från deltagarna i studien vid 6 tillfällen. Uppsamlingstillfällena inföll minst 1 och 2 veckor innan dieten påbörjades, samt vecka 2, 4, 6 och 8 under studien. Beprövade biomarkörer för fullkornsintag (DHBA och DHPPA, se nedan) extraherades och kvantifierades från urinproverna liksom ett antal nyidentifierade möjliga AR-metaboliter för att utvärdera deras lämplighet som fullkornsbiomarkörer.

1.3 Biomarkörer

Biomarkörer har blivit allt mer eftertraktade vid evidensbaserade kostundersökningar för att kringgå problem som föreligger vid självrapportering. Vanliga självrapporteringsmetoder som används för intagsuppskattning är intervjuer, kost-

dagböcker, vägd eller skattad kostregistrering. Dessa metoder är behäftade med relativt stora systematiska och/eller slumpmässiga fel som leder till att intagsbestämningen kan bli osäker eller i värsta fall missvisande (Shim *et al.*, 2014).

Ordet biomarkör finns bland annat definierat i Nationalencyklopedin:

”biomarkör, biologisk markör, företeelse eller storhet som när den kan påvisas resp. överstiger ett visst mätvärde utgör en indikator för att ett visst biologiskt förhållande föreligger, eller kan förväntas uppkomma, i en organism eller ett annat biologiskt system” (*Nationalencyklopedin*).

I enlighet med vad som tidigare föreslagits av Ross *et al.* (2004b) avses i denna rapport biomarkörer vara olika metaboliter av alkylresorcinoler (AR) som indikerar intag av fullkorn från vete och råg.

1.4 Alkylresorcinoler

Det finns många strukturellt varierande molekyler av resorcinoliska lipider och de återfinns i många olika typer av växter så som Ginko-trädet, sumakväxter (hit hör bland annat cashew), gräsfamiljen, och muskotfamiljen (Kozubek & Tyman, 1999). De vanligaste AR i vete och råg består av 5-n-alkyl-1,3-dihydroxy-benzen-derivat med mättad alkylkedja om 17-25 kolatomer. Förutom de mättade kolkedjorna förekommer omättade kolkedjor motsvarande ca 5 % i vete samt ca 20 % i råg (Ross *et al.*, 2004b). AR absorberas i tunntarmen (ca 60 % absorption (Ross *et al.*, 2003a)) och transporteras till levern via kylomikroner i lymfan (Ross *et al.*, 2003b; Linko-Parvinen *et al.*, 2007). Därefter inkorporeras AR i lipoproteinerna i blodplasma varifrån de sedan kan distribueras till olika vävnadstyper t.ex. erytrocytmembraner och fettvävnad (Ross *et al.*, 2004a; Linko & Adlercreutz, 2005; Linko-Parvinen *et al.*, 2007; Jansson *et al.*, 2010). AR elimineras i huvudsak genom metabolism där första steget är ω -oxidation följt av β -oxidation enligt samma mekanism som för tokoferoler (Figur 1) (Zhu *et al.*, 2014). I levern sker sedan fas II metabolism där en viss andel av metaboliterna konjugeras med glucuronsyra och/eller sulfat-grupper. Konjugerade och okonjugerade metaboliter förs sedan med blodet till njurarna för att huvudsakligen utsöndras med urinen (Ross *et al.*, 2004c). Utsöndringen sker även till viss del via galla från levern och ut ur kroppen med avföringen (Marklund *et al.*, 2014).

