



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp  
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Betalainer i beter (*Beta vulgaris*) – utvikling av analysemetodikk og kartlegging av betalainer i betesorter**

Betalains in beets (*Beta vulgaris*) – development of  
analysis method and the mapping of betalains in  
beet cultivars

Anette Lie Brandsnes  
Masterprogrammet i kjemi



# Innholdsfortegnelse

<b>INNHALDSFORTEGNELSE .....</b>	<b>I</b>
<b>FORORD .....</b>	<b>V</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>VI</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUKSJON.....</b>	<b>1</b>
1.1    FYTOKJEMIKALIER I FRUKT OG GRØNNSAKER .....	1
1.2    FARGESTOFFER I MAT .....	1
1.3    BETALAINER .....	2
1.4    BETER .....	6
1.5    ANALYSEMETODER FOR BETALAINER .....	7
1.5.1 <i>Væskekromatografi</i> .....	7
1.5.1.1    HPLC og UHPLC .....	8
1.5.1.2    Reversfasekromatografi.....	8
1.5.1.3    Kinetex kolonner .....	8
1.5.2 <i>Spektrofotometri</i> .....	9
1.5.3 <i>Massespektrometri</i> .....	10
1.5.3.1    Elektrosprayionisering.....	10
1.5.3.2    Kvadrupol .....	11
1.5.3.3    Time of Flight.....	12
1.5.3.4    Detektor .....	12
1.6    PRØVEOPPARBEIDELSE .....	12
1.6.1 <i>Frysetørking</i> .....	12
1.7    KVALITATIV OG KVANTITATIV ANALYSE AV BETALAINER MED LC-MS OG SPEKTROFOTOMETER .....	13
1.8    PROBLEMSTILLING .....	13
<b>2. MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>14</b>
2.1    INSTRUMENTER.....	14
2.1.1 <i>Homogenisator</i> .....	14
2.1.2 <i>Sentrifuge</i> .....	14
2.1.3 <i>Frysetørker</i> .....	14
2.1.4 <i>Spektrofotometer</i> .....	14
2.1.5 <i>pH-meter</i> .....	14
2.1.6 <i>Vakuummaskin</i> .....	14

## Innholdsfortegnelse

2.1.7	<i>Andre instrumenter</i> .....	14
2.1.8	<i>HPLC/HPLC-MS</i> .....	14
2.2	UTSTYR .....	15
2.3	KJEMIKALIER .....	16
2.3.1	<i>Tillaging av mobilfaseløsninger</i> .....	16
2.3.2	<i>Ekstraksjonsløsemiddel</i> .....	16
2.3.3	<i>Betaninstandard</i> .....	16
2.3.4	<i>Internstandard</i> .....	17
2.4	FREMANGSMETODE FOR PRØVEOPPARBEIDELSE .....	18
2.4.1	<i>Prøveopparbeidelse av beter til forsøk uten lagring (metode 1)</i> .....	18
2.4.2	<i>Prøveopparbeidelse til lagringsstudier, holdbarhetsstudier og ekstraksjonseffektivitet (metode 2)</i> .....	18
2.4.3	<i>Prøveopparbeidelse til betesortforsøk (metode 3)</i> .....	19
2.5	FREMANGSMETODE FOR EKSTRAKSJON .....	19
2.5.1	<i>Ekstraksjon av ferske prøver (ekstraksjonsmetode 1)</i> .....	19
2.5.2	<i>Ekstraksjon av frysede prøver (ekstraksjonsmetode 2)</i> .....	20
2.5.3	<i>Ekstraksjon av frysetørkede prøver (ekstraksjonsmetode 3)</i> .....	20
2.5.4	<i>Tillaging av HPLC-vials</i> .....	20
2.6	ANALYSE .....	20
2.6.1	<i>Analyse med spektrofotometer</i> .....	20
2.6.2	<i>HPLC analyse</i> .....	21
2.6.3	<i>MS metodeinnstillinger</i> .....	23
2.7	VALIDERING AV METODEN .....	24
2.8	BEREGNINGER OG STATISTIKK .....	24
<b>3.</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>25</b>
3.1	METODEUTVIKLING .....	25
3.1.1	<i>Referanser og standarder</i> .....	25
3.1.1.1	Betaninstandard .....	25
3.1.1.2	Internstandard PAH .....	27
3.1.2	<i>Etablering av ekstraksjonsmetode for betalainer i beter</i> .....	30
3.1.2.1	Homogenisering .....	30
3.1.2.2	Sentrifugering .....	30
3.1.2.3	Løsemiddel/bete-ratio .....	31
3.1.2.4	Blandingsforhold mellom metanol og vann i løsemiddel .....	31
3.1.2.5	Internstandard i ekstrakter med ulike mengder meOH i løsemiddelet .....	32
3.1.3	<i>Tilpassing av HPLC-gradient og mobilfaser</i> .....	34
3.1.3.1	Mobilfaser og gradient .....	34
3.1.3.2	Kolonnetemperatur .....	36

## Innholdsfortegnelse

3.1.3.3	Injeksjonsvolum og flow .....	36
3.1.3.4	Kontaminering mellom prøver kjørt etter hverandre i HPLC-sekvensen.....	37
3.2	KVALITATIV ANALYSE AV BETALAINER I BETER .....	37
3.2.1	<i>Identifisering ved sammenligning med kommersiell betaninstandard.....</i>	37
3.2.2	<i>Sammenligning av gulbete og rødbete .....</i>	38
3.1	MS ANALYSE AV RØDBETE.....	40
3.2	STABILITET AV PRØVEMATERIALE OG EKSTRAKTER .....	45
3.2.1	<i>Stabilitet av betalainer i beter som råvare ved forskjellige fryselagringsbetingelser .....</i>	45
3.2.2	<i>Stabilitetsforsøk med senket pH.....</i>	47
3.2.2.1	Stabilitet av rødbeteekstrakter 0-2 dager.....	47
3.2.2.2	Stabilitet av rødbeteekstrakter 0-6 dager.....	48
3.2.2.3	Ekstraksjonsreproduserbarhet dag 0.....	49
3.2.3	<i>HPLC-analyse av ekstrakter lagret mørkt og kjølig.....</i>	50
3.3	KVANTITATIV ANALYSE AV FORSKJELLIGE BETESORTER.....	52
3.3.1	<i>Betalaininnhold i ulike betesorter.....</i>	53
3.3.1.1	Bestemmelse av vanninnhold i bete .....	53
3.3.1.2	Beregning av betalainer i tørrvekt bete.....	54
3.3.1.3	Betacyanininnhold.....	64
3.3.1.4	Betaxanthininnhold.....	64
3.3.2	<i>Biologisk variasjon mellom individer av samme sort .....</i>	66
3.3.2.1	Betacyanininnhold i enkeltindivider.....	66
3.3.2.1.1	Gulbete .....	66
3.3.2.1.2	Polkabete .....	67
3.3.2.1.3	Forbrukerrødbete.....	68
3.3.2.1.4	Industrirødbete .....	68
3.3.2.1.5	Oppsummering av individanalysen - betacyanin .....	69
3.3.2.2	Mengde betaxanthin i ulike individer av samme sort.....	69
3.3.2.2.1	Gulbete .....	69
3.3.2.2.2	Polkabete .....	70
3.3.2.2.3	Forbrukerrødbete.....	70
3.3.2.2.4	Industrirødbete .....	71
3.3.2.2.5	Oppsummering av individanalysen – betaxanthin .....	71
3.3.2.2.6	Oppsummering innhold av betalainer i fire sorter beter .....	71
4.	<b>KONKLUSJON.....</b>	<b>73</b>
5.	<b>VIDERE ARBEID.....</b>	<b>74</b>
6.	<b>REFERANSELISTE.....</b>	<b>75</b>
7.	<b>APPENDIKS.....</b>	<b>80</b>
7.1	INTERNSTANDARD DATA .....	80
7.2	ABSORBANSVERDIER FRA SPEKTROFOTOMETERMÅLING .....	80

## Innholdsfortegnelse

7.3	FRYSETØRKING DATA.....	82
-----	------------------------	----

Forord

## **Forord**

Denne oppgaven er utført ved Nofima, divisjon mat og helse. Masteroppgaven er 60 studiepoeng og har blitt utført i perioden august 2015 til mai 2016. Prosessen har vært lærerik og utfordrende og jeg vil gjerne takke alle som har gjort denne oppgaven mulig å gjennomføre.

Jeg vil takke mine veiledere på Nofima, Gesine Schmidt og Grethe Iren Borge, for god oppfølging underveis og utfyllende tilbakemelding på oppgaven. Jeg vil også takke Dag Ekeberg, for at han valgte å ta på seg arbeidet som internveileder.

Takk til Roy B. Hasle for betet til forsøkene.

Takk også til alle på Nofima som har hjulpet meg på lab og som har inkludert meg og bidratt til veldig hyggelige arbeidsdager.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte og hjelp dette travle året.

Oslo, 12. mai 2016

Anette Lie Brandsnes

## Forkortelser

A	absorbans
Abs	absorbans
ACN	acetonitril
ANOVA	variansanalyse
C	konsentrasjon
DAD	diode array detector
DF	fortynningsfaktor
df	frihetsgrader
DOPA	dihydroxyphenylalanine
$\epsilon$	ekstinksjonskoeffisient
ESI	elektrosprayionisering
<i>g</i>	sentrifugeringskraft
HPLC	high performance liquid chromatography
istd	internstandard
kV	kilovolt
<i>l</i>	lysvei/bredde på kyvette
$\lambda$	bølgelengde
LC	væskrokromatografi
LC-MS	væskrokromatografi/massespektrometri
LDL	low density lipo particles
M	mol/liter
<i>m/z</i>	masse/ladning
MeOH	metanol
MS	massespektrometri
MW	molekylvekt
<i>n</i>	antall paralleller
N/A	ikke tilgjengelig
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
NPC	normalfasekromatografi
PAH	para-aminohippursyre
psig	pounds per square inch gauge
Q	kvadrupol
RPC	reversfasekromatografi
rpm	omdreiningstall
RSD	relativt standardavvik
RT	retensjonstid
SD	standardavvik
std	standard
TIC	totalt ionekromatogram (total ion chromatogram)
TOF	time of flight
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography
UV	ultrafiolett
V	volt
Vis	synlig lys
Å	Ångström (lengdeenhet $10^{-10}$ m)



## Sammendrag

Det har blitt utviklet en metode for ekstraksjon og kvalitativ og kvantitativ analyse av betalainer med HPLC-MS og spektrofotometer. Betalainene ble ekstrahert fra både rødbete, gulbete og polkabete (*Beta vulgaris*).

HPLC-parameterne ble valgt slik at separasjonen gikk så raskt som mulig for å hindre potensiell degradering av betalainer og samtidig få baselinjeseparasjon av forbindelser. Separasjon ble oppnådd med en Kinetex XB C18 reversfasekolonne fra Phenomenex, 2,1 x 150 mm, partikkelstørrelse 2,6 µm og porestørrelse 100 Å, og mobilfase bestående av vann og acetonitril med 0,1% maursyre.

Den kvalitative delen av analysen ble utført med en HPLC-ESI-Q-TOF i positiv skannmodus med skannhastighet 1 spekter/sekund i området  $m/z$  100-1700. Trykket i forstøveren var 25 psig og for tørkegasen ble temperaturen satt til 325°C med en flow på 11 L/min. Kapillærspenningen var på 3500 V og fragmentorpenningen på 150 V. Det ble opprettet en database med massene til kjente forbindelser i betar og denne ble brukt til å identifisere betalainene. Det ble identifisert ti kjente betalainforbindelser i den kvalitative analysen.

Para-aminohippursyre som internstandard bidro til å kunne trekke konklusjoner om andre forbindelsers retensjonstider ved forskjellige analyser, i tilfelle retensjonsmønsteret driftet. Dette forenklet identifiseringen av topper fra gang til gang. Den var også anvendelig for å følge ekstraksjonstrinn for fargestoffet i betar for å kunne skille ekte ekstraksjon fra vask.

