

Er der flest antioxidanter i vin eller rødbedsaft?

Det svar er vi nu et skridt nærmere, efter at vi i et bachelorprojekt har studeret den antioxidative kapacitet i vin sammenlignet med den i rødbedsaft. Den antioxidative kapacitet blev bestemt vha. to kemiske assays: DPPH og FRAP samt ved flow-injection koblet til en elektrokemisk flowcelledetektor (ECD) beregnet til HPLC

Af Biljana Mojsoska, Lukasz Muszala, Lone Ebdrup og Torben Lund, Institut for Natur, Systemer og Modeller, Roskilde Universitet

Rødvin og rødbedsaft (højre glas). Rødbedsaften blev fremstillet af 400 g rødbede tilsat 200 ml vand i en blender. Vin- og rødbedsaft-glassene (~180 ml) indeholder henholdsvis 1.9 og 3.4 mmol ferrocen-ækvivalenter.

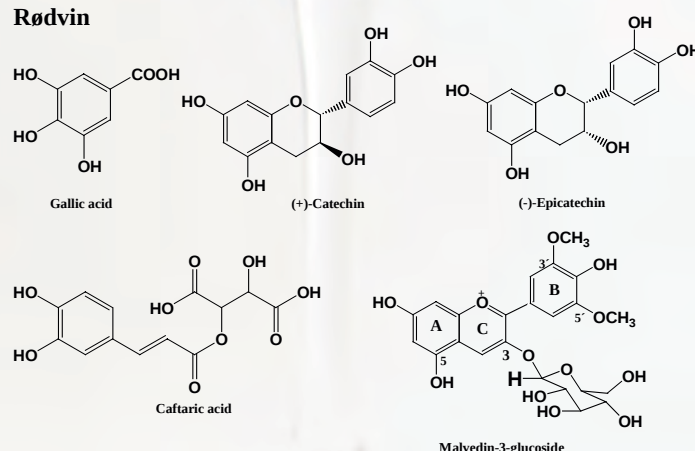
I et bachelorprojekt i kemi på RUC er den antioxidative kapacitet i vin og rødbedsaft sammenlignet [1]. Den antioxidative kapacitet blev bestemt vha. de to kemiske assays DPPH og FRAP samt ved flow-injection koblet til en elektrokemisk flowcelledetektor (ECD) beregnet til HPLC. Vi har ikke i vores litteraturstudier set, at alle tre metoder tidligere er blevet benyttet samtidig.

Der er stor interesse for at finde ud af mere om rødvin og rødbedsafts helbredsfræmmende egenskaber. "Ét glas rødvin om dagen er sundt". De sidste 10-15 år er det blevet postuleret, at kredsløbsrelaterede sygdomme kan modvirkes ved moderat indtagelse af bl.a. rødvin [2]. Rødvins gavnlige virkning på helbredet tilskrives indholdet af forskellige polyphenoler, deriblandt anthocyaniner [3], der også er ansvarlige for vinens røde farve [4]. Polyphenolernes gode antioxidante egenskaber er sandsynligvis en afgørende forklaring på disse stoffers gavnlige virkning. Polyphenolerne og andre antioxidanter reagerer med og inaktiverer reaktive oxygenradikaler såsom $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, $HOO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$ og $NO^{\cdot}$. Derved forhindres skader på DNA, membraner og proteiner.

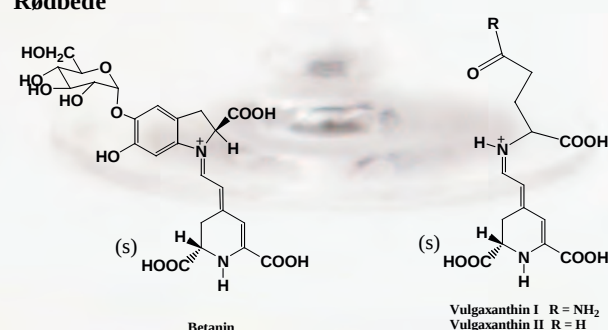
Vi ved, at der er antioxidanter i vin og frugt. De fem almindeligste antioxidanter i rødvin ses i figur 1 [5].

