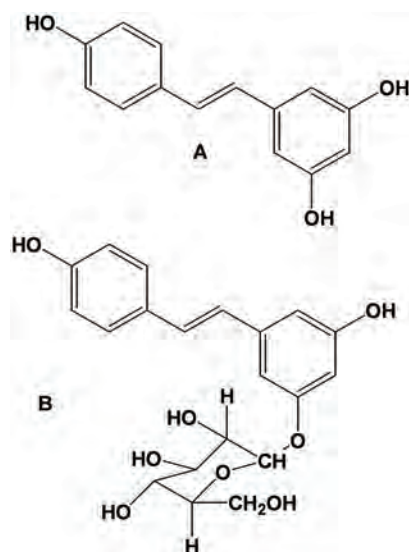


Danske rødvine indeholder kun lidt resveratrol

Resveratrol er et af de biologisk aktive stoffer i rødvin. Tidligere bestemmelser viser, at vin lavet på druen Pinot Noir har det højeste indhold af resveratrol. I Danmark dyrkes andre sorter til vinfremstilling. Her beskrives for første gang indholdet af resveratrol i vine lavet på druer dyrket i Danmark. Resveratrolindholdet er bestemt ved brug af LC-MS

Af Heidi D. Andersen, Malene Cohen, Joan Tønning, Kim Olsson, Torben Lund og Ole Vang, Institut for Natur, Systemer og Modeller, Roskilde Universitetscenter

Siden det i 1997 blev påpeget, at resveratrol (figur 1A) har en mulig kræftforebyggende effekt har mange forskere været fokuseret på de biologiske effekter af resveratrol. Forslagene er



Figur 1. A) *trans*-resveratrol. B) *trans*-piceid.

lavere dyr [2] og modvirker nogle af følgevirkninger af overvægt [3]. Så der er god grund til at se efter kilder til indtagelse af resveratrol.

Forekomst

Resveratrol findes i en række planter, herunder bær, jordnødder, kakao og vindruer [4; 5]. Det højeste indhold af resveratrol er fundet i Japansk pileurt (*Polygonum cuspidatum*), som indgår i kinesisk naturmedicin [5].

Resveratrol i rødvin

Tilstedeværelsen af resveratrol i rødvin skyldes, at druerne naturligt danner resveratrol (og piceid, figur 1) som respons på svampeinfektioner eller UV-bestråling. Resveratrolindholdet har været bestemt for en række forskellige vine, fremstillet i forskellige lande. En samlet oversigt viste i 2007, at den højeste mængde resveratrol findes i vin lavet på druen Pinot Noir. Oversigten viste også, at indholdet varierede meget fra land til land [6]. Danmark blev i 2000 optaget som kommerciel vindyrkningsnation, og flere vinavlere har siden kunnet levere

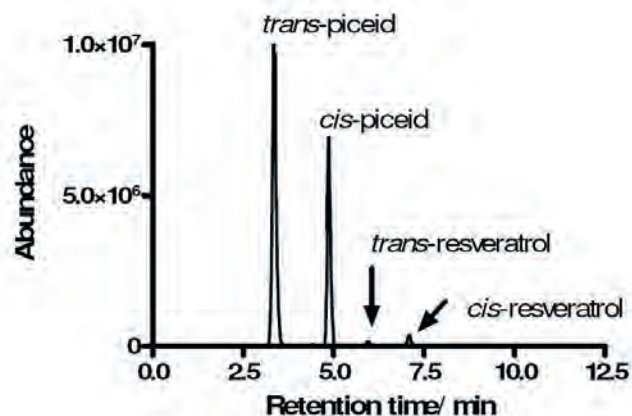
danske rødvine. Da klimaet i Danmark er noget køligere og mere fugtigt end i de mere traditionelle vindyrkningslande som for eksempel Frankrig og Spanien, kan det tænkes, at der er en større mængde af resveratrol i danske vine. Omvendt er antallet af solskinstimer (og dermed UV-bestrålingen) lavere i Danmark, hvilket kan betyde, at der vil være en mindre mængde resveratrol i de danske druer. Endvidere er de druer, der anvendes til vindyrkning i Danmark, andre sorter end, dem der anvendes længere mod syd. Der findes ingen undersøgelser af resveratrol i danske vine, eller af de druesorter der dyrkes i Danmark, men vin produceret i andre nordlige vinlande som for eksempel Tjekkiet har et højt indhold af resveratrol [6].