Prøveopparbeidelse og ekstraksjon viste god presisjon og reproducerbarhet ved gjentatte analyser, både fra dag til dag og innen samme dag. Studien viste videre at betalainer ekstraheres mer effektivt ved 5:1 løsemiddel/bete-ratio enn 3:1, og med 25% metanol i vann (v/v) enn med høyere andel metanol. Ekstraksjonene tyder på at alt betalaininnhold blir løst ved første gangs tilsetning av løsemiddel, fordi internstandard som ikke binder til noe følger samme prosentvise fordeling. En kraftigere sentrifugering og bedre dekantering/fjerning av supernatant kreves for å nærme seg 100% utbytte ved første ekstraksjonsrunde. For at dette skal være gunstig må ekstraktene være stabile slik at aktivitetstap ikke finner sted. Filtrering av ekstraktet er også en mulighet.

Det ble utført tre forskjellige stabilitetsforsøk:

- Lagring av oppkuttete betar ved frysing (-20°C og -80°C) og frysetørring viste ingen tegn til forskjell i fargedegradering av betacyanin ved noen av betingelsene i forsøket.
- Stabilitetsforsøk med forskjellig pH i ekstraktene viste ingen signifikant forskjell i pH- området 4,7 til 6,6. Dette viste at analysen ikke er sårbar for pH-endringer i dette området.
- Ved lagring av ferdig ekstraherte prøver holder ekstraktene seg stabile i minst 18 timer ved 5°C i lukket beholder skjermet for lys. Imidlertid var det indikasjoner på en svak økning av rødfarge som muligens skyldtes nedbrytning av et gult fargestoff og ga et rødt innslag. Forsøk på ikke-sentrifugerte ekstrakter eksponert for lys og luft viste endringer som kunne forklare dette, men med mye kraftigere effekt.

En viktig del av denne oppgaven var å bestemme reproducerbarheten til analysen av betalainer på spektrofotometer benyttet for kvantifisering. Den mest tilgjengelige måten å sikre analysens reproducerbarhet var å benytte en kommersiell betaninstandard. En

## Sammendrag

standardkurve for stoffet som dekket det dynamiske måleområdet for spektrofotometeret (Abs 0,2 – 0,7) ble opprettet for dette formålet. Standardkurven viste god reproduserbarhet og presisjon.

Fire betesorter ('Touchstone Gold', 'Guardsmark', 'Bettollo' og 'Taunus') ble analysert for mengde betalainer. Innholdet av betalainer ble målt innen sorter og mellom sorter. Resultatene viste at alle sorter hadde store forskjeller mellom individer. Gulbeten ('Touchstone Gold') hadde minst variasjon i betacyanininnhold mellom ulike individer, hvor forskjell mellom laveste og høyeste verdi var 12%. Polkabeten ('Guardsmark') viste størst individvariasjon i betacyanininnhold og hadde minst av både betacyanin og betaxanthin, henholdsvis 0,029 mg/g våtvekt og 0,019 mg/g våtvekt.

Det var også store forskjeller mellom sortene, med desidert mest fargestoff i rødbetene, både av betacyaniner og betaxanthiner. Industrirødbeten ('Taunus') hadde mest innhold av både betacyanin og betaxanthin med henholdsvis 0,87 mg/g våtvekt og 0,29 mg/g våtvekt. Resultatene overensstemmer med tidligere dokumenterte verdier.

## Summary

A method for extraction and qualitative and quantitative analysis of betalains with HPLC-MS and spectrophotometer has been established. Betalains was extracted from both red, yellow and Chioggia beets (*Beta vulgaris*).

To avoid degradation of the betalains a fast separation technique on HPLC was desired, while at the same time maintaining baseline separation of the compounds. Separation was achieved with a Kinetex XB C18 reverse phase column from Phenomenex, 2.1 x 150 mm, particle size 2.6  $\mu\text{m}$  and pore size 100  $\text{\AA}$ , and a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water and acetonitrile.

The qualitative part of the analysis was conducted with HPLC-ESI-Q-TOF in positive ionization scan mode and a scan rate of 1 spectrum/second in the area  $m/z$  100-1700. Nebulizing pressure was 25 psig and drying gas was set to a temperature of 325°C and a gas flow of 11 L/min. Capillary voltage was 3500 V and fragmentor voltage 150 V. A database with masses of known beet compounds was created and used for identification of betalains. Ten betalain compounds was identified during analysis.

Sample preparation and extraction displayed satisfactory precision and reproducibility, both from day to day and within the same day. The study showed that betalains are more efficiently extracted with a solvent/beetroot ratio of 5:1 rather than 3:1, and solvent with 25% methanol in water (v/v) rather than with higher amounts of methanol. The distribution of internal standard in sample extracts indicates that the betalain content is extracted in the first extraction step. A more powerful centrifugation and a more complete decantation of supernatant is required for a better betalain yield in the first step. Filtration of the extract is also a possibility.

Three experiments on stability were conducted:

- Storage of diced beets by freezing (-80°C and -20°C) and freeze drying showed no difference in colour degradation of betacyanin.
- There was no difference in beet extract stability between pH 4.7 and 6.6.
- Beet extracts are stable for at least 18 hours at 5°C if sealed and stored in a dark environment. It was noted a small increase in betacyanin content during this interval that might result from degradation of betaxanthin where the colour changes from yellow to orange. An experiment on non-centrifuged extracts was conducted and showed a visually similar trend.

An assessment of the reproducibility of the spectrophotometer analysis was required preceding the quantitation of betalains. For this purpose, a commercial betanin standard was applied, and a standard curve that covered the dynamic range of the spectrophotometer (Abs 0.2 – 0.7) was generated. The precision of the standard curve was concluded to be sufficient.

The betalain content of four different beet cultivars ('Touchstone Gold', 'Guardsmark', 'Bettollo' and 'Taunus') was analysed. Individuals within the same cultivar were compared and relatively large discrepancies were found. The yellow beet, 'Touchstone Gold', showed the least variation in betacyanin content with a 12% level difference. The Chioggia beet, 'Guardsmark', showed the highest variation with a 116% level difference and was also the

## Summary

cultivar with the lowest content of betalains altogether (0.029 mg betacyanin/g fresh weight and 0.019 mg betaxanthin/g fresh weight).

The four cultivars differed in the amount of betalains present, with red beets having the highest levels of both betacyanin and betaxanthin. The beet cultivar with the highest content altogether was 'Taurus', with a betacyanin content of 0.87 mg/g fresh weight and betaxanthin content of 0.29 mg/g fresh weight. These results are in accordance with earlier research.

# 1. Introduksjon

Livsstilssykdommer som koronar hjertesykdom, diabetes og metabolsk syndrom grunnet dårlig kosthold er et økende problem i den vestlige verden. Det jobbes derfor aktivt for å finne ut hvordan disse sykdommene kan motvirkes eller unngås. Frukt og grønnsaker inneholder mange viktige aminosyrer, vitaminer og mineraler som er essensielle for et balansert og sunt kosthold (Helsedirektoratet, 2016). I tillegg er det funnet bevis for at andre typer forbindelser i planter kan hjelpe med å redusere effektene av livsstilssykdommer ved at de kan øke opptaket av viktige stoffer i kroppen, hemme ødeleggelsen av cellekomponenter og stimulere dannelsen av nye celler (Clifford et al., 2015, Middleton et al., 2000). Arbeidet med å kartlegge alle de helsebringende stoffene i frukt og grønt er så vidt startet og mye forskning gjenstår.

## 1.1 Fytokjemikalier i frukt og grønnsaker

I planter, frukt og grønnsaker finnes det kjemiske forbindelser av typen sekundære metabolitter som kalles fytokjemikalier. Frukt og grønnsaker inneholder ulike konsentrasjoner og typer fytokjemikalier hvor mange er knyttet opp mot helseeffekter (Saxena et al., 2013). Funksjonen til fytokjemikalier er i stor grad ukjent, men det antas at produksjonen av kjemikaliene hjelper planten med å overleve og reprodusere, og på denne måten bidrar til plantens velvære (Dewick, 2009). Fytokjemikalier deles gjerne opp i ulike grupper ut ifra deres kjemiske egenskaper. De vanligste gruppene er alkaloider, fenoler og terpenoider (Dewick, 2009, Saxena et al., 2013).

Mange fytokjemikalier virker som antioksidanter, og oppdagelsen av disse var viktig for koplingen mellom fytokjemikalier og helseeffekter i mennesker (Knight, 1998, Liu, 2003, Asard et al., 2004). Antioksidanter er ikke en spesiell gruppe fytokjemikalier, men har til felles at de er forbindelser med aromaringstruktur og konjugerte  $\pi$ -bindingssystemer, som for eksempel polyfenoler og enkelte karotenoider, som har evnen til å fange opp frie radikaler på grunn av sin elektronresonans. Deres oppgave er å forhindre oksidasjon av andre kjemiske forbindelser ved at de selv lar seg oksidere. Det er stor enighet om at oksidativ skade grunnet frie radikaler kan være skadelig på cellenivå hos mennesker, og at det sannsynligvis bidrar til degenerative sykdommer som kreft, Alzheimer og hjerte- og karsykdommer (Nijveldt et al., 2001). Flere epidemiologiske studier har vist at antioksidanter tilegnet gjennom kosten antageligvis kan hjelpe med å nøytralisere de frie radikalene (Oh, 2008, Anderson et al., 2015). Nyere forskning tyder på at virkningsmåter i kroppen kan være mange flere enn å fungere som rene antioksidanter. Det er vist at noen forbindelser kan fungere som enzymhemmere og forløpere for andre forbindelser (Middleton et al., 2000, Nijveldt et al., 2001), mens andre kan aktivere enzymer som ufarliggjør carcinogener (Saxena et al., 2013).

## 1.2 Fargestoffer i mat

Mange av fytokjemikaliene i frukt og grønnsaker gir produktene farger, og de mest vanlige er pigmenter som karotenoider, klorofyll, anthocyaniner og betalainer (Stintzing and Carle, 2004, Azeredo, 2009). Det er spesielt i rå eller lett varmebehandlet tilstand frukt og grønnsaker har kraftig farge. Ved prosessering med høy temperatur og ved lang lagringstid mistes ofte denne fargen (Azeredo, 2009). Det er fordi naturlige pigmenter har en tendens til å være ustabile forbindelser som brytes ned ved endring i temperatur og pH, og kontakt med lys og luft (Delgado-Vargas et al., 2000). De kan også vaskes ut i kokevannet under koking (Vieira, 1996). Fargen kan da gjenopprettes ved å tilsette fargestoffet i etterkant av

## Introduksjon

prosesseringen eller det kan tilsettes andre fargestoffer som tåler prosessering og lagring bedre. Fargestoffer brukes også til farging av ellers fargeløse produkter. Dette gjøres i stor grad i mat- og drikkevarer som for eksempel godterier og brus (Matvareguiden).