Mindre kendt er det, at rødbeder (*Beta vulgaris*) indeholder nogle meget potente antioxidanter, og at rødbedsaft allerede for en del år siden blev anbefalet til forebyggelse og behandling af kræft [6,7]. Koncentreret rødbedejuice anvendes i fødevarerindustrien som farvestof. Den røde farve i rødbedsaft skyldes stoffer med en helt anden struktur end anthocyaniner i rødvin [8-10]. Rødbedepigmenterne består fortrinsvis af betanin og

Rødvin



Rødbede

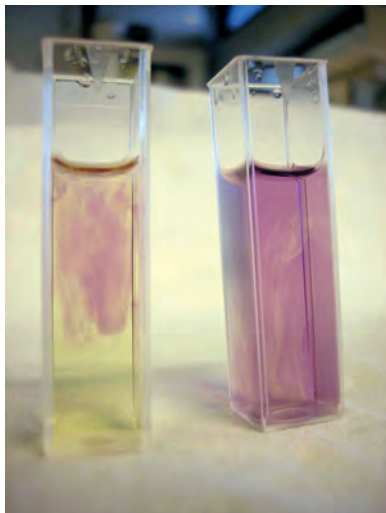


Figur 1. Formler for antioxidanter i vin og rødbedeekstrakt. Malvedin-3-glucosid er den hyppigst forekommende anthocyanin i vin. Isobetanin har R-konfiguration.

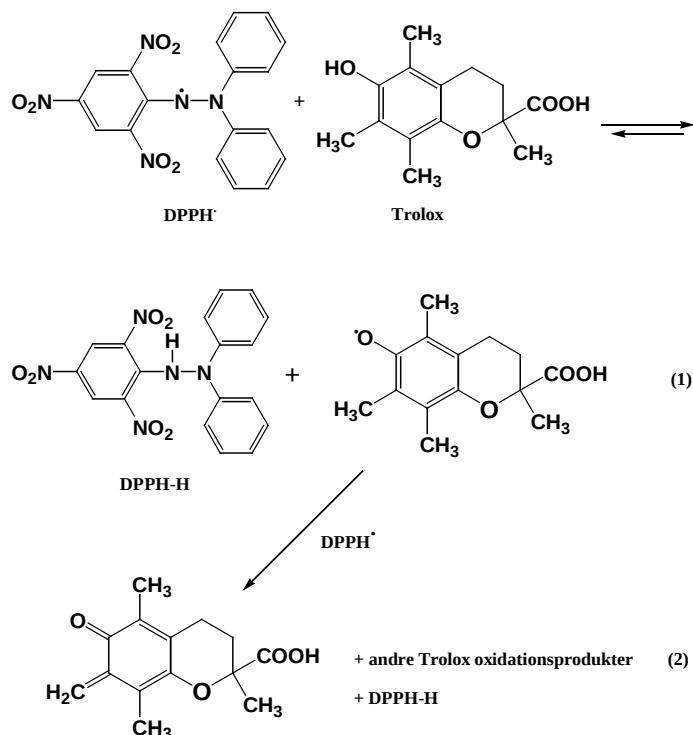
isobetanin med et absorptionsbånd i den synlige del af spektret omkring $\lambda = 535$ nm samt mindre mængder af de gule betaxathiner, vulgaxanthin I og II (figur 1).

En fuldstændig vurdering af en rødvinns antioxidante egenskaber kræver omhyggelige koncentrationsbestemmelser af de mange forskellige komponenter og detaljeret viden om hvert enkelt indholdsstofs reaktionsmekanisme og kinetik ift. specifikke radikaler. Hertil kom-

mer, at stoffernes antioxidante egenskaber kan ændre sig, når de optræder som en del af en kompleks blanding. Det er en meget stor opgave og for at gøre opgaven overkommelig, er der udviklet en række simple kemiske metoder, der kan karakterisere en blandings samlede antioxidante kapacitet udtrykt i ækvivalentkoncentrationer af velkendte antioxidanter såsom vitamin C, vitamin E eller vitamin E-analogen Trolox. En fødevares samlede antioxidante kapacitet kan sammenlignes med en overordnet oplysning som f.eks. en fødevares samlede kalorieindhold.