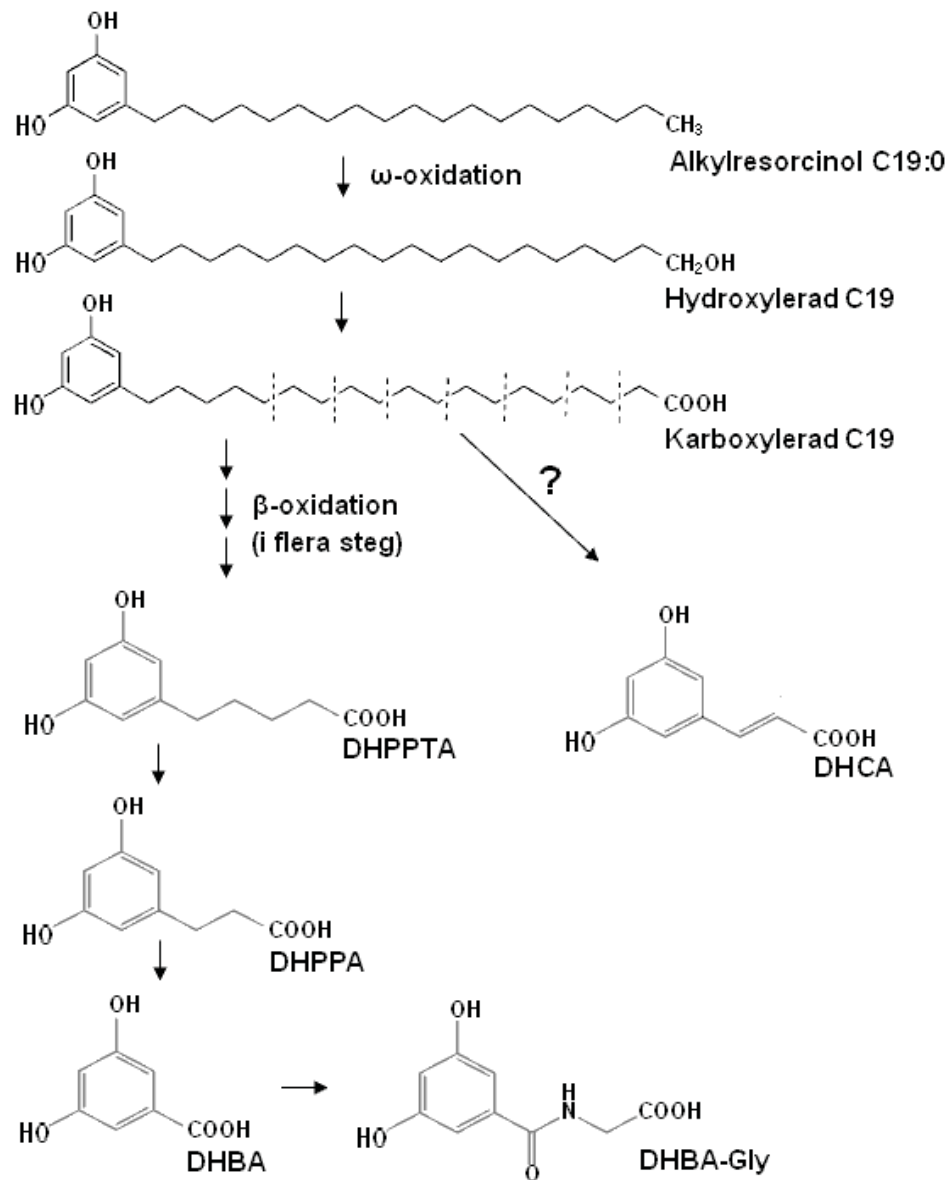
1.5 Metaboliter av alkylresorcinoler

Metaboliterna 3,5-dihydroxibensoesyra (DHBA) och 3-(3,5-dihydroxifenyl)-1-propansyra (DHPPA) upptäcktes av Ross *et al.* (2004c) vid analys av urin efter mål innehållande vetekli jämfört med urin efter 5 dagars AR-fri diet och blev senare bekräftade biomarkörer för intag av fullkornsråg och vete.

De nya AR metabolitkandidaterna 2-(3,5-dihydroxibensamid)-ättiksyra (DHBA-glycin/DHBA-Gly) och 5-(3,5-dihydroxifenyl)-pentansyra (DHPPTA) upptäcktes av en forskargrupp i North Carolina, USA, då de gjorde en humanstudie med 12 personer (Zhu *et al.*, 2014). Metaboliten 3,5-dihydroxyfenylkanelsyra (DHCA) identifierades som potentiell AR-metabolit av Bondia-Pons *et al.* (2013) i samband med en metabolitprofileringsstudie.

1.6 Syfte

Syftet med arbetet var att undersöka om deltagarna i DDIET-studien följde den diet de blivit anvisade genom att analysera AR metaboliterna i urinproverna. Följsamheten undersöktes analytiskt genom kvantifiering av DHBA- och DHPPA-innehållet i de deltagandes totala urinvolymer från ett dygn. En god följsamhet indikerades av stabil utsöndring av AR metaboliter över tid under interventionen samt att halten var högre respektive lägre hos individer i LR- respektive HR-grupperna. Syftet var vidare att analysera tre nya potentiella biomarkörer för att bedöma om dessa kunde påvisas och kvantifieras i urinproverna samt att undersöka hur väl dessa korrelerade till de etablerade biomarkörerna (DHBA och DHPPA).



Figur 1. Alkylresorcinolerna metaboliseras i flera steg för att till slut bilda de metaboliterna som analyserades i denna studie. Metabolismen som leder till DHCA är ännu inte känd. Figuren är modifierad från Ross *et al.* (2004a) och Zhu *et al.* (2014).

2 Material och metod

2.1 Material

2.1.1 Kemikalier

DHCA var en gåva från en kemist i Tjeckien medan DHBA-glycine, DHPPA samt DHPPTA syntetiserades för ändamålet av ReseaChem (Burgdorf, Schweiz). DHBA köptes från Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland). *N,O*-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) + trimetylklorosilan (TMCS) samt β -glucuronidas köptes av Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). Ättiksyra, natriumhydroxid, natriumacetat etylacetat, metanol, myrsyra, n-hexan, HCl (saltsyra) samt syringinsyra inskaffades från Merck (Darmstadt, Tyskland).

2.1.2 Instrument och glasvaror

Multifuge 3s, Heraeus, användes för att centrifugera urinrören under provberedningen. Temperaturen för vattenbadet vid hydrolysen reglerades med en Julabo, p (Tyskland). VWR, VX-2500 Multi-Tube Vortexer, USA användes för att vortexa proverna och eppendorpf centrifuge 5810 R (Hamburg, Tyskland) för centrifugering under vätskefasextraktionen. Kolonnerna som användes för fastfasextraktionen var Oasis® Max 60 mg kolonner från Waters (Milford, MA, USA) och roboten som användes vid samma extraktion var GX-274 ASPEC automated SPE instrument från Gilson (Middle-ton, USA). För värmning och indunstning användes Stuart® sample concentrator SBHCONC/1 samt Stuart® block heater SBH130D/3. Pipetter, spetsar, provrör 15 ml och 6 ml, korkar till rören, pastörpipetter, GC-vialer och insatser till dessa samt vial-lock från VWR International (Stockholm, Sverige).

2.2 Metod

2.2.1 Provförberedelser och hydrolys

Metoden som användes baseras på en metod som tidigare beskrivits av Marklund *et al.* (2010). Urinproverna hämtades ur frysrummet (-80 °C) och tinades i rumstemperatur, centrifugerades (3 min, 2500 rpm) och randomiserades innan 50 μ l urin pipetterades till provrör. Till provrören tillsattes 10 μ l internstandard (IS) bestående av syringinsyra (297 μ g/ml) i metanol liksom 740 μ l hydrolyslösning (0,1 M natriumacetat buffert pH 5 innehållande 201 μ g/ml β -glucuronidas/sulfatas från *Helix pomatia*). Två kvalitetskontrollprover (QC-prover) härrörande från 24 timmars urinuppsamling från två individer (en individ med hög koncentration metaboliter och en

med låg koncentration) förbereddes i triplikat tillsammans med övriga urinprover. Samma QC-prover användes till samtliga provomgångar. Proverna inkuberades i vattenbad (37 °C) över natten (16 ± 2 timmar) efter att de homogeniserats ett par sekunder med vortex.