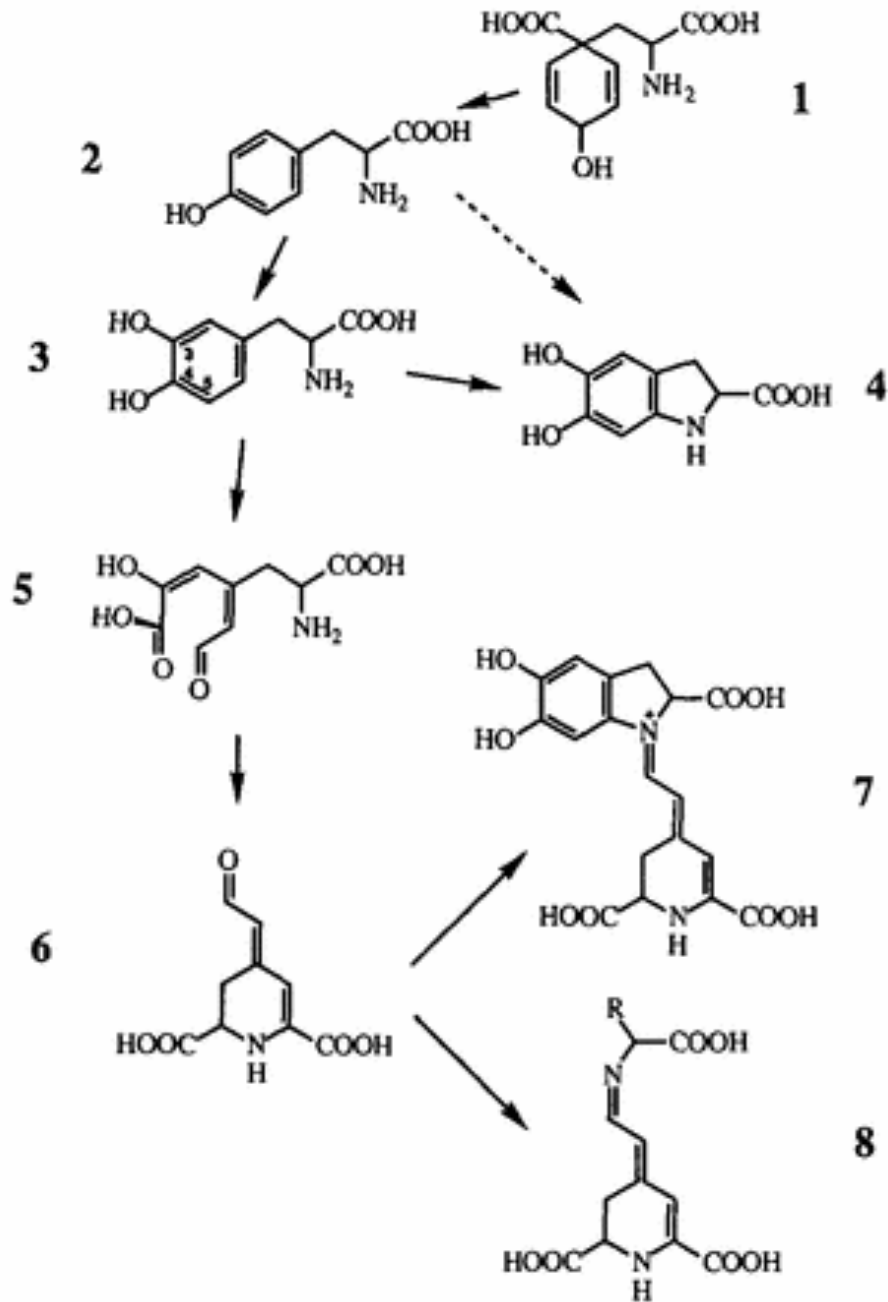
Farge er en viktig sensorisk egenskap som har stor betydning for hva slags mat konsumenter velger å spise. Ofte tilsettes fargestoffer i drikke- og matvarer for at det skal se mer innbydende ut. Sterke og friske farger forbindes med fersk mat og kan være tegn på høy kvalitet (Azeredo, 2009). Økt fokus på sunn mat har ført til at mange er skeptiske til syntetiske tilsetningsstoffer og derfor unngår produkter som inneholder dette (Delgado-Vargas et al., 2000). En stor fordel med naturlige fargestoffer er at de er ufarlige i normale mengder og ofte har helsemessig gunstige effekter, for eksempel som kilde til antioksidanter (Stintzing and Carle, 2004) og essensielle aminosyrer (Delgado-Vargas et al., 2000).

### 1.3 Betalainer

Betalainer er pigmenter som finnes hovedsakelig i rot, blomst og frukt i betalainproduserende planter (Strack et al., 2003). Det er observert akkumulering av betacyaniner i skadet vev på rødbeteblater, hvor pigmentinnholdet vanligvis ikke er stort. Det er foreslått at denne dannelsen av fargestoff kan være en forsvarsmekanisme mot oksidativt angrep (Neelwarne, 2012). Det er også mer pigment i skall enn i kjøtt og siden roten er mer utsatt for skade utenpå enn inni, støtter dette teorien om at betalainer har en beskyttende effekt (Kujala et al., 2000).

I rødbeter og gulbeter er det betalainer som sørger for den rødlilla fargen i rødbete og den gule fargen i gulbete. Betalainer er vannløselige og nitrogenholdige pigmenter. Strukturene har fellestrekk med alkaloidforbindelser som også er nitrogenholdige. Men på grunn av flere karboksylsyregrupper har betalainer syreegenskaper og kan derfor ikke kalles alkaloider i streng forstand (Delgado-Vargas et al., 2000). Betalainer syntetiseres fra aminosyren tyrosin til to strukturelle grupper, betacyaniner og betaxanthiner (Figur 1.1). Betacyaninene er rødlilla og navnet kommer fra latin *beta* som betyr bete, og gresk *kyanos* som betyr blå. Betaxanthiner er guloransje og navnet kommer fra gresk *xanthos* som betyr gul (Azeredo, 2009). Disse to gruppene har samme grunnstruktur (Figur 1.2), men ulike funksjonelle grupper. Fargen varierer med antall konjugerte dobbeltbindinger (Delgado-Vargas et al., 2000, Girod and Zryd, 1991). Absorpsjonsmaksimum for betaxanthiner er ved ca. 474 - 480 nm, og for betacyaniner ved 530 - 540 nm (Stintzing and Carle, 2004).

## Introduksjon

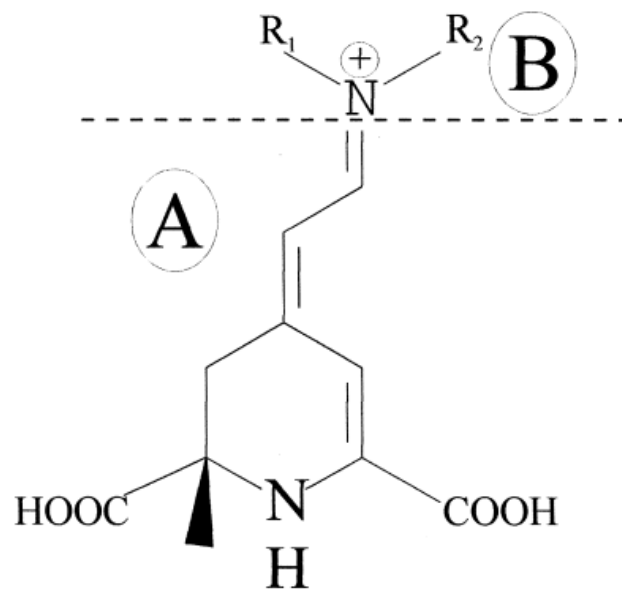


Figur 1.1: Synteseveier for betacyaniner og betaxanther. Betalamic acid (6) er kromoforen i pigmentene og kan dannes fra dihydroxyphenylalanine (DOPA) (3) ved spaltning av extradiol-ringene mellom C4 og C5. Dette danner seco-DOPA (5) etterfulgt av en reaksjon hvor nitrogen fester seg til C3. Betalamic acid (6) kan reagere med amino- eller imino-gruppen til aminosyrer og gi betaxanther (8) eller med imino-gruppen til cyclo-DOPA (4) og produsere betacyaniner (7). (1) arogenic acid, (2) tyrosin, (3) DOPA, (4) cyclo-DOPA, (5) seco-DOPA, (6) betalamic acid, (7) betacyaniner og (8) betaxanther (Girod and Zryd, 1991).

Betacyaniner dannes ved en reaksjon mellom betalamic acid og cyclo-dihydroxyphenylalanine (DOPA) etterfulgt av glykosylering, eller ved sammenslåing av cyclo-DOPA glykosider med betalamic acid. Betaxanther dannes ved at betalamic acid reagerer med aminosyrer eller aminer (Figur 1.1) (Delgado-Vargas et al., 2000, Girod and Zryd, 1991). Når betalamic acid reagerer med ringstrukturen til cyclo-DOPA utvides

## Introduksjon

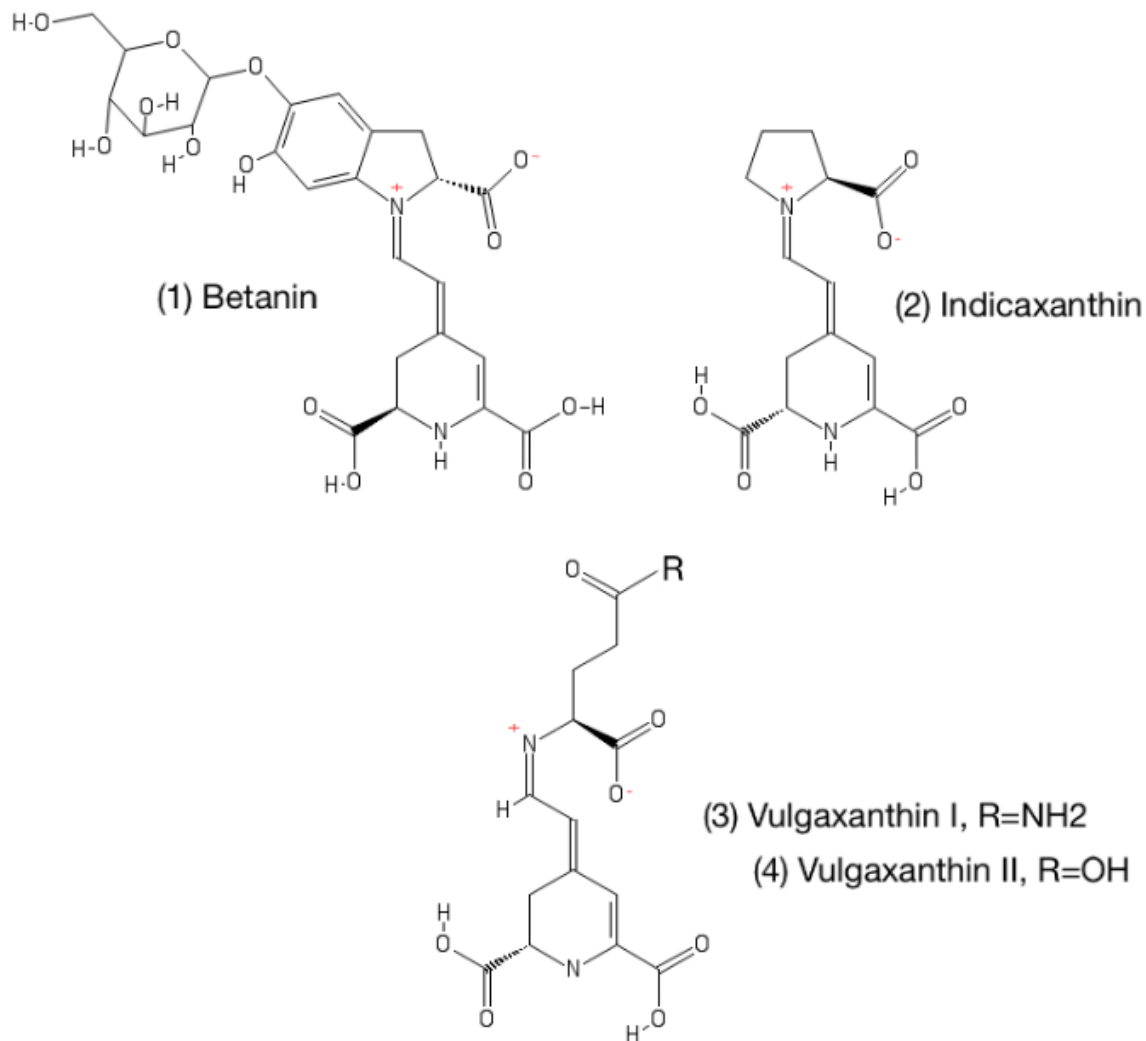
elektronresonansen til difenol-aromatringen, og den ekstra konjugerte dobbeltbindingen gir et skift i absorpsjonsmaksimum fra ca. 480 nm til ca. 540 nm (Azeredo, 2009, Strack et al., 2003). Strukturelle egenskaper påvirker stabilitet og mye tyder på at betacyaniner er mer stabile enn betaxanthinere både ved romtemperatur og ved oppvarming (Azeredo, 2009, Herbach et al., 2004). De største betacyaninkomponentene i rødbete er betanin etterfulgt av isobetanin, betanidin og isobetanidin. Av betaxanthinene er mest av komponentene vulgaxanthin I, vulgaxanthin II og indicaxanthin (Figur 1.3) (Kugler et al., 2007a). Siden betanin utgjør den klart største betalainkomponenten i rødbeter er ikke den visuelle fargevariasjonen så stor (Azeredo, 2009, Stintzing and Carle, 2004).



