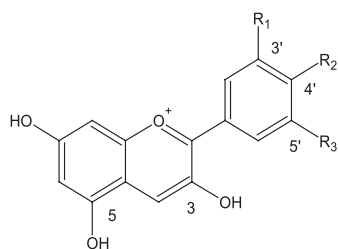


Anthocyaniner og bærsaft

Fødevaredirektoratet forsøger sammen med forskere fra andre EU-lande at dokumentere de sundhedsfremmende effekter af bærsaft samt at undersøge muligheden for at fremstille en saft med optimale funktionelle egenskaber

Af Inge Lise F. Nielsen, ilfn@fdi.dk, Salka E. Nielsen, sen@fdi.dk, Lars Dragsted, lod@fdi.dk og Claus Cornett, cc@dfh.dk



	R ₁	R ₂	R ₃
Cy	OH	OH	H
Dp	OH	OH	OH
Mv	OMe	OH	OMe
Pg	H	OH	H
Pn	OMe	OH	H

Figur 1.
Cy = Cyanidin,
Dp = Delphinidin,
Mv = Malvidin,
Pg = Pelargonidin,
Pn = Peonidin.

Anthocyaniner (figur 1) hører til en stofgruppe af polyphenoler, kaldet flavonoider og udgør de røde og blå farver i mange bær og frugter. Disse stoffer er meget potente antioxidant og kan derfor bl.a. være involveret i den beskyttende virkning, rødvin muligvis har mod hjerte/kar-sygdomme [1]. Da stofferne findes i mange andre bær og frugter end røde druer, vil det sandsynligvis være muligt at fremstille en alkoholfri saft ud fra bær med et højt indhold af anthocyaniner, der har samme beskyttende potentiale mod hjerte/kar-sygdomme som rødvin. Denne saft vil være et sundere alternativ for forbrugeren, idet den gavnlige effekt bibeholdes, mens alkohols skadelige bivirkninger undgås.

Anthocyaniners effekt

Epidemiologiske undersøgelser har vist en korrelation mellem et højt indtag af frugt og grønt og reduceret risiko for kræft- og hjerte/kar-sygdomme. Der er dog uenighed om årsagen til denne effekt. Undersøgelser foretaget i lande, hvor en stor del af flavonoidindtaget kommer fra anthocyaninrige levnedsmidler i form af vin, frugt og grønt, tyder på, at anthocyaninerne har en effekt mod hjerte/kar-sygdomme. Dette forhold ses i Finland [8], Holland [4,7] og adskillige lande med et højt forbrug af vin [3]. I modsætning til dette er der ikke set en signifikant beskyttende effekt af flavonoider mod hjerte/kar-sygdomme ved undersøgelser i USA [12], og der blev ikke observeret nogen effekt ved undersøgelser i Wales [4], hvor hovedindtaget af flavonoider stammer fra sort the, der ikke indeholder anthocyaniner.

Undersøgelser tyder på, at anthocyaniner, ud over deres antioxidant effekt [2], hæmmer lipidoxidation [10], har antihypertensive virkninger [11] og generelt har en meget lav systemisk toksicitet [6]. Alle disse faktorer kunne tyde på, at en nærmere undersøgelse af anthocyaniners biologiske virkninger, biotilgængelighed, metabolisering og antioxidative virkninger kan føre til dokumentation for og større forståelse af anthocyaniners betydning for dyr og mennesker samt deres mulige beskyttende virkning bl.a. mod hjerte/kar-sygdomme.

En af forfatterne (ILFN) udfører et ph.d.-projekt med titlen »Anthocyaniners optag, metabolisme og udskillelse«, som en del af et EU-projekt »Anthocyanin bioactivities: Functional properties, bioactivities and bioavailability of phytochemicals, especially anthocyanins, from processed foods«. EU-projektet udføres som et samarbejde mellem otte forskergrupper fra seks forskellige EU-lande. EU-projektets formål er opridset i boks 1. Ph.d.-projektets formål er primært vha. HPLC, LC-MS og NMR at udvikle metoder til identifikation og kvantisering af anthocyaniner og deres metaboliseringsprodukter i plasma og urin. I den forbindelse foretages følgende undersøgelser:

- Undersøgelse af metaboliseringen af anthocyaniner *in vitro*.