Figur 2. DPPH-radikalets reaktion med antioxidant-standard Trolox.



Antioxidant kapacitet – DPPH-metoden

Brugen af det stabile violette 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl-radikal til måling af antioxidant aktivitet blev introduceret af



ALSIDENT[®] udsugningssystemer

– gør arbejdsmiljøet renere!

**alsident[®]
system**

www.alsident.com

Finlandsvej 10 • DK-8450 Hammel • Tlf. +45 86 96 50 00

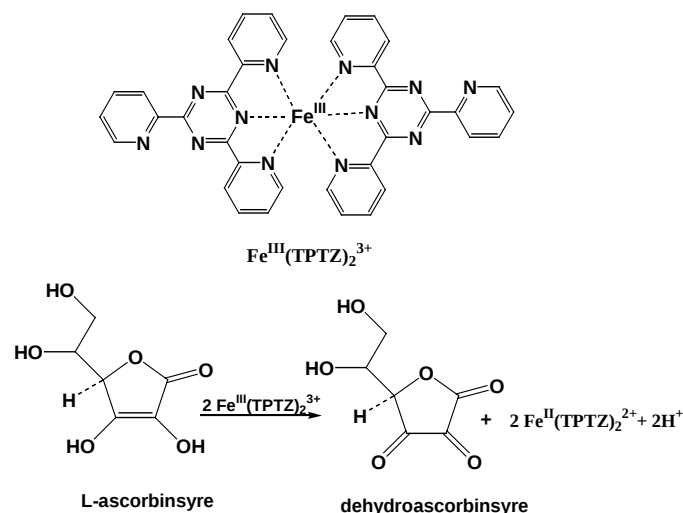
Blois for 50 år siden [11] og er siden blevet et meget populært assay [12,13]. DPPH reagerer ved at abstrahere et brintatom, typisk fra en phenolgruppe i phenolholdige forbindelser under dannelse af et farveløst diphenylhydrazinmolekyle og et phenoxylradikal. Reaktionen kan følges i et UV/Vis-spektrofotometer via affarvningen af DPPH-radikalet. DPPH's reaktion med standarden Trolox er vist i figur 2, hvor to DPPH-radikaler forbruges for hver Trolox-molekyle [14]. Reaktionen forløber inden for 10-15 minutter med $[DPPH] \sim [Trolox] = 1 \mu M$.

I DPPH-metoden måles det, hvor meget antioxidant, der skal tilsættes for at halvdelen af DPPH-radikalerne er reageret efter en valgt tidsgrænse på 30 min. I vores forsøg (udført i methanol) anvendte vi $[DPPH] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$, hvilket svarer til $3 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ DPPH-radikaler i kuvetten. Det giver en startabsorption ved 515 nm på 1,0. Støkiometrien i reaktionen mellem DPPH og Trolox er 2:1, dvs. der skal anvendes $1/2 \times 1/2 \times 3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} = 0,75 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ Trolox for at fjerne 50% af DPPH-radikalerne. Eksperimentelt fandt vi, at der kun skulle bruges $0,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ Trolox. Det er sikkert et udtryk for, at nogle af Trolox-oxidationsprodukterne kan reagere videre med DPPH.

Vin eller rødbedeekstrakts antioxidante kapacitet kan bestemmes ved at undersøge, hvor meget ekstraktet skal fortyndes, før 100 μL af opløsningen kan fjerne 50% af DPPH-radikalerne i kuvetten, bestemt ved at startabsorptionen af DPPH-radikalerne halveres. Dvs. at den ækvivalente antioxidante Trolox-kapacitet i de 100 μL svarer til $0,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ Trolox-ækvivalenter.