Figur 1.2: Generell struktur for betalainer. Betalamic acid-enheten (A) er tilstede i alle betalainmolekyler. Hvilke enheter som byttes ut med R-gruppene i (B) avgjør om det er et betacyanin eller et betaxanthin (Delgado-Vargas et al., 2000)



## Introduksjon



Figur 1.3: Strukturformel for vanlige betalainer. (1) betanin, (2) indicaxanthin, (3) vulgaxanthin I, (4) vulgaxanthin II (Neelwarne, 2012).

Betalainer finnes i få spiselige planter og de kjente spiselige kildene er røde og gule beterr (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), bladbete (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*), amarant (*Amaranthus* sp.) og kaktusfrukter (*Opuntia* og *Hylocereus* slektene) (Cai et al., 2003, Azeredo, 2009). På grunn av knappheten av betalainer i naturen er ikke disse forbindelsene studert i like stor grad som andre pigmenter. I fargenyanser er betalainer svært like anthocyaniner som finnes i adskillig flere spiselige planter. Begge stoffgruppene er vannløselige og har farger i det rosa-rød til blå-lilla området. Til tross for at de har liknende farger har aldri betalainer og anthocyaniner blitt funnet i samme plante (Stintzing and Carle, 2004), og grunnen til dette er at stoffene har ulike synteseveier fra hvert sitt utgangsmolekyl (Stintzing et al., 2006). Forskjellene i struktur, blant annet at betalainer er N-heterosykliske forbindelser, gir pigmentene ulike kjemiske egenskaper (Stintzing and Carle, 2007). Grunnet disse forskjellene er det er mye som tyder på at betalainer og anthocyaniner kan utfylle hverandre når det gjelder deres funksjon som matfargingsstoff. Stintzing (2006) har blant annet studert dannelsen av nye fargevarianter ved blanding av betalainer og anthocyaniner. Det ble funnet at betalainer er stabile og beholder fargen over et større pH-spekter (ca. 3 – 7) enn anthocyaniner som gir sterkest farge ved lav pH (ca. 2-3) (Stintzing and Carle, 2004,

## Introduksjon

Delgado-Vargas et al., 2000). Dette betyr at betalainer kan være bedre egnet som fargestoff i matvarer med mer nøytral eller basisk natur (Strack et al., 2003). Cai & Corke (1999) fant at betacyaniner har en kraftigere rød farge enn anthocyaniner fra reddik, og Stintzing & Carl (2007) fant at betalainer har en fargestyrke (tinctorial strength) opp mot tre ganger så sterk som anthocyaniner.

En negativ effekt ved bruk av rødbete til farging av mat er at det kan følge med en jordaktig smak som skyldes geosmin og pyraziner (Azeredo, 2009). Geosmin produseres av *Streptomyces*-bakterier og frigjøres når bakteriene dør (Jiang et al., 2007). Pyraziner er heterosykliske aromater med to nitrogenatomer og er viktige smaksbestanddeler i mange naturprodukter (Fennema, 1996). Imidlertid trengs relativt lave konsentrasjoner av betalainer for å oppnå kraftig farge (Delgado-Vargas et al., 2000), og det vil være lettere å kamuflere smaken ved tilsetning av små mengder. Det er også mulig å fjerne jordsmaken gjennom destillering av juice-ekstrakter (Pavokovic and Krsnik-Rasol, 2011, Stintzing and Carle, 2007). Andre betalainproduserende planter uten jordsmak, som for eksempel kaktusfrukt, har de senere årene blitt studert som mulig kommersiell kilde for betalainer, og resultatene virker lovende (Azeredo, 2009).

Det finnes ingen øvre grense for anbefalt inntak av betalainer, men dette kan komme av at det er gjort for lite forskning på helseeffekter av betalainer. Ved inntak av betalainer kan så mye som 10-14% av befolkningen oppleve at urinen og avføringen farges rød, noe som kalles beeturia. Dette oppstår hos personer som ofte har eller har hatt jernmangel og problemer med opptak av næringsstoffer, og som dermed ikke klarer å bryte ned betalainer i fordøyelsen (Neelwarne, 2012). Flere studier tyder på at betalainer innehar antioksidantegenskaper og virker betennelsesdempende ved konsumering (Azeredo, 2009, Clifford et al., 2015). *In vitro* forsøk har vist at betalainer beskytter cellekomponenter mot oksidativ skade (Clifford et al., 2015). De har også vist å ha evnen til å forstærke membraner i røde blodceller og kan inkorporeres i LDL-partikler (low density lipo particles) og slik forhindre hemolyse og nedbrytning av lipider (Pavokovic and Krsnik-Rasol, 2011). Betanin har i tillegg vist antivirale og antimikrobielle egenskaper, men blir foreløpig veldig lite brukt i farmasøytisk sammenheng (Delgado-Vargas et al., 2000, Strack et al., 2003).

## 1.4 Beter

Beter har det latinske navnet *Beta vulgaris* og tilhører slekten Caryophyllales (Clement and Mabry, 1996). Rødbeten (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) er en gammel kulturplante og har vært dyrket i Europa i flere tusen år (grønt, 2016). Den tilhører meldefamilien (Chenopodiaceae) og plantens opphav er strandbete (*Beta maritima* subsp. *maritima*) som vokser vilt langs kysten i landene ved Middelhavet. Rødbeten er omtalt av romerne så tidlig som år 200 e.Kr. og bredte seg etter hvert nordover i Europa. På 1400-tallet dukket den sannsynligvis opp i Norge og da ved navnet romerbete. Planten er toårig med dannelse av blader og opplagsnæring det første året, og utvikling av frøstengel året etter (Solberg, 2016). Beter inneholder mange viktige vitaminer og mineraler som vitamin C, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin K, folat, riboflavin, niacin, kalsium, kalium, jern, fosfor og magnesium (Neelwarne, 2012, USDA, 2016) i tillegg til betalainer. Når det gjelder cellulær antioksidanteffekt fant Song *et al.* (2010) at beter hadde en av de høyeste verdiene blant 27 vanlige grønnsaker i den amerikanske dagligkosten.

Det finnes flere forskjellige sorter beter med varierende form og farge. I tillegg til rødbete er det nå blitt vanligere å få tak i andre typer, som gulbete, hvitbete og chioggiabete (populært

## Introduksjon

kalt polkabete). Figur 1.4 viser fem ulike betesorter. I følge Opplysningskontoret for frukt og grønt (2014) økte inntekten for salg av rødbeter med 76,3% fra 2013 til 2014, noe som indikerer at rotgrønnsakens popularitet har steget de siste årene. Med økt fokus på miljø og kortreist mat er beter noe det gjerne kan spises mer av, siden de kan dyrkes i Norge. Fordi beter er godt egnet for langtidslagring fås de kjøpt i butikk hele året (Solberg, 2016).



Figur 1.4: Forskjellige sorter beter. (A) Guardsmark (polkabete), (B) Bettollo (forbrukerrødbete), (C) Avalanche (hvitbete), (D) 'Touchstone Gold' (gulbete) og (E) 'Taurus' (industri-rødbete). Foto: Anette Brandsnes

## 1.5 Analysemetoder for betalainer

### 1.5.1 Væskekromatografi

Det finnes forskjellige kromatografiske metoder, men felles for dem alle er at de benyttes for å separere stoffer fra hverandre. Væskekromatografi (LC) separerer stoffer ved hjelp av en kolonne med en mobil væskefase og en stasjonær fastfase enten med eller uten væskefase lagt utenpå (Miller, 2005). Mobilfasen vandrer gjennom stasjonærfasen i kolonnen. Det er vanlig å bruke væskekromatografi for biologiske forbindelser og polymerer som er lite flyktige og vanskelig lar seg separere med andre kromatografiske metoder. En fordel med LC er at det kan utføres ved mye lavere temperaturer enn enkelte andre kromatografiske metoder og dermed er mer egnet til å separere termisk ustabile komponenter (Hage and Carr, 2011). Ved å variere fasenes polaritet kan man endre hvordan ulike stoffer blir separert i kolonnen. Løsning med analytt injiseres i mobilfasen som tar denne med seg gjennom kolonnen og stoffene vil separeres etter deres affinitet til stasjonærfasen. Stoffe med lav affinitet vil elueres ut først, mens stoffer med høy affinitet vil elueres ut senere (Miller, 2005).

### 1.5.1.1 HPLC og UHPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) og Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) separerer stoffer ved hjelp av en høytrykkspumpe som presser mobilfasen gjennom systemet og kolonnen. Forskjellen på HPLC og UHPLC er hvor stort trykk systemet tåler. Instrumentet består av mobilfasereservoarer, pumpe, injeksjonssprøyte, kolonneovn, kolonne, og detektor. Alt styres og overvåkes ved hjelp av et dataprogram. Den analytiske kolonnen varierer i størrelse, men er ofte rundt 5-20 cm lang og har en indre diameter på rundt 1-5 mm (Phenomenex, 2016). Mobilfasen pumpes med jevn flow, gjerne mellom 0,2-1 mL/min og trykket i kolonnen vil avhenge av denne (Miller, 2005). UHPLC tåler høyere trykk, opp mot 1000 bar, i motsetning til HPLC som tåler opp til omtrent 600 bar. UHPLC-kolonner har typisk mindre porestørrelse på partiklene ( $< 2 \mu\text{m}$ ) og mindre indre diameter i kolonnen enn HPLC-kolonner (Phenomenex, 2016). Høyere flow og raskere retensjonstider minsker båndbredden og dette fører til at toppene blir smalere og høyere, og fører til at separasjonen blir bedre (Miller, 2005). Blir flow for høy vil ingen topper separeres, så hvor høy flow som kan tillates avhenger av systemet og analytten. Kolonnetemperaturen kan variere mellom 20°C og 90°C avhengig av kolonnetypen, og analysetiden fra noen minutter og opp mot én time. UHPLC har kortere analysetider enn vanlig HPLC. For lang analysetid bør unngås, siden båndbredden vil øke med retensjonstiden (Miller, 2005), samtidig som ustabile forbindelser vil kunne brytes ned i løpet av analysen.

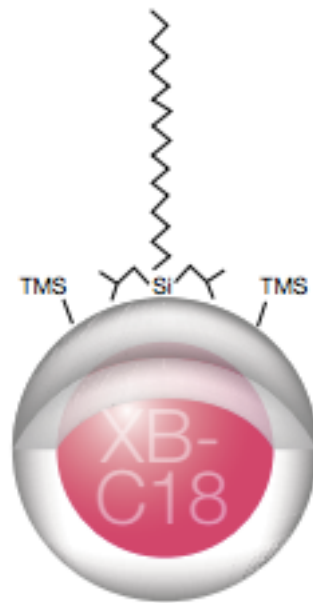
### 1.5.1.2 Reversfasekromatografi

Reversfasekromatografi (Reverse Phase Chromatography, RPC) er mye brukt og her opererer man med en polar mobilfase og en mindre polar eller upolar stasjonærfase. Den stasjonære fasen består som regel av silikapartikler med modifisert overflate. Alkylkjeder ( $\text{C}_{18}$ ) er kovalent bundet til silanolgrupper på partikkeloverflaten. Mobilfasen er ofte en blanding av vandig buffer og et organisk løsemiddel som acetonitril eller metanol. Stoffer med størst polaritet vil ha lavest retensjonstid, mens upolare stoffer vil ha høyere affinitet til stasjonærfasen og holdes igjen lenger i kolonnen. Det er viktig at pH er under kontroll, siden endringer i denne kan påvirke separasjonen drastisk (Miller, 2005). Reversfasekromatografi er den mest anvendte teknikken innen legemiddelindustrien og farmasøytisk industri fordi den er ideell for separasjon av organiske stoffer i vannbaserte løsninger (Hage and Carr, 2011). Av nettopp den grunn ble RPC brukt i denne oppgaven.