Den samlede resveratrolpulje i rødvin består af *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol, *trans*-piceid og *cis*-piceid (figur 1), hvilket betyder, at det er summen af disse, som udgør den mængde resveratrol, der indtages ved at drikke rødvin.

Formålet med denne undersøgelse er at bestemme mængden af resveratrol i vine fremstillet af druer (Rondo, Castel, Regent og Léon Millot) dyrket i Danmark. Undersøgelsen sammenligner også flere årgange og dyrkningssteder af vine lavet på Rondo druen for at få indtryk af variationen i danske vine.

Analysemetode

Til bestemmelse af resveratrol- og piceidindholdet i danske rødvine valgte vi LC-MS som analysemetode. *trans*- og *cis*-resveratrol samt *trans*- og *cis*-piceid blev adskilt på en kort C-18 kolonne (50 × 2 mm) med gradienteluering ved brug af solventerne ►



Figur 2. LC-MS analyse af en vinprøve.

SCANLAF

MARS

Klasse 2 sikkerheds kabinetter

- bedste operatør komfort med et lydniveau under 54 dB(A)
- laveste energiforbrug og CO₂ - emission på under 0.9 A
- tillader installation i lav loftede rum med arbejdsbord højder op til 100 cm
- stort program for alle applikationer
- dansk produceret



SCANLAF

Experts in Laminar Flow, Cooling and Vacuum Technology

ScanLaf A/S

Nøglegaardsvej 20, Vassingerød, 3540 Lyngby, Denmark

Tel: +45 3940 2566, Fax: +45 4498 1741

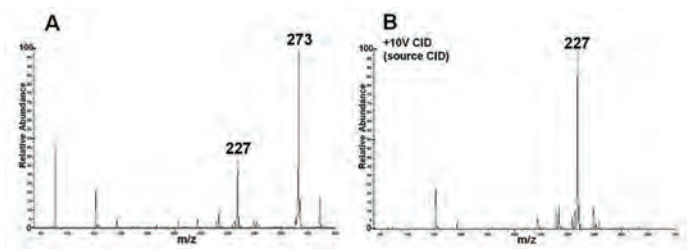
Mail: scanlaf@scanlaf.dk, www.scanlaf.dk

LEVNEDSMIDDELKEMI



vand tilsat 0,1% myresyre (A) og ren acetonitril (B). HPLC adskillelserne blev udført med en flowrate på 0,3 mL/min og injection af 5 µl vinprøve på kolonnen. Som ioniseringsteknik valgte vi APCI (-) (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) med en negativ spænding på corona nålen (-5 kV). I figur 2 vises et eksempel på et LC-MS chromatogram af en rødvin.

Resveratrol afgiver let en af phenolprotonerne og er således meget velegnet til analyse i både negativ APCI og negativ elektro spray ionisering (ESI). I begge ioniseringsformer, APCI(-) og ESI(-), danner resveratrol et addukt med formiat ionen HCOO⁻ (m/z 273), hvilket ikke tidligere er beskrevet i litteraturen. Ved at tilføre 10 volt in-source kollisionsenergi før ionerne bliver detekteret af ion trappen, sker der en protonoverførsel mellem resveratrol og formiat ionen inden for addukt ionen, hvorved ionintensiteten koncentrerer på ionen m/z 227 [M-H]⁻ (figur 3). Tilsvarende addukt bliver dannet mellem piceid og formiat ionen og ved anvendelse af 15 volt in-source kollisionsenergi, kan adduktet omdannes til molekylarionen minus en proton [M-H]⁻ og HCOOH.

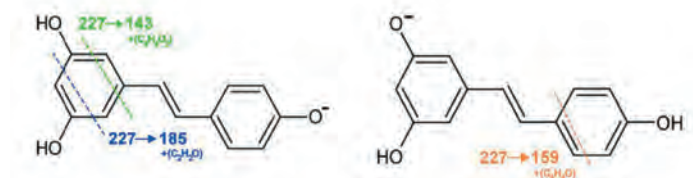


Figur 3. a) APCI(-) massespektrum af *trans*-resveratrol, m/z 227 $[M-H]^-$ og m/z 273 myresyreaddukt $[M+HCOO]^-$ b) APCI(-) massespektret optaget med 10 V kollision induceret dissociering før ionerne analyseres af ion trappen.