FRAP-metoden

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)-metoden [15] måler en opløsnings evne til at reducere det farveløse tripyridyltriazinjern(III)kompleks til det kraftige blå-farvede jern(II)kompleks ($\lambda = 593 \text{ nm}$).

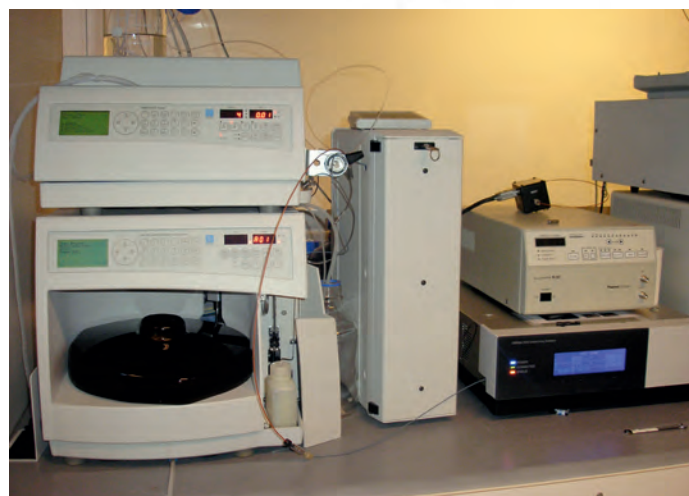
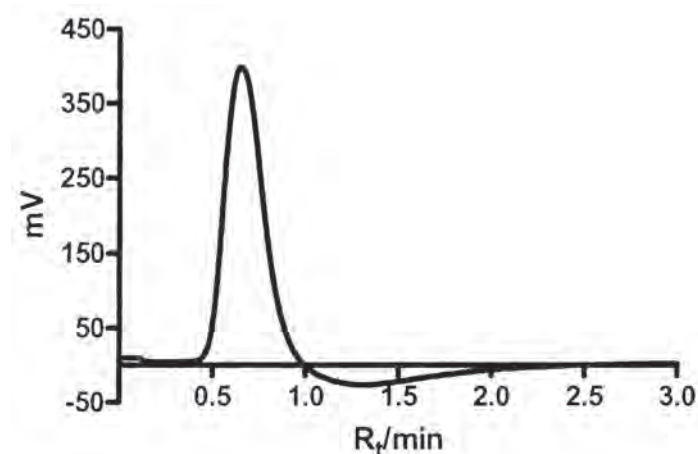


Figur 3. Tripyridyltriazinjern(III)-kompleks (farveløst). Jern(II)-komplekset er blåt.

I figur 3 ses mekanismen for oxidationen af ascorbinsyre med FRAP-komplekset. Polyphenoler med ortho- eller paradisubstituerede phenolgrupper samt betanin oxideres let ($E_{ox} < 0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, pH $\sim 2-3$) [10]. En opløsnings evne til at farve $Fe^{III}(TPTZ)_2^{3+}$ -opløsningen blå kan analogt til DPPH-metoden udtrykkes i c-ækvivalenter, f.eks. i antal mmol ascorbinsyre-ækvivalenter.

FIA-ECD-metoden

I FIA-ECD (Flow Injection Analysis – ElectroChemical Detection) indsprøjtes prøven direkte i en elektrokemisk detektor med efterfølgende måling af oxidationsstrømmen. I forsøget



Figur 4. FIA-ECD-eksperiment. Injektion af 10 μL af en 0,18 mM ferrocen-opløsning. Elektrodepotentiale +0,55 V vs. Ag/AgCl. Mobilfase: $H_2O/ACN/HCOOH/KCl$: 81/17/2/2mM. Flow = 0,3 ml/min. (Oxidationsstrømmen omsat af udstyret til mV). På billedet ses det anvendte apparatur bestående af en HPLC-pumpe, autosampler, DAD-detektor samt den sorte ESA elektrokemiske flowcelle koblet til en Coulchem potentiostat.