Boks 1

EU-projektet »Anthocyanin Bioactivities: Functional properties, bioactivities and bioavailability of phytochemicals, especially anthocyanins, from processed foods«.

De primære formål er at:

- Undersøge de funktionelle virkninger af anthocyaniner og anthocyaninholdige fødevarer.
- Undersøge anthocyaniners virkning på udvikling af hjerte/kar-sygdomme hos mennesker.

De sekundære formål er at:

- Fremstille en juice af røde/blå bær med et højt indhold af anthocyaniner, som et alkoholfrit alternativ til rødvin.
- Danne basis for udvikling af »functional foods« indeholdende anthocyaniner ud fra undersøgelser af anthocyaniner og anthocyaninholdige fødevarers fysiske-kemiske egenskaber.
- Undersøge virkningen af anthocyaniner vha. *in vitro* studier og dyreforsøg.
- Undersøge effekten af anthocyaniner og anthocyaninholdige fødevarer på dannelsen af atherosclerose (åreforkalkning) i dyr.
- Vurdere resultaterne fra *in vitro*- og dyreforsøgene i relation til mennesker vha. et kontrolleret humanforsøg med diæter med højt og lavt indhold af anthocyaniner.

- Undersøgelser af optaget og udskillelsen af anthocyaniner i dyr (rotte og kanin).
- Udviklingen af en biomarkør for anthocyaninindtaget i humanstudier med anthocyaninholdig kost.
- Undersøgelse af human udskillelse og metabolisering af anthocyaniner.

Metoder og resultater

Det viste sig nødvendigt at udvikle helt nye metoder til analyse af anthocyaniner, idet der ikke var tilfredsstillende metoder tilgængelige.

Metoder til analyse af plasma og urin tilsat (spiked med) anthocyaniner er udviklet. Disse metoder indebærer fastfase-ekstraktion på C-18 kolonner efterfulgt af HPLC-analyse med kolonneskift. Yderligere er der udviklet metoder til LC-MS-analyse i forskellige matricer (plasma, urin). Sidst, men ikke mindst, er der udviklet en forenklet, forbedret og hurtigere analysemetode til brug ved analyse af anthocyaniner i bærsaft (boks 2 og figur 4, side 23)[13]. Tidligere metoder tog væsentligt længere tid, idet de var udviklet til at bestemme andre flavonoider i samme analysegang.

Analyse og opbevaring af anthocyaniner er ikke helt let, da anthocyaniner er meget ustabile (figur 2, side 22) og kan findes

Definition

Biotilgængelighed: Andel af det doserede stof der optages fra mave-tarm kanalen.

på mange forskellige former (figur 3, side 22), både farvede og farveløse, afhængigt af pH, hvorved de enkelte stoffer let kan overses eller nedbrydes under analysen.

Der foreligger desværre ikke meget litteratur om anthocyaninernes stabilitet, så det var nødvendigt at udføre en del stabilitetsundersøgelser, bl.a. for at fastlægge prøvehåndteringsbetingelserne (håndtering og opbevaring). Stabiliteten blev derfor undersøgt i forskellige matricer og under forskellige fysiske betingelser vha. ovenstående HPLC-metode til bestemmelse af anthocyaniner i bærsaft. Derudover er der langtidsundersøgelser i gang. Som det tydeligt fremgår af figur 2, er det en god ide at opsamle og opbevare stofferne i et surt miljø inden analysen.

Metabolismestudierne *in vitro* udførtes bl.a. med henblik på at kunne forudsige, hvilke metabolitter der muligvis kan findes ved *in vivo* studierne. Disse studier af metabolisering vha. rottelevermikrosomer vanskeliggjordes af, at NADPH, der

Boks 2

HPLC-analysemetode til brug ved analyse af anthocyaniner i bærsaft.