Fragmentering

Det anvendte massespektrometer er udstyret med en ion-trap og prøverne blev analyseret ved hjælp af en LC-MS² metode. Fragmentering ved MS² på resveratrol (m/z 227) danner primært en ion på m/z 185, men også m/z 159 og m/z 143 ses i spektret. Fragmentationen m/z 185 kan forklares med en fragmentering langs den blå linje, mens m/z 143 svarer til en fragmentering langs den grønne linje (figur 4). m/z 159 fås ved at fragmentere molekylet i den modsatte ende langs den orange linje (figur 4).

For piceid fragmenteres $[M]^-$ ionen m/z 389 til m/z 227, hvilket svarer til fraspaltning af glycosid. Derefter følger fragmenteringen samme mønster som resveratrol. Vi anvendte en LC-MS² metode til analyse af vinprøverne, hvor massespek-



Figur 4. Fragmentering af resveratrols $[M-H]^-$ anion i ion trappen. Der observeres tre nedbrydningsstoppe m/z = 185 (100%), 159 (50%) og m/z 143 (20 %).

trometret i de første 5 min blev indstillet til at nedbryde m/z 389 ionen (piceid anionen) og måle intensiteten af nedbrydningsionen m/z 227 og efter 5 min til at nedbryde m/z 227 (resveratrol anionen) og optage intensiteten af fragmentationen m/z 185.

Oplosninger

trans-Resveratrol blev opløst i methanol (1 mg/mL) og *trans*-piceid i 50% methanol (0,5 mg/mL). Yderligere fortynding blev foretaget i eluent (15% acetonitril + 85% H₂O tilsat 0,1% myresyre). Alle opløsninger blev opbevaret i mørke ved 4 °C. Der blev fremstillet en ekstern standardkurve i filtreret vin (0,20 µm filter) tilsat *trans*-resveratrol og *trans*-piceid (0,0-25,0 µg/mL). Ved standardtilsætnings-metoden er *trans*-resveratrol og *trans*-piceid tilsat i koncentrationerne 0,0; 2,5; 5,0 og 10,0 µg/mL. Til valideringen blev der fremstillet kontroller indeholdende resveratrol og piceid (2,5 µg/mL og 15 µg/mL). Alle vinprøver blev filtreret (0,20 µm filter) og analyseret umiddelbart efter åbning.

Validering

Parametrene linearitet, måleområde, detektionsgrænse, kvantifikationsgrænse og præcision blev undersøgt, mens der blev taget højde for indflydelsen af parametrene følsomhed, robusthed, nøjagtighed og selektivitet. Måleområdet blev defineret som det interval af den eksterne standardkurve, hvor der forefindes en god linearitet og præcision og blev bestemt til 1,0-20,0



Supplies and Services
for Sophisticated Macromolecular Science

Reference Materials & LC Columns

Unveil the size and properties of your molecules



- Reference Polymer Standards:
widest range of polymer types and molar masses
- Assembled Calibration and Validation KitsSpecialty
- Packed Columns for Size Separation
optimum columns for your application
- More than 20 years expertise in
biopolymer and polymer chemistry

Bestil det nye katalog på GPC@polygen.dk

Distributør i Danmark:
POLYGEN
Telefon: 70 10 10 88
www.polygen.eu





Tabel 1. Oversigt over analyserede vinprøver.

Prove ID	Druesort	Årgang	Vingård/Sted
A	Rondo	2002	Nordlund/Storkøbenhavn
B	Rondo	2003	Nordlund/Storkøbenhavn
C	Rondo	2004	Nordlund/Storkøbenhavn
D	Léon Millot	2004	Nordlund/Storkøbenhavn
E	Rondo	2005	Nordlund/Storkøbenhavn
F	Rondo	2005	Hjelm /Mon
G	Rondo	2005	Skærsøgård/Østjylland
H	Rondo A	2006	Nordlund/Storkøbenhavn
I	Rondo B	2006	Nordlund/Storkøbenhavn
J	Castel	2006	Nordlund/Storkøbenhavn
K	Regent	2006	Nordlund/Storkøbenhavn

µg/mL for både *trans*-resveratrol og *trans*-piceid.