I noen tilfeller er normalfasekromatografi (Normal Phase Chromatography, NPC) et bedre alternativ enn RPC. Normalfasekromatografi blir brukt for å separere veldig polare forbindelser, som vanskelig lar seg separere ved RPC (Hage and Carr, 2011). Ved NPC er stasjonærfasen polar og mobilfasen upolar (Miller, 2005). Denne metoden ble ikke benyttet i studien.

### 1.5.1.3 Kinetex kolonner

Phenomenex produserer flere typer RPC kolonner til bruk i HPLC og UHPLC. De baserer seg på en "core-shell" teknologi hvor silikapartikler dekkes med porøs væskefase (Figur 1.5). Når bare det ytterste laget på partiklene er porøst, i motsetning til en gjennomgående porøs partikkel, minskes båndbredden og dette resulterer i signaler med høyere oppløsning og sensitivitet. I tillegg tåler kolonnene høyere trykk og raskere flow, som gir mulighet for kortere analysetid (Phenomenex, 2016). I denne oppgaven ble en Kinetex XB C18 kolonne benyttet.



Figur 1.5: Kinetex XB-C18 har fastfase bestående av silikapartikler dekket med et materiale med porer. Partiklene har beskyttende butyl-sidekjeder. Bildet er hentet fra Phenomenex sine hjemmesider (Phenomenex, 2016).

### 1.5.2 Spektrofotometri

Et spektrofotometer måler absorpsjon av elektromagnetisk stråling med bestemt bølgelengde og kan brukes for å finne konsentrasjonen av et stoff i en ukjent blanding. Lys sendes gjennom en løsning med analytt og mengden lys som absorberes registreres av en detektor. Stoffets absorbans og konsentrasjon påvirker mengden av stråling som slipper gjennom stoffprøven. Spektrofotometeret består av en lyskilde, monokromator, holder for stoffprøve og en detektor. Lys fra lyskilden sendes inn i monokromatoren som består av fargefilter eller spektroskop. Et frekvensområde velges ut og sendes gjennom stoffprøven før det fanges opp av detektoren. Spektrofotometer brukes i bølgelengdeområdet fra 200 nm – 300 μm (Holtebekk, 2009). En rekke UV-Vis spektrofotometere benytter diode array (DAD) som detektor. Denne har en UV-lampe (som regel deuterium) og en wolframlampe som lyskilde og måler ved bølgelengder fra 10 nm til 1 μm (Hage and Carr, 2011).

Sammenhengen mellom absorbans og konsentrasjon beskrives i Beer-Lamberts lov.

Formel 1.1: Beer-Lamberts lov

$$A = \varepsilon \times C \times l$$

Absorbansen ( $A$ ) til en homogen blanding er proporsjonal med konsentrasjonen ( $C$ ) som har benevnningen  $M$  (mol/L). Tegnet  $l$  er lengden på lysveien i cm.  $\varepsilon$  er den molare absorptiviteten, også kalt den molare ekstinksjonskoeffisienten, med enheten L/mol·cm (Hage and Carr, 2011). Ekstinksjonskoeffisienten er en proporsjonalitetskonstant og dens verdi vil avhenge av den aktuelle bølgelengden, hvilket stoff som absorberer og løsemiddelet til dette stoffet (Hage and Carr, 2011).

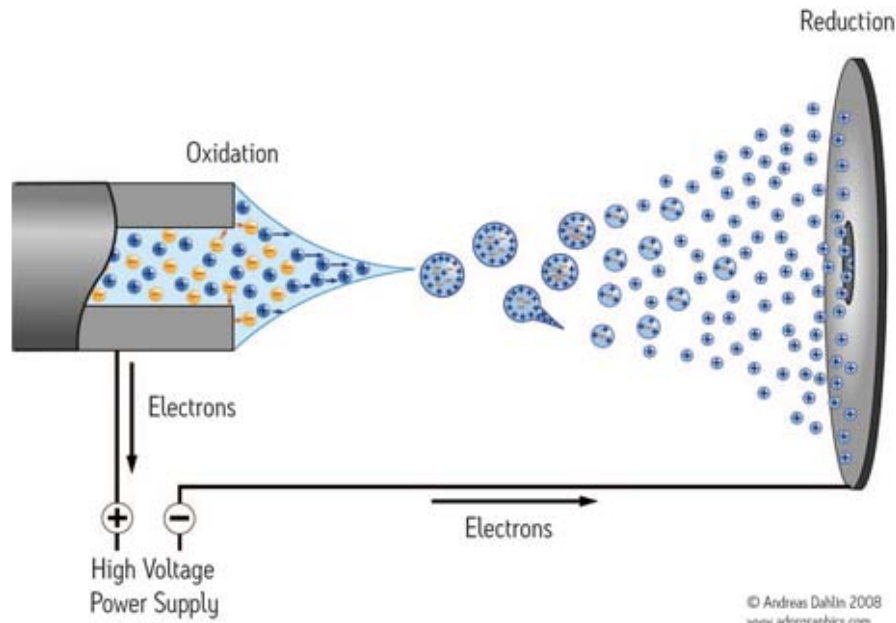
### 1.5.3 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en teknikk som brukes for å identifisere ukjente stoffer, kvantifisere kjente forbindelser og finne struktur og kjemiske egenskaper til komponentene. Stoffene blir ionisert og sortert etter deres masse på ladning-ratio,  $m/z$  (Hoffmann and Stroobant, 2007). Teknikken er svært følsom og kan brukes på både rene løsninger og komplekse blandinger (Hoffmann and Stroobant, 2007). Det finnes flere typer instrumenter som baserer seg på prinsippet om å sortere stoffer etter masse på ladning, deriblant ESI-Q-TOF som er analysatoren som ble benyttet i denne studien.

Et MS-instrument består alltid av et prøveinnføringssystem, en ionekilde, en masseanalysator, en detektor og et datasystem (Uggerud et al., 2009). I tillegg trengs det en vakuumpumpe som fjerner all luft i masseanalysatoren. Dette er nødvendig for å unngå at ionene kolliderer med andre molekyler og skifter kurs og utlades (Hoffmann and Stroobant, 2007). Ionekilden sørger for å danne ioner i gassfase som videre akselereres inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. Analysatoren separerer ionene etter  $m/z$ , og detektoren detekterer de ionene som passerer uhindret gjennom. Datasystemet registrerer signalet fra detektoren, som er ionestrømmen som funksjon av  $m/z$ -verdi. Dette kalles et massespektrum (Uggerud et al., 2009).

#### 1.5.3.1 Elektrosprayionisering

For å kunne kjøre de fleste masseanalysene er det nødvendig at analytten er ionisert, slik at den har ladning. Hvis den ikke er det i utgangspunktet kan dette gjøres på forskjellige måter, og en av dem er gjennom elektrosprayionisering (ESI). ESI har blitt svært populært blant annet på grunn av at ionene kan dannes under atmosfærisk trykk og det er lett å koble til HPLC (Hoffmann and Stroobant, 2007). Væskestømmen fra HPLC-instrumentet føres inn i et trangt kapillærrør av rustfritt stål og når den kommer ut på andre siden blir det sprayet med en inert gass, som regel nitrogen, slik at aerosoler dannes. Kapillærrøret og en motelektrode er påsatt spenning på mellom 3 og 6 kV og dette skaper et elektrisk felt som gjør at dråpene fra væskestømmen blir ladet. Gassen sørger for å fordampe løsemiddelet og størrelsen på de ladde dråpene reduseres. Når ladningstettheten er høy nok vil ioner skilles ut i gassform fra dråpeoverflaten. Ionene vil trekkes mot en åpning i ekstraksjonskjeglen (extractor cone) med motsatt ladning og bli sendt videre inn i MS-instrumentet for analyse (Figur 1.6) (Hoffmann and Stroobant, 2007).



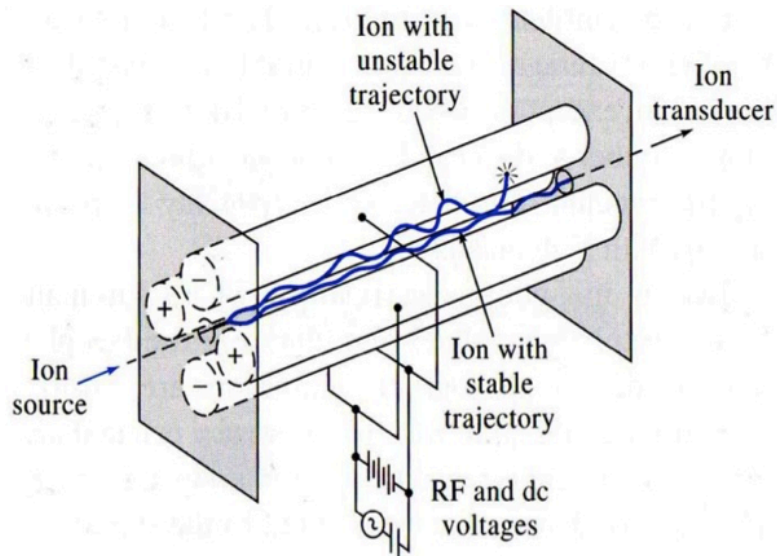
Figur 1.6: Figuren viser hvordan spray dannes av ioner i positiv modus som dras gjennom et elektrisk felt. Figuren er hentet fra Waters sine hjemmesider (Dahlin).

ESI er en myk ioniseringsteknikk. Det dannes stort sett protonerte eller deprotonerte molekyllioner med enten pluss- eller minusladning i henholdsvis positiv og negativ modus. Disse blir sjeldent fragmentert videre. Harde ioniseringsteknikker gir større fragmentering. Små molekyler vil som regel bli enkeltladet, men av store molekyler er det mulig å danne ioner med flere ladninger. Et enkeltladet ion vil ha en masse på  $[M + H]^+$  i positiv modus dersom det blir protonert og  $[M - H]^-$  i negativ dersom det blir deprotonert (Hoffmann and Stroobant, 2007).

### 1.5.3.2 Kvadrupol

En kvadrupol (Q) er en masseanalysator som består av fire parallelle sylinderformede eller hyperbolske metallstaver (Figur 1.7). Disse stavene er egentlig elektroder med elektriske felt rundt seg. De motstående stavene er festet sammen og har samme ladning. Ved å tilføre vekselspanning (AC) og likespenning (DC) på stavene kan det veksles mellom positiv og negativ ladning og det er mulig å styre et ion gjennom feltet uten at det kolliderer på veien. Ioner har ladning som gjør at de vil tiltrekkes stavene med motsatt ladning og frastøtes dem med lik. Hvor fort ladningen på stavparene veksles, samt styrken på feltet, bestemmer hvilke ioner som passerer. Har ionene feil  $m/z$  vil de endre retning enten for fort eller for tregt og dermed kolliderer før de har passert gjennom feltet. Ionene med riktig  $m/z$  vil passere uskadet gjennom masseanalysatoren og bli detektert. Dermed fungerer kvadrupolen som et massefilter.





Figur 1.7: Skjematisk tegning av hvordan en kvadrupol masseanalysator er bygget opp (Jones, 2012).

### 1.5.3.3 Time of Flight

En Time of Flight-analysator (TOF) separerer ioner etter deres hastighet i en feltløs flight tube. Alle ionene akselereres slik at de oppnår samme kinetiske energi. Ionene med lav masse vil bruke kortere tid i analysatoren enn ioner med høyere masse. En fordel med TOF er at det ikke er noen øvre massegrense for hva som kan detekteres. Dette gjør den godt egnet for kobling med myke ioniseringsmetoder, som ESI. Den har også høy sensitivitet og svært rask analysestid (Hoffmann and Stroobant, 2007).