Prøveforberedelse:

- Standarder: 1 mg/mL i 10% vandig myresyre, 10% Acetonitril, aflæst pH 1,75
- Analyser: 10% vandig myresyre, 10% Acetonitril, aflæst pH 1,7

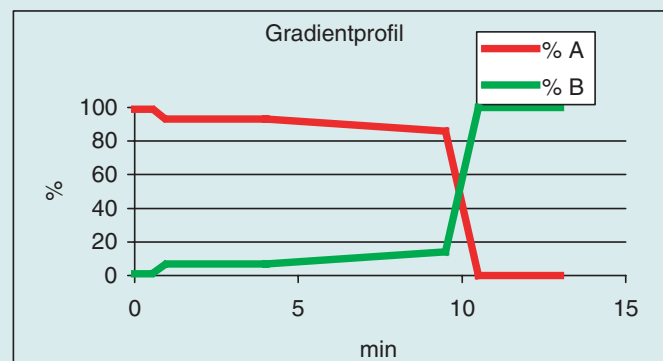
Udstyr:

Agilent HP 1090 HPLC med en Agilent HP 1100 UV/Vis-detector. 250 µL injectionsloop. Agilent Zorbax SB-C18 kolonne, 4,6x150 mm, partikelstørrelse 5 µm. Agilent C-18 4x4 mm forkolonne, partikelstørrelse 5 µm.

Analysebetingelser:

Der anvendes et binært gradientsystem. Mobilfase A er myresyre:vand 1:9, pH = 1.6. Mobilfase B Acetonitril. Gradientprofil: 0-0,5 min: 1% B; 0,5-1 min lineær gradient fra 1 til 7%. 1-4 min 7% B; 4-9,5 min lineær gradient fra 7 til 14% B; 9,5-10,5 min: lineær gradient fra 14 til 100% B;

10,5-13 min 100% B (vask af kolonne), se figur. Flowhastighed 1 mL/min med helium-gennembobling af de mobile faser. Samtidig detektion ved 290, 350 og 520 nm med peak scanning mellem 210 og 700 nm i 2 nm trin. Reference ved 650±50 nm.



Kvantiseringsgrænse for anthocyaniner i juice er under 0.06 mg/L for dette system.

Eksempler på chromatogrammer ses i figur 4, side 23.

Valideringsresultater.

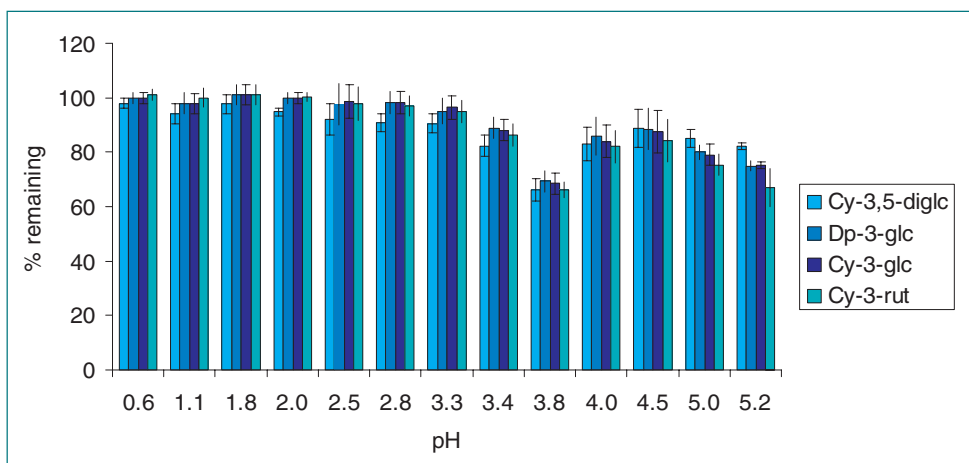
	Cy-3-glc	Cy-3-rut	Dp-3-glc	Dp-3-rut	Cy-3,5-diglc
LOD ^a (mg/L)	0.018	0.009	0.015	0.013	0.011
LOQ ^b (mg/L)	0.060	0.030	0.051	0.043	0.036
Lineært område ^c (mg/L)	0.1 - 16	0.1 - 16	0.1 - 16	0.1 - 16	0.1 - 16
Lineær regression ^d	y = 426.0 x - 15.05	y = 528.3 x - 4.51	y = 346.9 x + 41.12	y = 388.2 x - 3.99	y = 480.4 x + 28.57
Standardafvigelse på hældning	3.544	3.301	2.854	4.260	2.397
Standardafvigelse på skæring	34.243	33.519	27.568	43.257	23.156
Standardfejl	108.70	101.06	87.52	130.42	73.51
r-værdi	0.9992	0.9997	0.9993	0.9990	0.9997
Intradag var. (%CV) n=10	0.23	0.23	0.40	0.30	0.44
Interdag var. (%CV) n=4	0.20	0.75	0.48	0.22	1.23

a: Bestemmelsesgrænse, Limit Of Detection, signal-støj-forhold = 3.