Vinprøverne blev analyseret både ud fra den eksterne standardkurve samt ved standardtilsætningsmetoden. Vores undersøgelse af resveratrol-indholdet i danske rødvine er baseret på 11 vinprøver venligst doneret af vingårdene Nordlund, Hjelm og Skærsøgård, se tabel 1. Det er forsøgt at belyse følgende fire parametres indflydelse på indholdet af resveratrol og piceid:

1 Lokaltet - Rondo, årgang 2005 fra Nordlund, Hjelm og Skærsøgård (vinprøverne E, F og G).

2 Årgang - Rondo (Nordlund) fra årgangene 2002 til 2006 (vinprøverne A, B, C, E, H og I)

3 Druesorter - Nordlund årgang 2006 fremstillet af Rondo, Castel og Regent (vinprøverne H, I, J og K)

4 Stress - Rondo (Nordlund) årgang 2006 fra marker med forskellig grad af vinskimmel (vinprøverne H og I).

Resultater

Det var muligt at detektere resveratrol i vinprøverne, men resveratrol niveauet lå for alle vinprøver under metodens måleområde, dvs < 1 µg/mL. Indholdet af piceid kunne derimod bestemmes med sikkerhed. I alle vinprøver, undtagen A, C og D, kunne der påvises et total piceid-indhold større end 0,4 µg/mL vin. Størst var mængderne i prøve I og J. Endvidere kunne det fastslås at hoved-