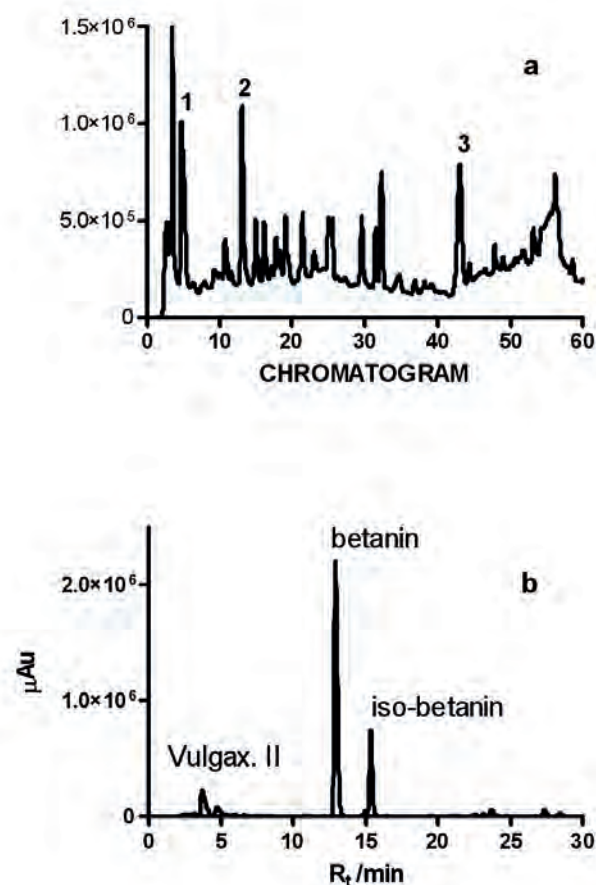
anvendtes en HPLC-pumpe med en autosampler koblet direkte (uden kolonne) til en elektrokemisk flowcelle (ESA-5011) med en porøs grafitelektrode beregnet til HPLC-ECD-målinger.

Ved at sammenligne arealet af en indsprøjet vinprøves oxidationstop med arealet af en ferrocen standardtop, kan vinens oxidative kapacitet udtrykkes som mmol ferrocen-ækvivalenter. I ECD bestemmes prøvens evne til at overføre elektroner til en elektrode, i FRAP måles den tilsvarende evne til at overføre elektroner til en "opløst jernelektrode". ECD og FRAP forventes derfor at give sammenlignelige resultater.

HPLC-analyser af vin og rødbedeekstrakt

I figur 5 vises HPLC-analyser af en Malbec vin og et vandigt rødbedeskrællesekstrakt (60 g skræl ekstraheret med 200 ml vand). Rødbedekromatogrammet (figur 5b) er meget enkelt og består af to dominerende toppe, hvorimod vinkromatogrammet består af et utal af toppe. Hovedtoppen i rødbedeekstraktet stammer fra betanin, der karakteriseres ved et absorptionsmak-

simum på $\lambda = 534$ nm og en $[M^+]$ top ved $m/z = 551$ i elektro-spray massespektret. Toppen ved 15,3 min er isobetanin, mens toppen, der ses ved 3,3 min, har et absorptionsmaksimum ved $\lambda = 468$ nm og en $[M^+]$ top ved $m/z = 325$, hvilket identificerer toppen som vulgaxanthin II. Der er ikke foretaget en tilbunds-gående identifikation af vinens mange forbindelser.



Figur 5. HPLC-UV/Vis-kromatogram af vin (a) og rødbedeskræls ekstrakt (b). De maksimale absorptionsværdier i bølgelængdeområdet 280-800 nm er afbilledet som funktion af tiden i begge kromatogrammer. I rødvin-kromatogrammet identificeres gallic acid (1), caftaric acid (2) og malvidin-3-glucosid (3).