Standardprover för en standardkurva om 9 punkter på en kalibreringskurva (se Tabell 1), innehållande AR-metaboliterna DHBA, DHPPA, DHCA, DHPPTA och DHBA-Gly i olika koncentrationer förbereddes direkt efter provpreparationerna. Till samtliga standardprover tillsattes även 10 µl IS. Korskontamination vid analysen undersöktes genom att en kontroll innehållande endast de eftersökta metaboliterna samt en innehållande endast IS förbereddes samtidigt. Till samtliga standardlösningar och kontroller tillsattes även 2,9 ml 2 % myrsyra i metanol innan de förslöts och förvarades i kylskåp tills indunstningen och derivatiseringen innan analysen med gaskromatografi-masspektrometri (GC-MS).

Tabell 1. Koncentrationerna för punkterna i standardkurvan för de analyserade metaboliterna

Metabolit	Lägsta koncentration	Kontrollprov	Högsta koncentration
DHBA	779 nmol/l urin	18182 nmol/l urin	77922 nmol/l urin
DHPPA	659 nmol/l urin	15385 nmol/l urin	65934 nmol/l urin
DHCA	67 nmol/l urin	1554 nmol/l urin	6667 nmol/l urin
DHPPTA	57 nmol/l urin	1332 nmol/l urin	5708 nmol/l urin
DHBA-Gly	57 nmol/l urin	1326 nmol/l urin	5687 nmol/l urin

2.2.2 Vätske-vätskefas extraktion

Efter 16 ± 2 timmar avbröts hydrolysen av urinproverna genom tillsats av 15 µl koncentrerad saltsyra följt av vortexning i en dryg minut. Därefter utfördes vätskevätskefas extraktioner genom att 3 ml etylacetat tillsattes till proven som sedan vortexades 2 minuter följt av 4 minuter centrifugering (2500 rpm, 4 °C). Fas-separation utfördes genom frysning av vattenfasen i ett isbad (etanol och kolsyreis), för att sedan hålla över lösningsmedelsfasen (etylacetat) i ett nytt provrör. Extraktionen upprepades en gång efter att proverna tinats i varmvattenbad. Lösningsmedelsfaserna kombinerades provvis (totalt ca 6 ml) samt evaporerades till torrhet i värmeblock (60 °C) under N₂ flöde.

2.2.3 Fastfas extraktion av urinprov och QC-prov

De extraherade ämnena löstes upp i 1 ml metanol och vortexades 1 minut. Extraktionen sköttes automatiskt med hjälp av en fastfasextraktionsrobot (solid phase extraction = SPE). Oasis® Max kolonner förbereddes med genomsköljning av 1 ml 0,1 M NaOH i metanol innan de laddades med proverna. Efter tvätt med 2 ml metanol eluerades proven ut i 6 ml-provrör med hjälp av 3 ml 0,1 M myrsyra i metanol.

2.2.4 Derivatisering

När alla prover, standarder och kontroller evaporerats till torrhet i värmeblock (60 °C) under N₂ flöde tillsattes 100 µl BSTFA + TMCS till samtliga provrör. Då alla provrör förslutits och vortexats noggrant inkuberades de i ett värmeblock (60 °C) i 60 minuter. Efter inkubationen pipetterades samtliga lösningar till GC-vialer.

2.2.5 GC-MS analys

Proverna (urin-, QC- och standardproverna samt kontrollerna) randomiserades till en turordningslista med hjälp av Excel. För att styra GC-MS analysen användes dataprogrammet Xcalibur. Till gaskromatografen (Finnigan™ TRACE GC Ultra Gas Chromatograph, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) användes en zebtron ZB-5MS kapillärkolonn med längd 15 m, en innerdiameter på 0,25 mm och tjockleken på stationärfasen var 0,25 µm. Hexan användes som blank. Av varje prov injicerades 1,5 µl med hjälp av en autosampler (AI/AS 3000) in i en injektionsport (programmerad temperatur vaporisation-injektor, PTV) uppvärmd till 300 °C. Helium användes som bärargas med flödet 1,0 ml/min. Temperaturprogrammet för ugnen började på 100 °C i en minut, följt av temperaturökning med 8,6 °C per minut till 180 °C. Därefter ökades temperaturen med 1,5 °C per minut till 185 °C, för att därefter öka 40 °C/minut till 260 °C och sedan öka 7,0 °C per minut till 280 °C. Slutligen höjdes temperaturen med 10,0 °C per minut till 300 °C som sedan hölls i 5 minuter. Efter gaskromatografen fördes proven genom en transportledning (310 °C) till en masspektrometer (Finnigan TRACE DSQ II massdetektor, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) där jonkällans temperatur var 250 °C. Proverna analyserades genom selekterad jonregistrering (selected ion recording = SIR). Tabell 2 visar de selekterade jonerna där masstalen överst i varje kolumn användes för kvantifieringen av ämnena. Identifiering av ämnena utfördes genom att standardlösningarnas toppar inom valt massintervall (jonens masstal ± 0,5 m/z) jämfördes med provernas toppar vid samma retentionstider.

Tabell 2. De selekterade jonerna för de analyserade metaboliterna och syringinsyra (internstandard) som användes för kvantifiering.

	DHBA	Syringinsyra	DHPPA	DHCA	DHPPTA	DHBA-Gly
m/z	370	342	398	291	268	254
	311	327	281	381	281	281
	355	312	293	396	426	

2.2.6 Dataanalys

För beräkningar av data från GC-MS-analysen användes dataprogrammet Xcalibur. För att identifiera de toppar i kromatogrammet som skulle kvantifieras, skapades en

processmetod i programmet baserat på standardprovernas retentionstider och mass-tal för utvalda joner. Selektion samt avgränsning av topparna justerades sedan manuellt vid behov. För kvantifieringen av respektive ämne användes massstalen överst i kolumnerna i Tabell 2.