**Repræsentativ
Formaling og Signering**

SKANLAB 

Vind en Mercedes sportsvogn
med RETSCH, læs mere på
www.retsch.com/grandprix

www.skanlab.com
rets@skanlab.com



 **Elmo
Rietschle**
A Gardner Denver Product

**Vakuumpumper
Lavtryksskubberer
Sidekanalblæsere**

www.gd-elmorietschle.com
e-mail: info@dk.gardnerdenver.com
+45 59 44 40 50



Ren gas er god kemi



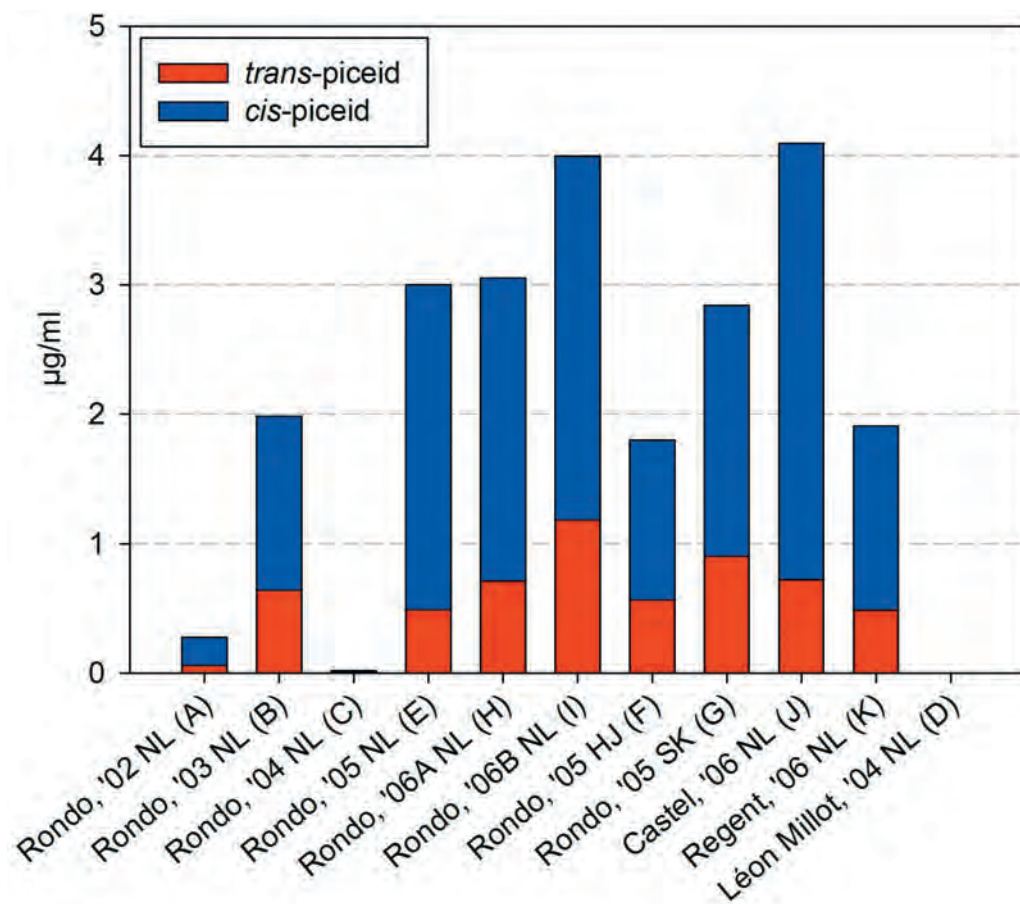
strandmøllen.dk

Hjemmesiden med den bedste rådgivning om gas til alle formål!

STRANDMØLLEN

Strandmøllen A/S har 90 års erfaring med produktion og salg af gas. Det forpligter. Derfor går vi aldrig på kompromis med kvalitet, sikkerhed og rådgivning.

'701 02 107



Figur 5. Piceidindholdet i 11 danske vinprøver. I alt 4 drue sorter har været undersøgt: Rondo, Castel, Regent og Leon Millot. Samme sort (Rondo) har været undersøgt over 5 år (2002-2006). Samme sort (Rondo) fra tre vingårde er inkluderet i undersøgelsen (Nordlund (NL), Hjelm (HJ) og Skærsøgaard (SK)). Endelig sammenlignes to vine fra marker der har været udsat for forskellig grad af vinskimmel (prøve H og I). Bogstaver i parentes (A-K) svarer til tabel 1. Det lave niveau i prøve C og D kan skyldes oxidation, da propperne ved oplukning var mugne og det antyder, at flaskerne har været utætte.



parten af resveratrolpuljen i de danske rødvine forekommer som *cis*-piceid. Derfor anvendes piceidindholdet i det følgende til at sammenligne de fire variable (figur 5).

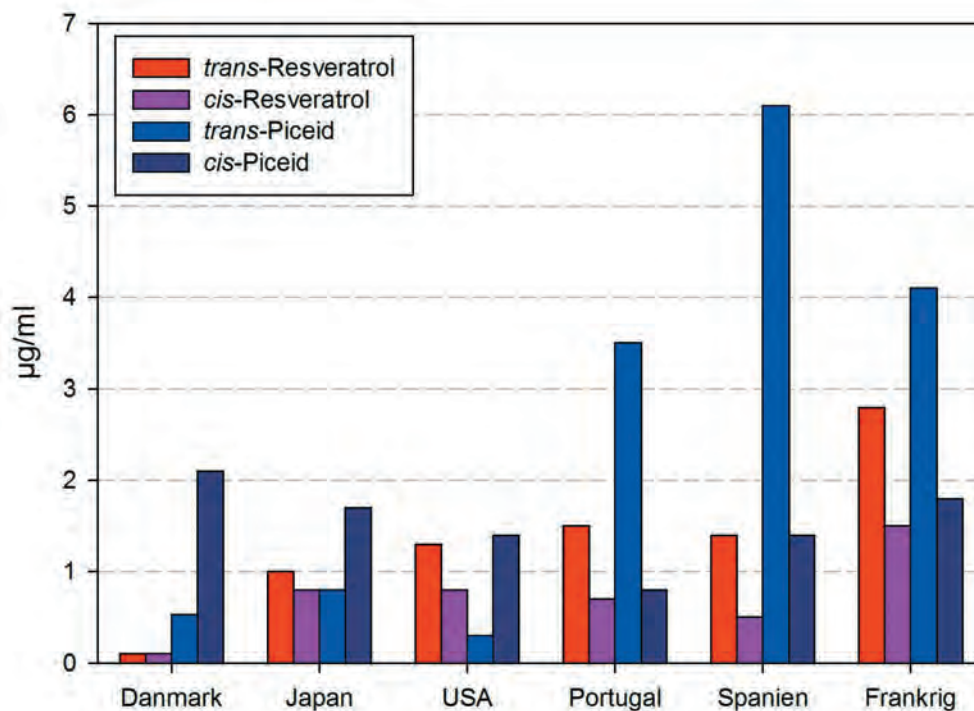
Sammenholdes piceidindholdet med vinens årgang, ses det, at piceidindholdet falder med vinens alder. En sandsynlig forklaring er, at piceid nedbrydes med tiden. Da resveratrolindholdet

ikke stiger, må dette også nedbrydes tilsvarende. Druernes vækstbetingelser for de enkelte årgange på piceidindholdet er en sandsynlig faktor, men dette kan ikke bestemmes ud fra dette spinkle materiale.