Antioxidant kapacitet af vin og rødbedeekstrakt

De fire vines antioxidante kapacitet adskiller sig ikke væsentligt, selvom de er fremstillet på forskellige druer og er fra forskellige årgange. DPPH-metoden giver ca. 1 mmol Trolox-ækvivalenter pr. liter vin. Det stemmer godt med målinger, som finder værdier mellem 0,89-1,46 mmol [16]. FRAP og ECD giver hhv. 10 mmol ascorbinsyre og 10 mM ferrocen-ækvivalenter. Hvis man bruger billedet af $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2^+$ -komplekset som en "opløst elektrode" med elektrodepotentialet +0,5 V og $n = 2$ for ascorbinsyre, svarer 5 mmol FRAP ascorbinsyre-ækvivalenter til 10 ECD ferrocen-ækvivalenter. Hermed afviger alle FRAP- og ECD-værdierne i tabel 1 kun med en faktor ~2 fra hinanden. Ved brug af FIA-ECD-målinger på en serie forskellige rødvine fandtes en antioxidativ kapacitet på 3,4 mmol catechin-ækvivalenter [17]. Det stemmer overens med vores ECD ferrocen-værdier, når der tages hensyn til at $n = 1$ for ferrocen og 2 for catechin. Det er overraskende, at der for vin ses så

Den rigtige opvaskeløsning kan løse mange forskellige opgaver

Mød os på
Scanlab
stand C2 251



Mieles store opvaskemaskiner kombinerer stor fleksibilitet og stor effektivitet.

Oplagt valg, hvor én eller flere maskiner skal betjene flere laboratorier med forskellige krav.

Og der er mange flere fordele:

- Opfylder de øgede krav til dokumentation, validering og overvågning
- Dokumentation kan udskrives, eller via ethernet overføres til server eller lagres i en åben XLM-fil i en Net-box
- Altid ensartet resultat muligt med ledningsevne-måler LFM, der er integreret i maskinen
- Sikkerhed for optimal rengøring med overvågning af dosering der tager hensyn til vaskemidlets viskositet
- Fleksibel anvendelse med stort udvalg af indsatser
- De største en- eller to-dørsmodel til indbygning

Vores specialister hjælper gerne med at analysere jeres opvaskebehov. Ring 43 27 15 00.

Erhvervsvej 2, 2600 Glostrup,
tlf.: 43 27 15 00, email: professional@miele.dk

Miele
PROFESSIONAL

stor en forskel mellem DPPH- og FRAP/ECD-værdierne, hvilket ifølge vores litteraturundersøgelser ikke tidligere er blevet bemærket eller søgt forklaret. Antioxidanternes brintabstraktionssevne i vin er åbenbart væsentlig mindre end deres samlede evne til at overføre elektroner/protoner i redoxreaktioner.

Vi har målt indholdet af betanin og isobetanin i rødbedeskræl til 3,7 mmol/100 g tørvægt (baseret på en absorptionsmåling af rødbedeekstraktet ved 535 nm og med brug af ekstintionskoefficienten $\epsilon_{\text{Betanin}} = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [9]. Dette tal er ca. en faktor 2 mindre end en værdi på 7,3 mmol/100 g tørvægt [18]. Vi kender ikke støkiometrien for betanins reaktion med $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2^+$ -komplekset; men hvis $n = 2$ kan FRAP-bestemmelsens 5,0 ascorbinsyre-ækvivalenter direkte omsættes til mmol betanin, hvilket er relativt tæt på vores egen UV/Vis-bestemmelse på 3,7 mM betanin. Vores DPPH-værdier for rødbedeskræl er overraskende høje; men kan muligvis forklares ved, at betanin kan fjerne endnu flere DPPH-radikaler end Trolox. I linoleat peroxidationsmetoden er betanin en ca. 12 gange mere effektiv antioxidant end E-vitamin, som minder om Trolox [9].

I vores undersøgelse og i de fleste af litteraturreferencerne foretages kapacitetsmålingerne ved pH 2-4. Anthocyaninernes farve og struktur afhænger af pH (røde fra 2-4), mens polyphenolerne på phenolatform (pH > 8-10) er stærkere antioxidant end de fuldt protonerede former. pH spiller således en stor rolle for forskellige stoffers antioxidante kapacitet.