b: Kvantiseringsgrænse, Limit Of Quantitation, signal-støj-forhold = 10.

c: Lineært område bestemt indenfor de testede koncentrationer.

d: Lineær regression på det lineære område (y = topareal, x = mg/L injiceret)



Figur 2. Stabilitet af anthocyaniner i vandig opløsning ved forskellige pH-værdier. Stofferne blev inkuberet ved de anførte pH-værdier i 24 timer ved 21°C, hvorefter pH blev justeret til 1.7 og derefter øjeblikkeligt analyseret ved hjælp af HPLC-metoden (box 2).

Cy-3,5-diglc = cyanidin-3,5-di-O-glucosid, Dp-3-glc = delphinidin-3-O-glucosid, Cy-3-glc = cyanidin-3-O-glucosid, Cy-3-rut = cyanidin-3-O-rutinosid (se figur 1 for strukturformler).

bruges til at initiere mikrosomerne, nedbryder anthocyaninerne momentant.

Optaget og udskillelsen i dyr studeres vha. Watanabe kaniner, der er prædisponeret for hjerte/kar-sygdomme (Watanabe heritable hyperlipidemia: WHHL). Det første studie blev udført som et 48 timers biokinetik-studie med 20 WHHL-kaniner fordelt på 4 hold. Holdene blev fodret én gang via sonde med enten placebo, et rent anthocyanin fra solbær eller et anthocyaninmix svarende til solbær eller solbærjuice. Over de følgende 48 timer blev der løbende udtaget plasma-, urin- og fæcesprøver. Da der blev fundet uomdannet anthocyanin i urinprøverne, må en del af anthocyaninen være blevet optaget.

For at undersøge anthocyaniners indflydelse på udviklingen af atherosclerose og biomarkører for hjerte/kar-sygdomme samt at bestemme steady state-koncentrationer af anthocyaniner i plasma og urin, er endnu et kaninstudie i gang. 90 WHHL-kaniner doseres enten med placebo, et solbær-anthocyanin, solbær-anthocyaninmix, C-vitamin i den koncentration der findes i saften eller et lægemiddel med cholesterolsænkende virkning. Dyrene doseres gennem foderet eller drikkevandet over en periode på 16 uger. Der tages løbende prøver af urin og plasma til bestemmelse af anthocyanin- og metabolit-koncen-

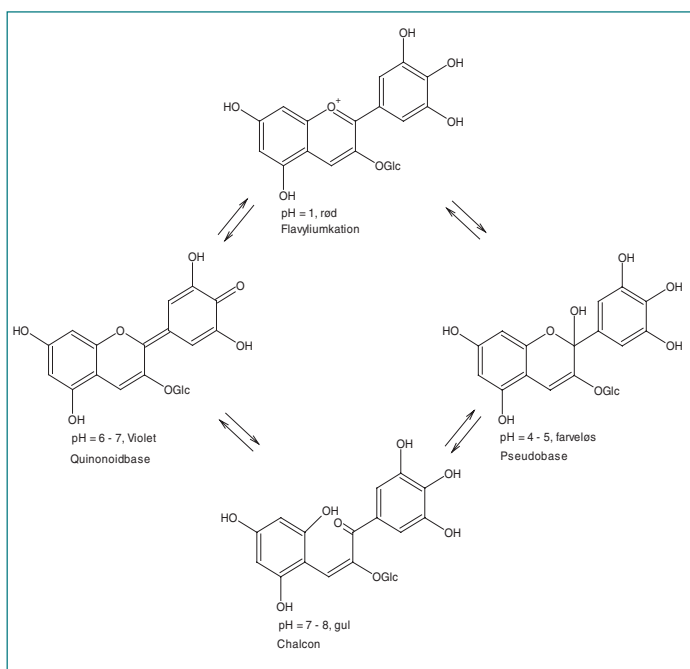
trationer samt til forskellige antioxidantparametre og måling af kolesterol. Efter 16 ugers dosering aflives dyrene, og de forskellige doseringers indflydelse på aflejringen af kolesterol i aorta bestemmes.