En linjär standardkurva för varje metabolit och provomgång anpassades till de 9 standardproverna innehållande de olika metaboliterna samt IS (se Tabell 1). IS användes för att kompensera för analytförluster i proverna. Ekvationen för respektive standardkurva användes för att beräkna metabolitkoncentrationerna i de olika proverna samt substansmängderna sedan urinvolymerna erhållits från DDIET-studien.

För statistisk behandling av data samt för att skapa figurer användes Microsoft Office Excel 2013. Variationskoefficienterna (CV) inom- respektive mellan provomgångarna för de olika metaboliterna räknades ut med hjälp av QC-proverna.

För att beräkna korrelationskoefficienter (r-värde) användes punktdiagram där metaboliternas substansmängder ($\mu\text{mol}/\text{dag}$) plottades mot varandra. Korrelationskoefficienterna från trendlinjen visas sedan i Tabell 5.

3 Resultat

3.1 Detekterbarhet, spridning och korrelation

Alla 206 prover analyserades med avseende på de fem AR-metaboliterna. DHBA och DHPPA detekterades i samtliga prover, DHCA och DHBA-Gly detekterades i 204 (99 %) av proverna. DHPPTA detekterades i 167 (81 %) av proverna och hade låg respons relativt till bruset i en del av proverna. Variationskoefficienterna (CV) inom och mellan provomgångarna för de olika metaboliterna visas i Tabell 3 och Tabell 4. DHBA och DHPPA hade lägst CV.

Metaboliternas korrelation gentemot varandra varierade ganska mycket från ett R²-värde på 0,38 mellan DHBA och DHPPTA till ett R²-värde på 0,90 mellan DHBA och DHPPA, se Tabell 5.

Tabell 3. Variationskoefficienter inom batcherna för de olika metaboliterna i QC-proverna med hög respektive låg koncentration.

QC-prover	DHBA	DHPPA	DHCA	DHPPTA	DHBA-Gly	Batch
Hög konc. (CV %)	8,9	5,2	11,0	17,6	44,1	B1
	5,5	8,0	8,6	14,4	9,9	B2
	2,9	3,1	1,6	4,2	4,9	B3
	6,4	7,9	3,0	9,3	18,1	B4
	6,0	2,4	3,3	1,8	17,2	B5
	10,5	8,1	10,4	*	9,1	B6
	9,0	4,2	12,9	22,0	15,4	B7
Låg konc. (CV %)	20,0	23,2	37,3	46,1	65,5	B1
	10,0	9,0	14,3	*	35,9	B2
	5,9	18,6	16,8	39,8	10,8	B3
	8,9	15,2	17,7	32,9	22,9	B4
	2,9	13,3	18,8	*	12,0	B5
	7,6	7,6	19,0	4,4	26,6	B6
	16,9	12,8	27,1	0,6	32,4	B7

* Variationskoefficienterna kunde inte beräknas då de låga koncentrationerna inte kunde detekteras i flera prover.

Tabell 4. Variationskoefficienter mellan batcherna för de olika metaboliterna i QC-proverna med hög respektive låg koncentration.

QC-prover	DHBA	DHPPA	DHCA	DHPPTA	DHBA-Gly
Hög konc. (CV %)	4,5	2,0	5,4	8,5	7,5
Låg konc. (CV %)	7,3	4,7	8,3	17	21

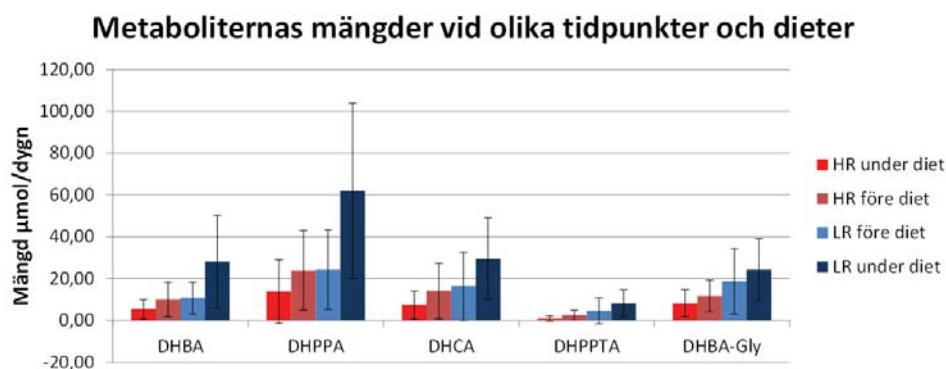
Tabell 5. AR-metaboliternas R²-värden visar hur de korrelerade gentemot varandra.

R ²	DHBA	DHPPA	DHCA	DHPPTA	DHBA-Gly
DHBA	1	0,90	0,58	0,38	0,41
DHPPA	0,90	1	0,76	0,58	0,50
DHCA	0,58	0,76	1	0,87	0,46
DHPPTA	0,38	0,58	0,87	1	0,47
DHBA-Gly	0,41	0,50	0,46	0,47	1

3.2 Metabolitvariation över tid

Urinvolymererna för samtliga prover fanns inte tillgängliga. De prover som saknade volym uteslöts därför ur beräkningarna liksom de prover där märkning var otydlig. Kvarvarande 181 prover låg till grund för resultaten i Figur 2, Figur 3 och Figur 4.

Gruppernas utsöndrade metabolitmängder skiljde sig signifikant (P=0,001) för samtliga metaboliter efter interventionens start. Medelmängderna (µmol/dygn) med spridningsstaplar visandes standardavvikelser för varje metabolit i de två grupperna redovisas före respektive efter dieternas start i Figur 2. LR-gruppens och HR-gruppens medelvärden var tillsynes lika före interventionens start för DHBA, DHPPA och DHCA medan gruppernas startvärden skiljde mer för DHPPTA och DHBA-Gly.