Konklusion

DPPH-, FRAP- og ECD-målingerne giver meget forskellige ækvivalensværdier og svaret på, om man indtager mest antioxidant kapacitet ved at spise 100 g tørret rødbedeskræl eller



Foto: Michael Barrett Boesen

Antioxidant kapacitetsmetode	DDPH	FRAP	ECD
Prøver	Trolox eq. mmol	Ascorbinsyre eq. mmol	Ferrocen eq. mmol
Argento Malbec 2007 ^a	0,97	10,2	9,1
Argento Merlot	0,96	9,1	9,7
Argento Carbenet Sauvignon	1,00	10,8	9,7
Aigle Noir Pinot Noir 2006	0,97	9,1	12,9
Gennemsnit af 1 liter vin	0,97	10,0	10,3
Rødbedeskræl ^b (100 g våd vægt)	3,6	0,6	2,7
Rødebedesræl (100 g tør vægt) ^c	31	5	22

^a 1 liter vin. ^b Rødbedeskrællen udgør ca. 30% af rødbedens samlede vægt.

^c Tørvægt = 11,6 % af vådvægt rødbedeskræl.

Tabel 1. Antioxidant kapacitet af fire rødvine og rødbedeekstrakt bestemt ved DPPH-, FRAP- og ECD-metoderne. DPPH-målingerne er udført i metanol. FRAP og ECD ved pH henholdsvis 3,6 og ~3.

drikker 1 liter vin afhænger stærkt af valg af metode. DPPH-, FRAP- og ECD-målingerne indikerer, at man skal drikke et vandekstrakt af hhv. 27, 1700 og 380 g rødbedeskræl for at opnå samme indtag af antioxidativ kapacitet som af 1 L vin. Om et glas rødbedesaft er sundere end et glas vin om dagen, kan undersøgelserne ikke afgøre. Det er ca. 10 gange billigere beregnet ud fra ECD-målingerne at dække sit antioxidantbehov ved at drikke rødbedesaft – men om det er sjovere er tvivlsomt?

E-mail-adresser

Torben Lund: tlund@ruc.dk

Biljana Mojsoska: biljana@ruc.dk

Referencer

1. B. Mojsoska, L. Muszala, L. Ebdrup. Bachelor project RUC, Dec. 2008.
2. M. I. Covas, P. Gamber, M. Fito, and R. De la Torre. *Atherosclerosis* 208 (2):297-304, 2010.
3. G. J. Mazza. *Anthocyanins and heart health. Ann.Ist.Super.Sanita* 43 (4):369-374, 2007.
4. I. L.F. Nielsen, S. E. Nielsen, L. Dragsted, C. Cornett, *Dansk Kemi*, 11 (2001) 20-23.
5. N. Landrault, P. Pocher, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros, P-L. Teissedre, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3341-3348.
6. A. Ferenczi, *Zeitschrift für die gesamte inner Medizin und ihre Grenzgebiete* 14 (1959) 408.
7. G. J. Kapadia, H. Tokuda, T. Konoshima, H. Nishino, *Cancer Letters* 100 (1996) 211-214.
8. T. Pedersen, *Dansk Kemi* 80 (1999) 48-49.
9. J. Kanner, S. Harel, R. Granit, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5178-5185.
10. D. Butera et. al. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6895-6901.
11. M.S. Blois, *Nature*, 181 (1958) 1199-1200.
12. P. Molyneux, Songklanakarin *J. Sci. Technol.* 26 (2004) 211-219.
13. O. P. Sharma, T. K. Bhat, *Food Chemistry* 113 (2009) 1202-1205.
14. O. Friaa, D. Brault, *Org. Biomol. Chem.* 4 (2006) 2417-2423.
15. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Biochemistry* 239 (1996) 70-76.
16. A. Arnous, D. P. Makris, P. Kefalas, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5736-5742.
17. S. Mannino, O. Brenna, S. Buratti, M. S. Cosio, *Electroanalysis* 10 (1998) 908-912.
18. T. S. Kujala, J. M. Lopenon, K. D. Klika, Kalevi Pihlaja, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), 5338-5342.