### 1.5.3.4 Detektor

Oppgaven til detektoren er å detektere de ladde partiklene etter at de er sortert i masseanalysatoren. Detektoren er ofte en elektronmultiplikator som akselererer ionene for å øke deteksjonseffektiviteten. Dette gjøres ved å lage et høyt potensial på mellom  $\pm 3$  til  $\pm 30$  kV, ved hjelp av en elektrode, som også kalles en konverteringsdynode, med motsatt ladning av ionene. Når ionene treffer dynoden vil de danne sekundærpartikler som konverteres til elektroner. Elektronene multipliseres ettersom de kolliderer gjentatte ganger med påfølgende dynoder. Resultatet er at signalet øker og dermed også sensitiviteten (Hoffmann and Stroobant, 2007). Signalet fra detektoren tolkes av et datasystem som plottes relativ intensitet mot  $m/z$ .

## 1.6 Prøveopparbeidelse

### 1.6.1 Frysetørring

Når man frysetørker fjerner man vann eller andre løsemidler fra en komponent ved sublimasjon fra frossen tilstand. Prosessen må derfor foregå ved temperaturer under frysepunktet og ved trykk lavere enn metningstrykket for is ved de gitte betingelsene (Lorentzen, 2009). Innfrysningen bør gå raskt og ned til lave temperaturer ( $< -40^{\circ}\text{C}$ ) for at molekylstrukturer og biologisk aktivitet best skal holdes intakte. Frysetørring er en god metode for å bedre holdbarheten til prøver eller oppkonsentrere materiale. En stor fordel med frysetørring er at bakterievekst og enzymaktivitet hemmes når vann fjernes (Sjøvold, 2006).



Som regel vil det være igjen minst 1-3 % vann i en prøve, men så lenge denne vakuumeres og lagres mørkt og kjølig er holdbarheten meget god. Selv om frysetørking er svært fordelaktig med tanke på holdbarhet er det en veldig energikrevende og kostbar prosess. Om det er verdt å frysetørke et produkt må vurderes på bakgrunn av hvor verdifullt prøvematerialet er (Hui et al., 2006).

### **1.7 Kvalitativ og kvantitativ analyse av betalainer med LC-MS og spektrofotometer**

Flere andre artikler hvor betalainer er analysert har benyttet LC-MS (Castellanos-Santiago and Yahia, 2008, Kugler et al., 2007b, Kujala et al., 2000, Slatnar et al., 2015). Derfor var denne analysemetoden et naturlig valg. HPLC-MS kan benyttes både til kvalitativ og kvantitativ analyse av stoffer i en prøve (Miller, 2005), i dette tilfellet betalainer. HPLC separerer de ulike stoffene og MS brukes for å identifisere toppene (Miller, 2005, Hoffmann and Stroobant, 2007). Dette er svært nyttig hvis man har komplekse blandinger med ukjente stoffer. Den spektrometriske informasjonen sammen med retensjonstid gir en sikrere kvalitativ analyse.

Kvantitativ analyse gjøres ved å sammenligne topparealet til en forbindelse med topparealet til en standard av samme forbindelse med kjent konsentrasjon.

Spektrofotometeret kan brukes ved kvantitativ analyse av stoffer uten standarder, dersom det aktuelle stoffet har en kjent ekstinksjonskoeffisient (Hage and Carr, 2011).

En internstandard (istd.) er en forbindelse som tilsettes prøven for å følge med på tap under prøveopparbeidelsen og andre forhold som kan påvirke analysen. Forbindelsen må være ren og kjent mengde må tilsettes. Signalet internstandard gir skal være omtrent likt som signalet fra analytten. Helst skal internstandard ha like kjemiske egenskaper som forbindelsen som skal bestemmes og retensjonstid bør ligge nært analytten. Den må være separert fra andre forbindelser i prøven og ikke finnes i prøven fra før. I tillegg må den være stabil (Hage and Carr, 2011).

### **1.8 Problemstilling**

Den første delen av oppgaven var å utvikle en ekstraksjonsmetode for fargestoffet fra beten og den andre delen var å opprette en kvalitativ og kvantitativ analyse av betalainer med HPLC-MS. Målet var å finne den optimale prøveopparbeidelse og ekstraksjon med hensyn på fargeutbytte og en analysemetode som med minst mulig prøvebehandling fanger opp det sanne utbyttet.

Metodene ble deretter brukt for å studere stabiliteten til betalainer både i sammenheng med lagring av beten som råvare og ved lagring av ferdige ekstrakter. Til slutt ble metodene benyttet for å finne ut hvilken betesort som hadde det høyeste innholdet av fargestoff av de fire sortene som ble sammenlignet.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Instrumenter

#### 2.1.1 Homogenisator

For å homogenisere ekstrakter ble det benyttet en Polytron®, PT 3100 fra Kinematica AG.

#### 2.1.2 Sentrifuge

Til sentrifugering ble både en Thermo Heraeus Multifuge 4KR Centrifuge og en Beckman Coulter Avanti J-26 XP brukt. Thermosentrifugen er en lavhastighetscentrifuge, mens Beckmansentrifugen er en høyhastighetscentrifuge. Rotor i Thermosentrifugen var en Sorvall Heraeus 4400 rpm og i Beckmansentrifugen en JA-20 fastvinkelrotor.

#### 2.1.3 Frysetørker

Til frysetørring av beter ble en frysetørker av typen Christ, Gamma 1-16 LSCplus, single chamber brukt. Kondensatorkapasitet 16 kg og kondensatortemperatur -55°C.

#### 2.1.4 Spektrofotometer

For å måle absorbans ble det benyttet et Agilent 8453 UV-Vis instrument. Det har to lamper som lyskilde, en deuteriumlampe og en wolframlampe som brukes i henholdsvis UV- og synlig lys-området. Detektoren er en dioderekke (1024 dioder), som gjør at alle bølgelengder kan måles samtidig. Ekstraktene ble målt i en 3 mL glasskvyette, 1 cm lysvei, med løsemiddel som blankprøve.

#### 2.1.5 pH-meter

Et pH-meter av typen Metrohm Swissmade 827 pH lab med standard pH-elektrode (pH 0-14) ble benyttet til pH-måling. pH-meteret ble kalibrert daglig før bruk med referanseløsninger fra WTW.

#### 2.1.6 Vakuummaskin

Til å vakuumpakke frysetørkede prøver ble det benyttet en Intervac vakuummaskin fra leverandør Navestad AS.

#### 2.1.7 Andre instrumenter

To analyseveker av typen Mettler Toledo med henholdsvis oppløsning 0,01 mg og 1 mg ble benyttet. Kontrollerte Eppendorf Research® automatpipetter ble også benyttet.

#### 2.1.8 HPLC/HPLC-MS

Prøvene ble analysert ved hjelp av tre forskjellige HPLC-instrumenter i løpet av studiet. Det ene var et Agilent UHPLC1290, det andre et Agilent HPLC1200 og det siste et Agilent UHPLC1290 Infinity-instrument koblet til Agilent 6510 Q-TOF massespektrometer. Alle HPLC-instrumentene har en autoinjektor for opp til 2x54 + 10 vials og en DAD UV-Vis-detektor. HPLC retensjonstider ble brukt til kvalitativ analyse av betalainer og topparealer ble

## Materialer og metoder

brukt for å beregne relative størrelser. Både HPLC og UHPLC omtales som HPLC i resten av oppgaven.

Separasjonen av betalainer ble gjort med en Kinetex XB C18 kolonne fra Phenomenex. Lengden på kolonnen var 150 mm og diameter 2,1 mm. Partikkelstørrelsen var 2,6  $\mu\text{m}$  og porestørrelsen 100 Å. Kolonnen er pH-stabil mellom 1,5 og 8,5 og tåler et trykk opp mot 1000 bar. Det ble i tillegg benyttet en forkolonne av typen SecurityGuard<sup>TM</sup> ULTRA Cartridge System, også fra Phenomenex.

## 2.2 Utstyr

Tabell 2.1: Utstyrliste som viser leverandør dersom dette er kjent.

<b>Produkt</b>	<b>Leverandør</b>
<b>45 mL polypropylen sentrifugerør m/lukk</b>	VWR®
<b>Sentrifugerør u/lukk</b>	Beckman
<b>HPLC-vials</b>	Chromacol, Thermo Fischer Scientific
<b>0,20 <math>\mu\text{m}</math> Millex LG filter</b>	Merck Millipore
<b>Fullpipette</b>	Brand Germany Blaubrand
<b>1 mL sprøyte</b>	N/A
<b>Blender</b>	Moulinex
<b>1,5 mL rør med gummiring i lokk (til frysing)</b>	N/A
<b>Vakuumposer</b>	N/A
<b>Hamiltonsprøyte</b>	Hamilton®

## 2.3 Kjemikalier

Tabell 2.2: Oversikt over benyttede kjemikalier, kvalitet, leverandør og CAS-nummer.

Kjemikalie/løsning	Kvalitet	Leverandør	CAS-nr
Milli-Q vann	HPLC grade (0,20 filter)	Merck Millipore	N/A
Metanol	≥ 99,8%	Merck	67-56-1
Maursyre	98%	Sigma-Aldrich	64-18-6
Acetonitril	≥ 99,9%	VWR®	75-05-8
Para-aminohippursyre	≥ 99%	Sigma-Aldrich	61-78-9
Flytende nitrogen	≥ 99,95	AGA	7727-37-9
Betanin (red beet extract)	N/A	Sigma-Aldrich	7659-95-2

### 2.3.1 Tillaging av mobilfaseløsninger

Til mobilfaser ble det benyttet HPLC-grad kjemikalier og MilliQ-vann. Mobilfase A bestod av 0,1% maursyre i vann (v/v), og mobilfase B bestod av 0,1% maursyre i ACN (v/v). Til vask av kolonnen ble 80% ACN i vann (v/v) brukt. Vask av kolonnen er viktig for å unngå at prøvemateriale blir sittende igjen og kontaminerer senere kjøring.

### 2.3.2 Ekstraksjonsløsemiddel

Som ekstraksjonsløsemiddel ble det tillaget løsninger med 25%, 50% og 75% metanol i MilliQ-vann (v/v). Det ble også benyttet løsemiddel med 0,1% maursyre i 50% meOH. Alle løsninger ble blandet godt.

### 2.3.3 Betaninstandard

En betaninstandard fra Sigma-Aldrich ble kjøpt inn og benyttet som en referanse for rødbeteekstraktene. Betaninstandarden var fortynt med dekstrin og renhetsgrad ikke kjent. Mengden som ble veid inn og løst i løsemiddel ga derfor ikke den sanne konsentrasjonen av betanin, men standarden kunne likevel benyttes som kvalitativ standard for betanintopper ved 530 nm.

Fortynningene ble laget ved å veie inn tørrstoff til hver enkelt konsentrasjon. Dette ble gjort to ganger for hver konsentrasjon (std.rekke A og B). Tørrstoffet ble løst i 25% metanol i vann (v/v). Hamiltonsprøyter ble benyttet for tillaging av betaninstandardene (1-50 µL, og 10-500 µL). Standarden ble lagret ved -20°C og benyttet ved flere analyser. Se Tabell 2.3 for innveid mengde, løsemiddelmengde og konsentrasjon uren standard.

## Materialer og metoder

Tabell 2.3: Innveide mengder av betaninstandard, mengde løsemiddel og sluttkonsentrasjon i standardløsningen.

Std. rekke	Prøve	Innveid mengde betaninstd. (mg)	Løsemiddel (mL)	Konsentrasjon uren std. (mg/mL)
<b>A</b>	1	3,22	3	1,07
	2	6,09	3	2,03
	3	9,06	3	3,02
	4	15,20	3	5,07
	5	30,17	3	10,06
	6	45,26	3	15,09
	7	60,59	3	20,20
<b>B</b>	1	3,22	3	1,07
	2	6,24	3	2,08
	3	9,20	3	3,07
	4	15,10	3	5,03
	5	30,45	3	10,15
	6	45,45	3	15,15
	7	60,42	3	20,14

### 2.3.4 Internstandard

Som internstandard ble det benyttet para-aminohippursyre (PAH) fra Sigma-Aldrich. For å lage stamløsningen på 1 mg/mL ble 5 mg PAH veid ut og løst i 5 mL 50% meOH i vann (v/v). Totalt ble det laget 3 stamløsninger med tilhørende fortynningsrekker.