En af EU-partnerne udfører et forsøg med dosering af anthocyaniner til E-vitamin deficiente rotter, da E-vitamin har indflydelse på udviklingen af hjerte/kar-sygdomme.

En anden EU-partner udfører et pilotprojekt med op til 10 frivillige forsøgspersoner med henblik på at undersøge optagelse og metabolisering af anthocyaniner i mennesker. Forsøgspersonernes plasma og urin analyseres for anthocyaninindhold. Udskillelsen af anthocyaninerne og deres metabolitter analyseres vha. de udviklede HPLC- og LC-MS-metoder. Et forforsøg har indikeret, at 0,2% af den indtagne mængde anthocyanin udskilles uomdannet i urinen.

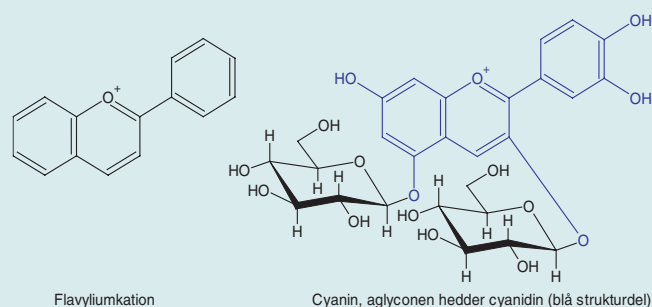
Ud fra resultaterne vælges en biomarkør enten i plasma eller urin til indikation af optagelsen af anthocyaniner, hvorefter der skal udføres et stort humanforsøg af andre partnere i EU-projektet.

Desuden er der udført et humanforsøg i samarbejde med KVL og Chr. Hansen med henblik på at bestemme udskillelsen af anthocyaniner fra rødvin via urin. Tidligere er der udført

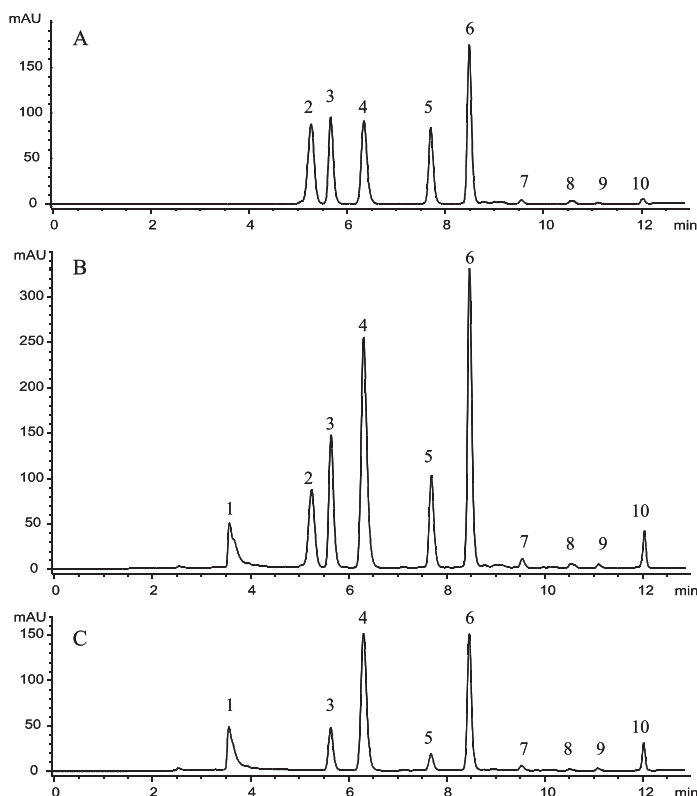


Figur 3. Struktur af anthocyaniner ved forskellige pH-værdier med delphinidin-3-O-glycosid som eksempel.

Anthocyaniner



Polyphenoler afledt af flavyliumionen benævnes anthocyanidiner, anthocyanidinglykosider benævnes anthocyaniner. Anthocyaniner er ansvarlige for mange af de røde og blå farver i højere planter. Farver forårsaget af anthocyaniner afhænger af deres kemiske struktur, pH, kompleksdannelse med metalioner, koncentrationsforhold samt tilstedeværelsen af andre stoffer.