Når druesorterne sammenlignes, ses det, at vin fremstillet på Casteldruen (prøve K) har den største mængde piceid og



Figur 6. Gennemsnitsindholdet af resveratrol og piceid i rødvine. Tallene er gennemsnitsværdier beregnet ud fra Stervbo et al. [6] for de respektive lande. Der er således ikke taget højde for årgange, druesorter eller lokaliteter.



Regent mindst (prøve J, ca 50% af Casteldruen). Vin fremstillet af Rondodruen (prøve H) har et piceidindhold imellem de to ydre punkter, men bliver Rondo druen udsat for skimmelsvamp (prøve I) øges piceidindholdet svarende til Casteldruen.

Lokaliteten for dyrkningen af druerne viste en variation for Rondodruen årgang 2005 (figur 5). Vinprøverne fra Nordlund (prøve E) og Skærsøgård (prøve G) indeholder cirka 50% mere piceid, end vinprøven fra Hjelm (prøve F). Dette kan indikere, at geografiske forhold også har en betydning for piceidindholdet men også forskelle i vinfremstillingen kan have betydning for piceidindholdet.

Med udgangspunkt i data fra Stervbo *et al.* [6], har vi sammenlignet sammensætningen af de danske vine med gennemsnitsværdier for udenlandske vine (figur 6). De danske vine indeholder væsentlig mindre resveratrol end gennemsnittet af de udenlandske vine, men total piceidindholdet svarer til gennemsnittet for vine fra USA og Japan, mens vine fra Frankrig, Spanien og Portugal viser væsentlig højere værdier af trans-piceid. Vi må derfor konkludere, at de danske vines resveratrol er meget lavere mens den samlede resveratrolpulje er noget lavere end typisk vinproducerende lande i Sydeuropa. Det lave resveratrol indhold kan både skyldes det kølige og fugtige danske klima men også de sorter, der anvendes ved dansk vinproduktion.

Disse resultater er kun baseret på få prøver, og en mere præcis bestemmelse af resveratrol indholdet i danske vine vil kræve flere bestemmelser og en forbedret analysemetode med en fuldstændig fragmentering af m/z 227 til m/z 185 ved MS².

Disse eksperimenter er blevet udført som et bachelorprojekt i

Kemi ved Roskilde Universitetscenter.

Referencer:

- [1] P. Vitaglione, S. Sforza, G. Galaverna, C. Ghidini, N. Caporaso, P. P. Vescovi, V. Fogliano, R. Marchelli, Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans *Mol. Nutr. Food Res.* 49, (2005) 495-504.
- [2] J. G. Wood, B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S. L. Helfand, M. Tatar, D. Sinclair, Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans *Nature* 430, (2004) 686-689.
- [3] J. A. Baur, K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P. J. Pistell, S. Poosala, K. G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, E. G. Lakatta, C. D. Le, R. J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D. K. Ingram, C. R. de, D. A. Sinclair, Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet *Nature* 444, (2006) 337-342.
- [4] C. Counet, D. Callemien, S. Collin, Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid *Food Chem.* 98, (2006) 649-657.
- [5] R. E. King, J. A. Bomser, D. B. Min, Bioactivity of resveratrol *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, (2006) 65-70.
- [6] U. Stervbo, O. Vang, C. Bonnesen, A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine *Food Chem.* 101, (2007) 449-457.

CAND. SCIENT'ER FÅ FLERE FORDELE?

JA! Se hvordan på
www.candscient.nu

IDA er med flere end 67.000 medlemmer landets største interesseorganisation for tekniske og naturvidenskabelige kandidater. Flere og flere cand.scient.er har allerede opdaget, at de er bedst stillet i IDA. Udover økonomiske fordele som landets formentlig billigste og bedst dækkende forsikringer, får du som medlem adgang til mere end 700 arrangementer årligt, deltagelse i fagtekniske selskaber og meget mere. Brug 5 minutter på www.candscient.nu og læs om alle fordelene. **Velkommen som cand.scient. i IDA.**


VIDEN DER STYRKER