Hamiltonsprøyter ble benyttet for tillaging av standardene (1-50 µL, og 10-500 µL). Tabell 2.4 viser fortynningsrekken med mengde stamløsning, mengde løsemiddel og konsentrasjon. Det ble laget 1 mL av hver konsentrasjon som ble fordelt på 4 HPLC-vials med innlegg. HPLC-vials ble lagret ved -80°C frem til bruk.

Tabell 2.4: Mengde stamløsning para-aminohippursyre og løsemiddel i  $\mu\text{L}$ . Sluttkonsentrasjon i  $\text{mg/mL}$ .

Navn	Mengde stamløsning ( $\mu\text{L}$ )	Mengde løsemiddel ( $\mu\text{L}$ )	Konsentrasjon ( $\text{mg/mL}$ )
1	10	990	0,01
2	20	980	0,02
3	40	960	0,04
4	100	900	0,1
5	125	875	0,125
6	250	750	0,25
7	500	500	0,5
8	800	200	0,8

For å beregne % gjenfunnet PAH etter ekstraksjon ble Formel 2.1 benyttet. Total mengde løsemiddel var summen av tilsatt løsemiddel og vanninnholdet i beten.

Formel 2.1

$$\text{Areal (mAU} \cdot \text{s)} \times \text{løsemiddel (mL)} / \text{stigningstall std. kurve}$$

## 2.4 Fremgangsmetode for prøveopparbeidelse

### 2.4.1 Prøveopparbeidelse av beten til forsøk uten lagring (metode 1)

Rødbeter og gulbeter ble kjøpt inn fra vanlig matvarebutikk og oppbevart i pakningen i kjøleskap ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i ca. 2 uker frem til bruk. Omtrent 300 gram beten ble skrelt og kuttet opp i ca.  $1\text{ cm}^3$  terninger. Deretter ble det kværnet i blender i ca. 1 min under romtemperatur til grovkornet masse.

### 2.4.2 Prøveopparbeidelse til lagringsstudier, holdbarhetsstudier og ekstraksjonseffektivitet (metode 2)

Rødbeter ble kjøpt inn fra vanlig matvarebutikk og oppbevart i pakningen i kjøleskap ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i ca. 2 uker frem til bruk. I romtemperatur ble omtrent 1,5 kg rødbeter skrelt og kuttet i  $1\text{ cm}^3$  terninger og blandet. Terningene ble delt i  $3 \times 10$  plastikkbegre med ca. 40 gram i hver. Det ene begeret ble fryst på  $-80^{\circ}\text{C}$ , det andre begeret ble fryst på  $-20^{\circ}\text{C}$  og det siste begeret ble veid inn og fryst ned med flytende nitrogen og satt direkte i frysetørker. Prøvene i frysetørker ble tørket i en uke og deretter tatt ut og veid på nytt. Deretter ble terningene puttet i vakuumposer, vakuumbestemt og lagt i  $-80^{\circ}\text{C}$  fryser frem til bruk (Figur 2.1).



Figur 2.1: Vakuumpakket frysetørket rødbete. Foto: Anette Brandsnes

### 2.4.3 Prøveopparbeidelse til betesortforsøk (metode 3)

Fire ulike betesorter ble hentet hos grønnsaksprodusent Roy B. Hasle, Hasle Gård, Rygge. Disse var gulbete av sorten 'Touchstone Gold', polkabete av sorten Guardsmark, forbrukerrødbete av sorten Bettollo og industrirødbete av sorten 'Taunus'. Betene ble oppbevart i plastikkposer på kjølelager (2°C) frem til prøveopparbeidelsen.

Fem individer fra hver sort (5x4) ble skrelt og kuttet opp i terninger. Individene ble holdt adskilt for å kunne se på biologisk variasjon.

Terningene fra et individ ble blandet godt og fordelt på fire begerglass à ca. 50 gram. Alle begrene med lokk ble lagt i -80°C fryser og etter en natt ble to av dem veid og satt til frysetørring uten lokk. Etter en uke ble prøvene tatt ut av frysetørkeren og veid på nytt. De frysetørkede prøvene ble ikke analysert, men kun brukt til beregning av mengde vann i betene.

## 2.5 Fremgangsmetode for ekstraksjon

### 2.5.1 Ekstraksjon av ferske prøver (ekstraksjonsmetode 1)

Metode 1 for prøveopparbeidelse ble benyttet. Fra den grovkornede massen ble det veid ut 5 eller 10 gram prøve, avhengig av forsøk, til hver parallell. Innveiningen ble gjort direkte i sentrifugerør. I de tilfelle hvor internstandard ble tilsatt var denne veid inn i sentrifugerørene på forhånd. Deretter ble hver parallell tilsatt 25 eller 30 mL løsemiddel avhengig av om henholdsvis 5 eller 10 gram bete var veid inn. Alle paralleller ble homogenisert med Polytron® i ca. 30 sekunder. Deretter ble de sentrifugert i 10 min ved 39 000g og 4°C. Etter sentrifugering ble supernatanten dekantert over i erlenmeyerkolbe, mens pelleten ble tilsatt nye 25 eller 30 mL løsemiddel. Det ble rørt godt med glasstav før ny sentrifugering ved samme betingelser som før. Trinnene med sentrifugering, dekantering av supernatant og tilsetning av løsemiddel ble gjentatt til pelleten ikke ga fra seg mer farge.

### 2.5.2 Ekstraksjon av fryste prøver (ekstraksjonsmetode 2)

Metode 2 for prøveopparbeidelse ble benyttet. Beger med prøve ble tatt ut fra -80°C eller -20°C fryser og satt på is. De fryste prøvene ble kvernet i blender på kjølerom til grovkornet masse. Kvernede prøver ble satt tilbake på is og deretter ble det veid inn 5 eller 10 gram prøve per parallell i sentrifugerør. Dersom internstandard ble tilsatt var denne veid inn i sentrifugerørene på forhånd. Deretter ble hver parallell tilsatt 25 eller 30 mL løsemiddel avhengig av om henholdsvis 5 eller 10 gram bete var veid inn. Alle paralleller ble homogenisert med Polytron® i ca. 30 sekunder. Deretter ble de sentrifugert i 10 min ved 39 000 g og 4°C. Etter sentrifugering ble supernatanten dekantert over i erlenmeyerkolbe, mens pelleten ble tilsatt nye 25 eller 30 mL løsemiddel. Det ble rørt godt med glasstav før ny sentrifugering ved samme betingelser som før. Trinnene med sentrifugering, dekantering av supernatant og tilsetning av løsemiddel ble gjentatt til pelleten ikke ga fra seg mer farge.

### 2.5.3 Ekstraksjon av frysetørkede prøver (ekstraksjonsmetode 3)

Metode 2 for prøveopparbeidelse ble benyttet. Vakuumpose med frysetørket prøve ble tatt ut av -80°C fryser og lagt i romtemperatur i ca. 1 time på mørkt sted. Deretter ble prøven tatt ut av vakuumposen og knust til pulver i morter. Det ble veid ut 0,735 gram rødbetepulver som tilsvarte 5 gram fersk bete per parallell. Så ble 4,265 gram vann tilsatt for å kompensere for vannmengden som ble fjernet under frysetørkingen. Etter tilsetning av 25 mL løsemiddel ble det blandet godt med glasstav. Deretter ble prøvene sentrifugert i 10 min ved 39 000 g og 4°C. Supernatanten ble dekantert i erlenmeyerkolbe og det ble tatt ut prøve for HPLC-analyse av ekstraktet. Sentrifugerøret med pellet ble tilsatt nye 25 mL løsemiddel, mikset godt med glasstav og sentrifugert på nytt. Igjen ble supernatanten dekantert i ny erlenmeyerkolbe og prøve tatt ut til HPLC-analyse. Stegene med sentrifugering, dekantering og tilsetning av løsemiddel ble gjentatt til løsemiddelet var fargeløst.

### 2.5.4 Tillaging av HPLC-vials

Før HPLC-vials ble tilsatt prøve, ble ekstraktene og standardene filtrert gjennom 0,2 µm filter for å fjerne alle store partikler som kan forurense HPLC-systemet. Til beteeekstrakter ble det benyttet brune HPLC-vials (1,5 mL) for å unngå lysnedbrytning av betalainer. Paraaminohippursyre ble overført til brune HPLC-vials med innlegg (200 µL).

## 2.6 Analyse

### 2.6.1 Analyse med spektrofotometer

Absorbans ble målt med spektrofotometer for å beregne konsentrasjon av betaxanthin og betacyanin ved bruk av ekstinksjonskoeffisienten ( $\epsilon$ ). Ekstinksjonskoeffisienten for vulgaxanthin I er 48 000 L/mol·cm ved  $\lambda=474$  nm og molekylvekten er 339 g/mol, og for betanin er den 60 000 L/mol·cm ved  $\lambda=530$  nm og molekylvekten er 550 g/mol (Stintzing et al., 2006, Sumaya-Martínez et al., 2011, Wroblewska et al., 2011). Formel 2.2 ble benyttet til å regne ut konsentrasjonen av betalainer, hvor  $A$  er absorpsjon,  $DF$  er fortynningsfaktor,  $MW$  er molekylvekt og  $l$  er lengden på lysveien.

Formel 2.2

$$mg/L = A \times DF \times MW \times 1000 / \epsilon \times l$$



## Materialer og metoder

Analyseprogrammet til spektrofotometeret ble innstilt til måling ved bølgelengdene 474 og 530 nm. Det ble benyttet 3 mL glasskvyvette til alle ekstrakter ( $l = 1$  cm). En blankprøve av løsemiddelet ble brukt for å kalibrere instrumentet før analyse.

### 2.6.2 HPLC analyse

HPLC-vials med ferdig filtrerte ekstrakter og standarder ble plassert på i autoinjektoren som var satt til 5°C. Det ble opprettet en sekvenstabell i analyse-programmet ChemStation hvor rekkefølgen til alle prøver var randomisert. Innstillingene til HPLC-instrumentet vises i Tabell 2.5. Programmet har engelske språkinnstillinger.

Tabell 2.5: Innstillinger for HPLC-instrument.

<b>Injector</b>	Draw and eject speed	100 $\mu$ L/min
	Draw position	2.2 mm
	Wait time after drawing	2.0 s
	Sample flush out factor	5.0
	Injection mode	standard
	Injection volume	1 $\mu$ L
	Stop time	as pump
<b>Binary pump</b>	Flow	0.2 mL/min
	Stroke mode	synchronized
	Low pressure limit	0 bar
	High pressure limit	500 bar
	Max flow ramp up	100 mL/min <sup>2</sup>
	Max flow ramp down	100 mL/min <sup>2</sup>
	Stop time	32 min
	Post time	4 min
<b>Column</b>	Column temp.	25°C

## Materialer og metoder

<b>mobile phase</b>	A	0.1% maursyre i H <sub>2</sub> O	
	B	0.1% maursyre i ACN	
	Gradient program:		
	<u>Time (min)</u>	<u>Component A/B</u>	
	Start	98.2 % A : 1.8 % B	
	3	98.2 % A : 1.8 % B	
	20	88 % A : 12 % B	
	25	70 % A : 30 % B	
	28	20 % A : 80 % B	
	30	20 % A : 80 % B	
	32	98.2 % A : 1.8 % B	
<b>DAD (detector)</b>	Peakwidth	>0.013 (0.25 s respons time) (20 Hz)	
	UV lamp	on	
	Analog 1 zero offset	5 %	
	Analog 1 attenuation	1000 mAU	
	Margin for negative absorbance	100 mAU	
	Autobalance	yes	
	Autobalance postrun	no	
<b>spectrum</b>	Spectrum range WL from	190.0 nm	
	Spectrum range WL to	640.0 nm	
	Spectrum step	2.0 nm	
	Spectrum store	all	
	Stoptime	as pump	
	<u>Signal table:</u>	<u>WL</u>	<u>Bandwidth</u>
	1-signal A	530 nm	4.0 nm
	2-signal B	474 nm	4.0 nm
	3-signal C	535 nm	4.0 nm
	4-signal D	285 nm	4.0 nm

### 2.6.3 MS metodeinnstillinger

LC-MS ble benyttet til kvalitativ analyse av betalainer. HPLC-innstillinger fra Tabell 2.1 ble brukt også her, med unntak av injeksjonsvolum som ble endret til 6  $\mu$ L. MS ble satt i positiv skann-modus i området  $m/z$  100-1700 med skannhastighet 1 spekter/sekund. Det ble laget en database i analyseprogrammet MassHunter over kjente forbindelser i *Beta vulgaris* og deres masser. Det ble søkt etter matchende forbindelser fra databasen i det totale ionekromatogrammet til rødbeteekstraktet. Innstillinger for Q-TOF kan sees i Tabell 2.6.