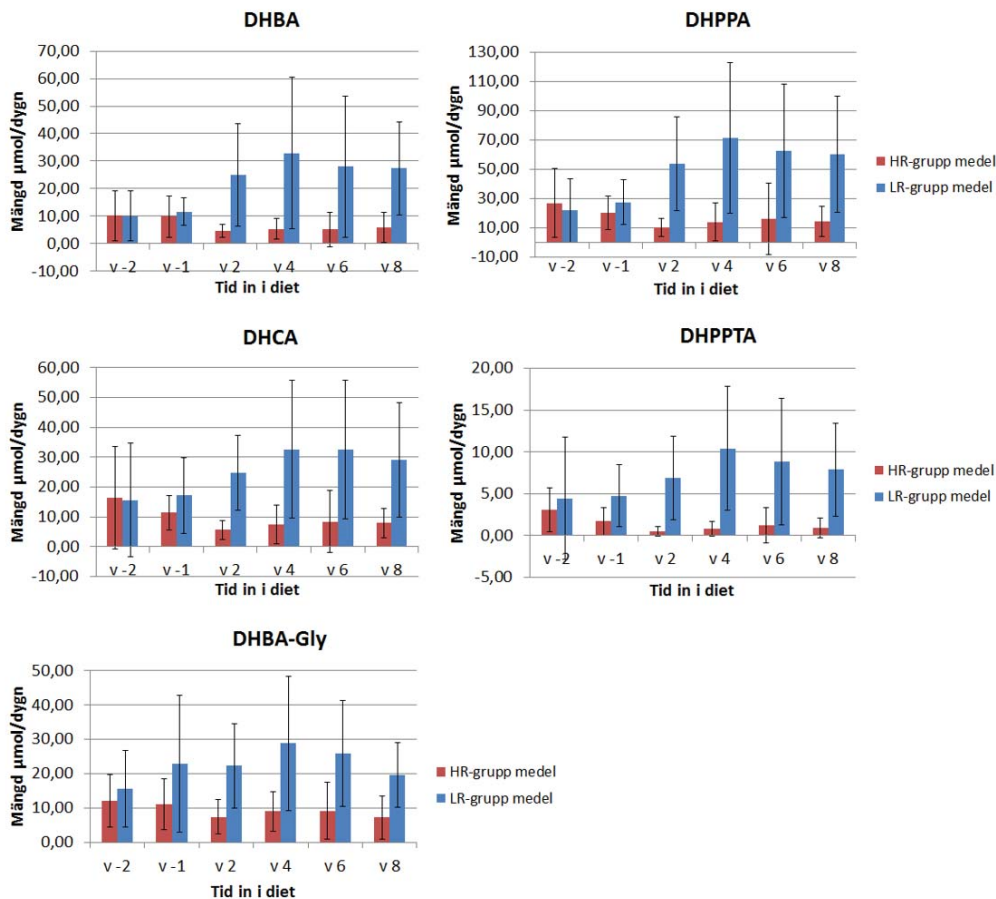


Figur 2. Från vänster till höger: DHBA, DHPPA, DHCA, DHPPTA, DHBA-Gly. Staplarna visar de olika metaboliternas medelmängder (µmol/dygn) samt spridningsstaplar med standardavvikelser för HR- och LR-gruppen. Gruppernas mängder före dieten visas i mitten för att tydliggöra likheter och skillnader mellan grupperna för respektive metabolit med mängderna under respektive diet på var sida.

Resultaten per kontrollvecka visas i Figur 3. För LR-gruppen varierade mängden utsöndrad metabolit likartat för DHBA, DHPPA, DHCA och DHPPTA med genomgående högre värden efter dieternas början jämfört med ursprungsvärdena. Mängden utsöndrad metabolit började öka vecka 2 med en topp vid vecka 4 för att sedan sjunka något vid de två efterföljande mättillfällena. LR-gruppen utsöndrade genomgående mer DHPPA och DHBA-Gly än HR-gruppen. DHBA-Gly följde

inte samma mönster som övriga metaboliter då ingen tydlig ökning kunde ses för LR-gruppen efter dietens start (endast vid två av fyra dietveckor översteg kontroll veckan innan start). Skillnaden skulle kunna bero på att DHBA-Gly var svårare att analysera (se detekterbarhet och CV-värden).

För HR-gruppen sänktes utsöndringen av DHBA, DHPPA, DHCA och DHPPTA, medan DHBA-Gly hade en mer marginell sänkning (Figur 3). Under dieten fanns det en tendens till en svag topp vecka 6 för samtliga metaboliter utom DHBA.

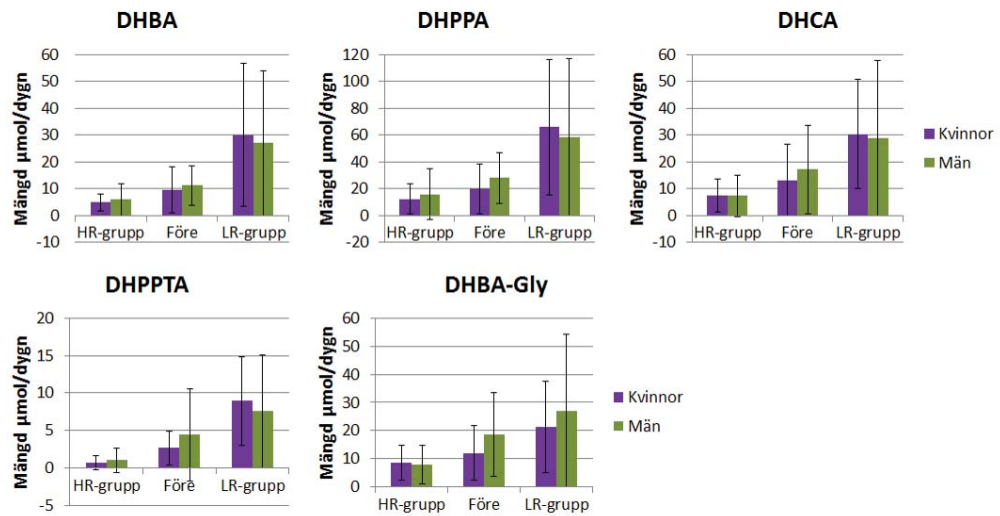


Figur 3. AR-metaboliternas medelutsöndring över dygnet vecka för vecka med spridningsstaplar visande standardavvikelse för LR- samt HR-gruppen vid olika tidpunkter i före och under dieterna.