Figur 4. HPLC-chromatogrammer med detektion ved 520 nm af
A: En vandig opløsning af (2): cyanidin-3,5-di-O-glucosid (Cy-3,5-diglc), (3): delphinidin-3-O-glucosid (Dp-3-glc), (4): delphinidin-3-O-rutinosid (Dp-3-rut), (5): cyanidin-3-O-glucosid (Cy-3-glc) og (6): cyanidin-3-O-rutinosid (Cy-3-rut) (se figur 1 for strukturformler).
B: Solbærsaft tilsat (spiked) Cy-3,5-diglc, Dp-3-glc, Dp-3-rut, Cy-3-glc og Cy-3-rut.
C: Solbærsaft. Arealerne af stof 2-5 svarer til hhv. 0.80, 3.20, 0.30, 1.71 mg/L. Top 1, 7-10 er indtil videre ikke identificeret.

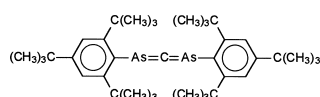
undersøgelser med drueskalsekstrakt, givet til raske forsøgspersoner i et overkrydsningsstudie [14], hvor en mulig interaktion med vitamin C blev påvist. På det tidspunkt var der endnu ikke udviklet en biomarkør for anthocyaniner.

Referencer

1. M. Gronbaek, U. Becker, D. Johansen, A. Gottschau, P. Schnohr, H.-O. Hein, G. Jensen, T. Sorensen. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann. Intern. Med.* 2000 Sep 19; 133(6): 411-9
2. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* 61(21),2103-10.
3. Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., and et al (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study [published erratum appears in *Arch Intern Med* 1995 Jun 12;155(11):1184]. *Arch.Intern.Med.* 155, 381-386.
4. Hertog, M.G., Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C., and Kromhout, D. (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 65, 1489-1494.
5. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollmann, P.C.H., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.
6. JECCA (1982). Toxicological evaluation of certain food additives. WHO Tech. Rep. Series 683, 42-49.
7. Keli, S.O., Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., and Kromhout, D. (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: The Zutphen study. *Arch.Intern.Med.* 156, 637-642.
8. Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., and Maatela, J. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Br.Med.J.* 312, 478-481.
9. Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., Kanner, J. (1998) Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As Detected in Human Urine. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4297-4302.
10. Laplaud, P.M., Lelubre, A., Chapman, M.J. (1997) Antioxidant action of Vaccinium myrtillus extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. *Fundam Clin Pharmacol.* 11, 35-40.
11. Pourrat H. (1977) Drogues a anthocyanes et maladies vasculaires. *Plant. Med. Phytother.* 11 (spec. no.), 143-151.
12. Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. (1996) Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Annals of Internal Medicine* 125, 384-389.
13. I.L.F. Nielsen, L.O. Dragsted, S.E. Nielsen. Indsendt til *J. Chrom. A*.
14. Young, J.F., Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Lauridsen, S.T., Hansen, M., and Sandstrom, B. (2000) The effect of grape skin extract on oxidative status. *Br.J.Nutr.*, 84, 505-513.

Nyt om alkener med arsen

Man har fremstillet organiske forbindelser svarende til alkener, hvor dobbeltbindingerne fra carbon går til andre elementer end carbon. Det sidste nye er forbindelser med arsen, se figur.



Når substituenterne er store grupper, er forbindelsen, som er et krystallinsk stof, stabilt.

Carl Th.

The First Diarsallene, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (2000): 12880.

Wedgewood Technology
INSTRUMENTS

In-line Fotometre

Væskeanalyse baseret på måling af lysabsorption med synligt lys, infrarødt lys og ultraviolet lys, samt måling af lysreflektion og fluorescens.

Koncentration •
Farve •
Turbiditet •
Opslemmede partikler •

Monteres med sensorer til in-line måling eller neddykning.

CONTECH Instrumentering ApS • Hans Edvard Teglers Vej 5
DK-2920 Charlottenlund • Tlf. +45 39 903 905 • Fax +45 39 903 915
Home page: www.contech.dk • e-mail: contech@contech.dk

CONTECH
INSTRUMENTERING