3.3 Resultat för kvinnor och män

I Figur 4 visas samma uppdelning som i Figur 2 men uppdelat för kvinnor och män. Ingen signifikant skillnad fanns mellan könen varken inom eller mellan metaboliterna. Männerna utsöndrade något högre metabolitmängder än kvinnorna före dieternas början samt i HR-gruppen (vid lägre metabolithalter). I LR-gruppen utsöndrade

kvinnorna lite mer DHBA, DHPPA och DHCA (de mest pålitliga metaboliterna) än männen under pågående diet.



Figur 4. Metaboliternas medelmängder samt spridningsstaplar för standardavvikelser före och efter studiens början för kvinnor respektive män med HR- respektive LR-dieter.

4 Diskussion

4.1 Detekterbarhet, spridning och korrelation

DHBA och DHPPA anses vara etablerade, utvärderade biomarkörer för AR-intag (Landberg *et al.*, 2008; Marklund *et al.*, 2013). Detta bekräftades av att de återfanns i samtliga prover samt har relativt låga CV-värdena. Av de nya metabolitkandidaterna hade DHCA god detekterbarhet (99 % av proverna) och relativt låga CV-värden och visade därmed god metodkompatibilitet. För DHBA-Gly, som hade bra detekterbarhet (99 % av proverna) men höga CV-värden, var metoden kanske inte lika väl anpassad för kvantifiering. DHPPTA hade både låg detektionsgrad (81 %) och höga CV-värden vid låga metabolitkoncentrationer och var därmed inte lämplig för identifiering eller kvantifiering av AR i metodens aktuella utformning. Från CV-värdena för QC-proverna (Tabell 3) kunde det även konstateras att metoden genomgående gav säkrare värden vid högre koncentrationer än vid lägre. QC-provet med låg koncentration hade högre metabolitkoncentration än de urinprover från DDIET-studien som hade lägst koncentration. Mätosäkerheten var troligtvis ännu större för DDIET-proverna med låg koncentration än vad som kunde visas med QC-proverna då QC-proverna inte täckte koncentrationsområdet för de svagaste urinproverna.

För att säkerställa resultatens kvalitet för metabolitkandidaterna bör en full validering av metoden utföras, till exempel avseende detektions- och kvantifieringsgränser, linjäritet och precision (U.S. Department of Health and Human Services *et al.*, 2001). Metoden var minst tillämpbar för DHBA-Gly och DHPPTA då topparna från dessa var svåra att skilja från bruset. Det var ibland svårt att bestämma topparnas avgränsningar även för de övriga metaboliterna, samt vilken topp som var rätt då retentionstiderna kunde variera något mellan proverna. För metodoptimering skulle modifieringar i derivatiseringssteg samt GC-MS program och utrustning, så som kolonn, kunna utvärderas. Även användning av andra joner för kvantifiering kan studeras noggrannare. Därutöver skulle spikningstester och undersökning av alternativa derivatiseringsagens kanske förbättra kvantifierings- och detektionsprecisionen för de mer svåranalyserade metaboliterna.

Metaboliternas korrelation till varandra är ett tecken på att de är relaterade till samma parametrar, i det här fallet intag, upptag, metabolism och exkretion av AR. Korrelationen utvärderades med hjälp av R^2 -värden för varje metabolit plottad mot de andra metaboliterna. Höga värden motsvarar högre korrelation och vice versa.

Då korrelationsvärdena endast grundar sig på de prover där metaboliterna kunde kvantifieras kunde det antas att korrelationen mellan DHPPTA och övriga metaboliter framför allt representerade prover med hög metabolitkoncentration. Analyser av DHBA och DHPPTA visade att det över i stort sett hela koncentrationsspannet

förekom prover där DHPPTA inte kunde kvantifieras (data visas ej). Korrelationen mellan metaboliterna kan ha påverkats negativt av proverna med lägre metabolitkoncentration då dessas precision i vissa fall var låga.

DHBA hade relativt låg korrelation till DHPPTA som enligt Zhu *et al.* (2014) antas vara prekursor till DHBA, detta kan synas vara förvånande. Förklaringar kan vara att DHPPTA har låg detekterbarhet och ett högt CV-värde, vilket styrks av att detta gäller även i förhållande till nästan alla övriga metaboliter. Andra orsaker kan vara varierande metabolism av DHPPTA och DHBA hos försöksdeltagarna, denna variation kan eventuellt ha förstärkts av skillnader i övrig kost.

Korrelationen för DHBA-Gly var svag mot övriga metaboliter. Den jon som användes för kvantifieringen var inte molekyljonen. Molekyljonen eller en annan jon skulle kunna undersökas för att se de kunde passa bättre för kvantifiering.

4.2 Metabolitvariation över tid

Då det var stor spridningen i resultaten var många av iakttagelserna inte signifikanta, men tendenserna kan eventuellt vara värda att studera vidare (Figur 2-4).

Korrelerande resultat över tid för medelmängderna av de olika metaboliterna i Figur 2 tyder på att de är mått på samma parameter. Resultaten stämde dessutom överens med vad som kunde förväntas av AR-intaget i och med fullkornsintaget.

Att de flesta av metaboliterna även kunde påvisas i HR-gruppen berodde troligtvis på att deltagarna fick äta upp till 10 g fullkorn per dag (Nowotny *et al.*, 2015). AR finns även i icke-fullkornsprodukter och då framför allt i rågprodukter eftersom avlägsnandet av den AR-rika klidelen av sädeskornet vid mjöltillverkningen inte är komplett. Avlägsnandet av klidelen vid rågmjölsproduktion försvåras av att aleuronlagret sitter hårdare fäst vid endospermdelen av sädeskornet hos råg än hos vete (Slavin *et al.*, 2001). Om personer i HR-gruppen ätit icke-fullkornsprodukter med hög andel råg skulle de alltså ändå kunna ha haft ett relativt högt AR-intag. För en del personer som haft ett högt AR-intag tidigare kan en del inlagrade AR eventuellt också ha frigjorts från fettväv (Jansson *et al.*, 2010).

För LR-gruppen skulle den successiva ökningen av metabolithalten vid vecka 2 och vecka 4 kanske kunna förklaras av att det kan ta ett tag för deltagarna att anpassa sig till ett ökat AR intaget efter start av dieten (Figur 3). Detta då ändrad kost kan ge upphov till ändrad sammansättning av mikroorganismer i tarmen vilket potentiellt skulle kunna öka upptaget av AR från tarmen (Ramakrishna, 2013). Minskning vid senare provtillfällen skulle kunna förklaras av att försöksdeltagarnas motivation till att följa dieten kan ha minskat med tiden och att de då minskat fullkornsintaget (Jin *et al.*, 2008). En annan förklaring kunde vara att det med tiden kan ha skett en ökad utsöndring av AR via gallan och/eller en ökad inbindning till erythrocyter, fettvävnad eller annan vävnad vilket gjort att mängden AR som metaboliserats minskat

(Linko & Adlercreutz, 2005; Linko-Parvinen *et al.*, 2007; Jansson *et al.*, 2010; Marklund *et al.*, 2014).

För HR-gruppen förklaras minskningen av metaboliter vid start av dieten av att intaget av fullkorn i dieten begränsades (Figur 3). Den svaga toppen vid vecka 6 skulle även den kunna bero på minskad motivation att följa dieten (Jin *et al.*, 2008). I övrigt är det svårt att dra några konkreta slutsatser på grund av begränsningar i analysmetoden och stora variationer mellan individer.

Mer forskning behövs på de metabola vägarna för framför allt DHCA men det kunde även vara intressant att utvärdera hur effektiva de övriga kända metabola stegen är. Även specificiteten hos de nya metaboliterna gentemot andra alkylresorcinoler och liknande molekyler skulle behöva undersökas bättre för att utesluta andra källor än fullkorn från vete och råg.

4.3 Kvinnor och män

I tidigare studier, bland annat Andersson *et al.* (2011), har koncentrationsskillnader för AR i plasma mellan kvinnor och män observerats, varför eventuella skillnader i urinutsöndringen utvärderades i detta arbete. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan kvinnor och män. För de små skillnader som kunde anas för de olika metaboliterna var det svårt att avgöra om de kom från skillnader i metabol aktivitet mellan könen, skillnader i intag eller osäkra mätresultat.

Inom- och mellan individvariationer för DHBA och DHPPTA har studerats tidigare (Landberg *et al.*, 2008). Variationer för de övriga metaboliterna skulle kunna studeras vidare för att kunna dra tydligare slutsatser.

4.4 Slutsatser

De flesta deltagarna i DDIET-studien tycktes följa sina dieter då LR-gruppen ökade fullkornsintaget medan HR-gruppen sänkte samma intag jämfört med startvärdena även om det rådde stor exkretionsvariation inom de två dietgrupperna. För samtliga metaboliter skiljde sig också grupperna signifikant efter dieternas start.

DHPPA, DHPPTA och DHCA, med sina låga CV-värden och höga korrelationer, var med denna metod de säkraste biomarkörerna för fullkornsvete och råg. DHBA-Gly hade hög detekterbarhet och medelhög korrelation till övriga metaboliter men höga CV-värden varför metaboliten med nuvarande metod inte är tillförlitlig som biomarkör. DHPPTA hade relativt låg detekterbarhet vilket skulle kunna förklara dess höga CV-värden vid låga koncentrationer samt låga korrelationer till de andra metaboliterna. Med detta sammanvägt var DHPPTA inte tillförlitlig som biomarkör för fullkornsvete och råg med denna metod.

4.5 Tack

Rickard Landberg för handledning kring teori och förslag till struktur vid databearbetning och rapportskrivande. Janicka Nilsson för bra och tålmodig handledning och svar på frågor, hjälp med de laborativa momenten samt analytolkning- och bearbetning och alltid med gott humör, du är en pärla! Huaxing Wu för teoretisk genomgång, hjälp med GC-MS-utrustningen och för att du alltid tog dig tid att svara på frågor. Alla på institutionen för Livsmedelsvetenskap för det vänliga bemötandet och stödet.

Referenslista

- Andersson, A., Marklund, M., Diana, M. & Landberg, R. (2011). Plasma alkylresorcinol concentrations correlate with whole grain wheat and rye intake and show moderate reproducibility over a 2- to 3-month period in free-living Swedish adults. *The Journal of Nutrition*, 141(9), pp 1712–1718.
- Andersson, A., Tengblad, S., Karlström, B., Kamal-Eldin, A., Landberg, R., Basu, S., Åman, P. & Vessby, B. (2007). Whole-grain-foods do not affect insulin-sensitivity or markers of lipid peroxidation and inflammation in healthy, moderately overweight subjects. *The Journal of Nutrition*, 137(6), pp 1401–1407.
- Aune, D., Norat, T., Romundstad, P. & Vatten, L. J. (2013). Whole grain and refined grain consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose–response meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Epidemiology*, 28(11), pp 845–858.
- Bondia-Pons, I., Barri, T., Hanhineva, K., Juntunen, K., Dragsted, L. O., Mykkänen, H. & Poutanen, K. (2013). UPLC-QTOF/MS metabolic profiling unveils urinary changes in humans after a whole grain rye versus refined wheat bread intervention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(3), pp 412–422.
- Jansson, E., Landberg, R., Kamal-Eldin, A., Wolk, A., Vessby, B. & Åman, P. (2010). Presence of alkylresorcinols, potential whole grain biomarkers, in human adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 104(5), pp 633–636.
- Jin, J., Sklar, G. E., Min Sen Oh, V. & Chuen Li, S. (2008). Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient’s perspective. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(1), pp 269–286.
- Kozubek, A. & Tyman, J. H. P. (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chemical Reviews*, 99(1), pp 1–26.
- Landberg, R., Aman, P., Friberg, L. E., Vessby, B., Adlercreutz, H. & Kamal-Eldin, A. (2008). Dose response of whole-grain biomarkers: alkylresorcinols in human plasma and their metabolites in urine in relation to intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(1), pp 290–296.
- Linko, A.-M. & Adlercreutz, H. (2005). Whole-grain rye and wheat alkylresorcinols are incorporated into human erythrocyte membranes. *British Journal of Nutrition*, 93(01), p 11.
- Linko-Parvinen, A.-M., Landberg, R., Tikkanen, M. J., Adlercreutz, H. & Peñalvo, J. L. (2007). Alkylresorcinols from whole-grain wheat and rye are transported in human plasma lipoproteins. *The Journal of Nutrition*, 137(5), pp 1137–1142.
- Marklund, M., Landberg, R., Andersson, A., Åman, P. & Kamal-Eldin, A. (2013). Alkylresorcinol metabolites in urine correlate with the intake of whole grains and cereal fibre in free-living Swedish adults. *British Journal of Nutrition*, 109(01), pp 129–136.
- Marklund, M., Landberg, R., Åman, P. & Kamal-Eldin, A. (2010). Determination of alkylresorcinol metabolites in human urine by gas chromatography–

- mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878(11–12), pp 888–894.
- Marklund, M., Stromberg, E. A., Laerke, H. N., Knudsen, K. E. B., Kamal-Eldin, A., Hooker, A. C. & Landberg, R. (2014). Simultaneous pharmacokinetic modeling of alkylresorcinols and their main metabolites indicates dual absorption mechanisms and enterohepatic elimination in humans. *Journal of Nutrition*, 144(11), pp 1674–1680.
- de Munter, J. S., Hu, F. B., Spiegelman, D., Franz, M. & van Dam, R. M. (2007). Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med*, 4(8), p e261.
- Nationalencyklopedin. Available from: <http://www.ne.se/biomarkör>. [Accessed 2014-05-16].
- Nowotny, B., Zahiragic, L., Bierwagen, A., Kabisch, S., Groener, J. B., Nowotny, P. J., Fleitmann, A. K., Herder, C., Pacini, G., Erlund, I., Landberg, R., Haering, H.-U., Pfeiffer, A. F. H., Nawroth, P. P. & Roden, M. (2015). Low-energy diets differing in fibre, red meat and coffee intake equally improve insulin sensitivity in type 2 diabetes: a randomised feasibility trial. *Diabetologia*, 58(2), pp 255–264.
- Pereira, M. A., Jacobs, D. R., Pins, J. J., Raatz, S. K., Gross, M. D., Slavin, J. L. & Seaquist, E. R. (2002). Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), pp 848–855.
- Ramakrishna, B. S. (2013). Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28, pp 9–17.
- Ross, A. B., Chen, Y., Frank, J., Swanson, J. E., Parker, R. S., Kozubek, A., Lundh, T., Vessby, B., Åman, P. & Kamal-Eldin, A. (2004a). Cereal alkylresorcinols elevate γ -tocopherol levels in rats and inhibit γ -tocopherol metabolism in vitro. *The Journal of Nutrition*, 134(3), pp 506–510.
- Ross, A. B., Kamal-Eldin, A., Lundin, E. A., Zhang, J.-X., Hallmans, G. & Åman, P. (2003a). Cereal alkylresorcinols are absorbed by humans. *The Journal of Nutrition*, 133(7), pp 2222–2224.
- Ross, A. B., Kamal-Eldin, A. & Åman, P. (2004b). Dietary alkylresorcinols: absorption, bioactivities, and possible use as biomarkers of whole-grain wheat- and rye-rich foods. *Nutrition Reviews*, 62(3), pp 81–95.
- Ross, A. B., Shepherd, M. J., Knudsen, K. E. B., Glitsø, L. V., Bowey, E., Phillips, J., Rowland, I., Guo, Z.-X., Massy, D. J. R., Åman, P. & Kamal-Eldin, A. (2003b). Absorption of dietary alkylresorcinols in ileal-cannulated pigs and rats. *British Journal of Nutrition*, 90(04), p 787.
- Ross, A. B., Åman, P. & Kamal-Eldin, A. (2004c). Identification of cereal alkylresorcinol metabolites in human urine-potential biomarkers of wholegrain wheat and rye intake. *Journal of Chromatography B*, 809(1), pp 125–130.
- Shim, J.-S., Oh, K. & Kim, H. C. (2014). Dietary assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiology and Health*, 36, pp 1–8.
- Slavin, J. L., Jacobs, D. & Marquart, L. (2001). Grain processing and nutrition. *Critical Reviews in Biotechnology*, 21(1), pp 49–66.

- U.S. Department of Health and Human Services (HHS), Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001). Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>. [Accessed 2017-09-29].
- Ye, E. Q., Chacko, S. A., Chou, E. L., Kugizaki, M. & Liu, S. (2012). Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *Journal of Nutrition*, 142(7), pp 1304–1313.
- Zhu, Y., Shurlknight, K. L., Chen, X. & Sang, S. (2014). Identification and pharmacokinetics of novel alkylresorcinol metabolites in human urine, new candidate biomarkers for whole-grain wheat and rye intake. *The Journal of Nutrition*, 144(2), pp 114–122.