Tabell 2.6: Innstillinger for MS-instrument.

<b>TOF/q-tof</b>	Component name	MS Q-TOF
	Ion source	dual ESI
	<b>Aquisition mode MS1</b>	
	Min range ( $m/z$ )	100
	Max range ( $m/z$ )	1700
	Scan rate (spectra/sec)	1.00
	<b>Instrument parameters</b>	
	Parameter	Value
	Gas temp ( $^{\circ}$ C)	325
	Gas flow (L/min)	11
	Nebulizer (psig)	25
	Scan segments # Ion polarity	
	1 positive	
	Scan source parameters	Value
	VCap	3500
	Fragmentor	150
	Skimmer	50
	OctopoleRFPeak	750

## Materialer og metoder

	<u>AutoRecalibration</u>	
	Average scans	1
	Detection window (ppm)	100
	Min height (counts)	1000

### 2.7 Validering av metoden

Det bør ikke være ikke være for stor forskjell mellom parallellene i et forsøk og helst bør RSD ligge under 5%. Ved repetisjon av forsøk bør RSD heller ikke overstige 5%. Standardavviket er et mål på presisjon og bør være så lavt som mulig. Målt konsentrasjon versus teoretisk konsentrasjon kan si noe om nøyaktigheten til metoden.

### 2.8 Beregninger og statistikk

Beregning av gjennomsnittsverdi, standardavvik og relativt standardavvik i prosent, samt ANOVA, two sample t-test og regresjonsanalyse ble utført med Microsoft Office Excel 2016. Signifikansverdien i alle statistiske tester ble satt til 0,05.

### 3. Resultater og diskusjon

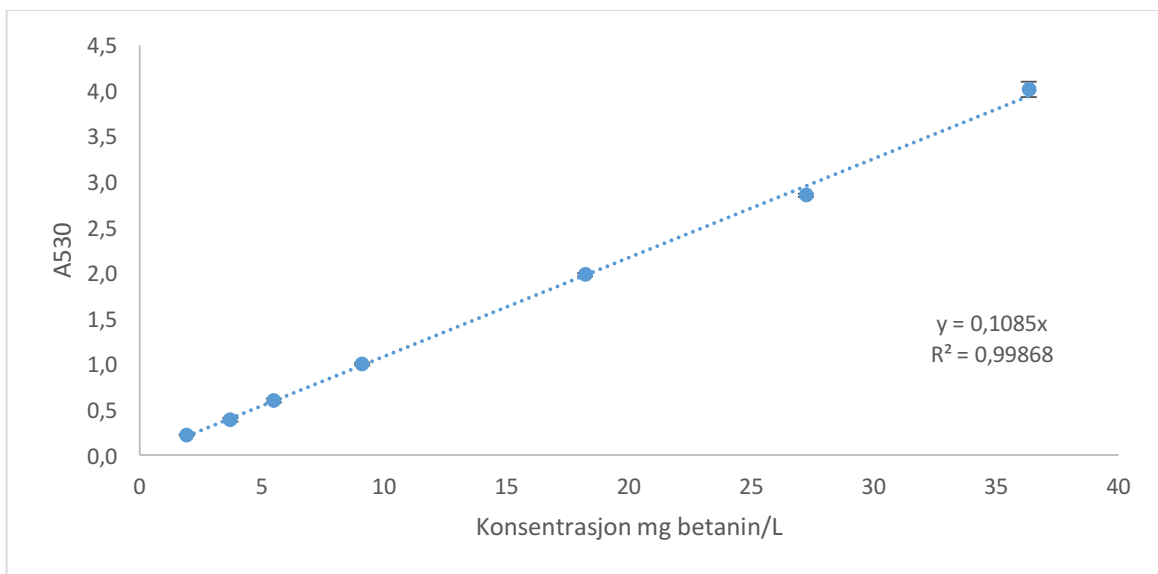
#### 3.1 Metodeutvikling

##### 3.1.1 Referanser og standarder

###### 3.1.1.1 Betaninstandard

Betanin fra rødbete fortynnet med dekstrin fra Sigma-Aldrich ble kjøpt inn som standard. Fordi betaninpulveret var blandet med en ukjent mengde dekstrin var det ikke mulig å bruke standarden for kvantitativ analyse på HPLC. Det var allikevel mulig å bruke den som en kvalitativ standard for å identifisere de ulike delkomponentene (betalainene) ved bruk av retensjonstider og arealintegrering (størrelse på toppene).

Standardkurve ble laget ut fra spektrofotometermålingene i Tabell 3.1, ved å benytte ekstinksjonskoeffisienten for fargestoffet for å omregne den målte absorbanverdien til den sanne konsentrasjonen (Formel 2.2). Hver konsentrasjon ble laget to ganger for å sjekke presisjonen. Gjennomsnittet av de fem standardene ble brukt til å beregne den mest nøyaktige verdi for konsentrasjon av betanin. Betaninstandardene viste seg å være fortynnet 1:554 betanin/dekstrin. Figur 3.1 viser standardkurven for den sanne konsentrasjonen betanin.

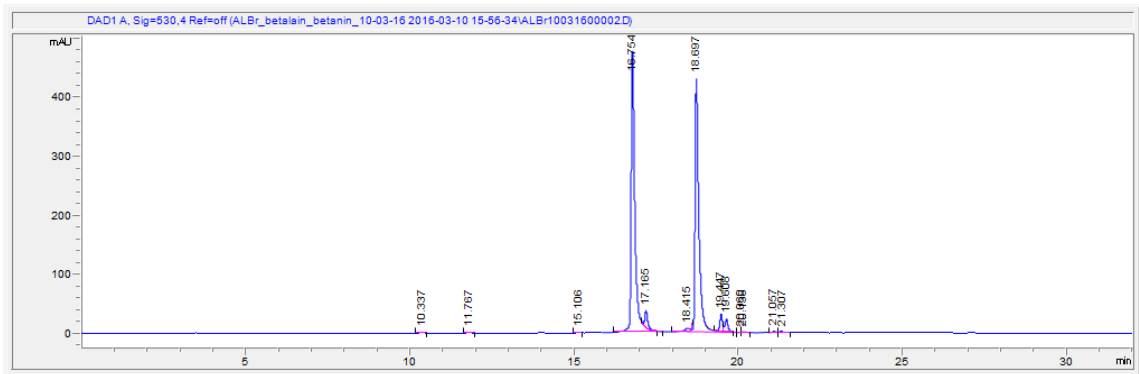


Figur 3.1: Standardkurve for betaninstandard målt på spektrofotometer ved  $\lambda=530$  nm. Konsentrasjonene er regnet ut ved hjelp av  $\epsilon$ .  $n=2$  for hvert målepunkt.

Standardkurven er lineær mellom 1,9 og 36 mg/L. Dette betyr at absorban i dette området egner seg for kvantifisering av betalainer. RSD ble beregnet for målepunktene og alle lå under 5%, bortsett fra ved den nest laveste konsentrasjonen hvor RSD var 5,3%. Dette er å forvente, siden innveing av små mengder standardmateriale (mindre enn 5 mg) vil innebære større usikkerhet. Presisjonen i utveing av standard var imidlertid god nok til å kunne brukes i de videre studiene fordi standardkurven hadde høy rettlinjert korrelasjon i det ønskede måleområdet ( $R^2 = 0,998$ ).

## Resultater og diskusjon

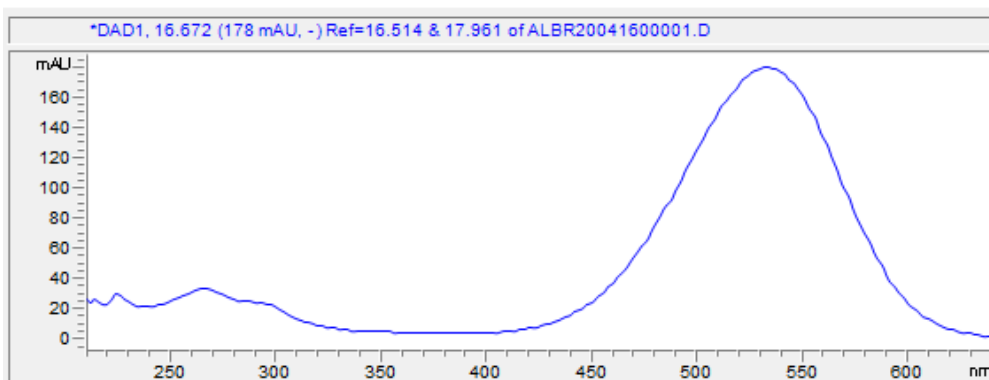
For å få en oversikt over de ulike bestanddelene som gir absorpsjon ved 530 nm i betaninstandarden ble denne analysert på HPLC-UV-Vis (Figur 3.2).



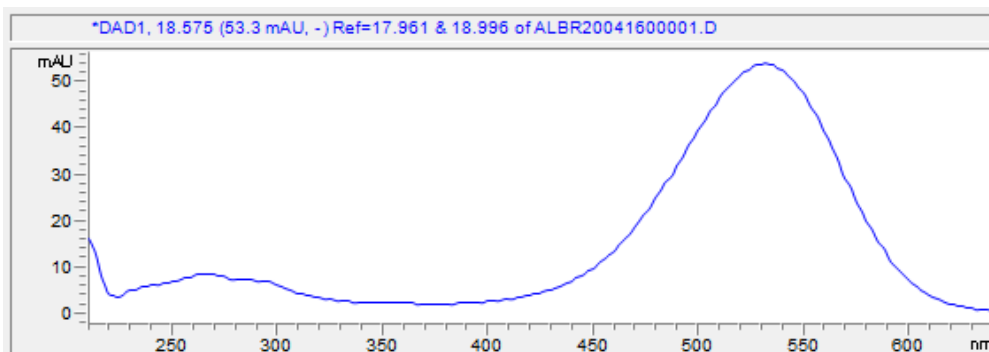
Figur 3.2: Betaninstandard med konsentrasjon 40 mg/mL. 25% meOH som løsemiddel.  $\lambda=530$  nm.

I Figur 3.2 er det tydelig to høye topper med retensjonstid 16,7 og 18,7 min og i tillegg noen mindre topper som antageligvis er andre typer betalainer. Disse er så små at de utgjør veldig lite av totalarealet og ble derfor sett bort ifra. Topp med retensjonstid 16,7 utgjør ca. 47% og topp med retensjonstid 18,7 min utgjør ca. 44% av totalarealet ved 530 nm.

Spektrene fra de to største toppene i Figur 3.2 ble hentet ut og vises i Figur 3.3, (retensjonstid 16,7 min) og Figur 3.4 (retensjonstid 18,7 min). Spektrene viser at absorpsjonsmaksimum er 530 nm for begge toppene.



Figur 3.3: UV-Vis spekter av topp med retensjonstid 16,7 min i betaninstandard.



Figur 3.4: UV-Vis spekter av topp med retensjonstid 18,7 min i betaninstandard.

## Resultater og diskusjon

Mengde betanin i mg/L ble beregnet ved hjelp av Formel 2.2 og vises i Tabell 3.1. Tabellen viser også målt absorpsjon og beregnet fortynningsfaktor for hver prøve, samt gjennomsnittlig fortynningsfaktor.

Tabell 3.1: Absorbans for betaninstandard målt på spektrofotometer ved 530 nm. Sann konsentrasjon av betanin ble regnet ut ved hjelp av ekstinksjonskoeffisienten.

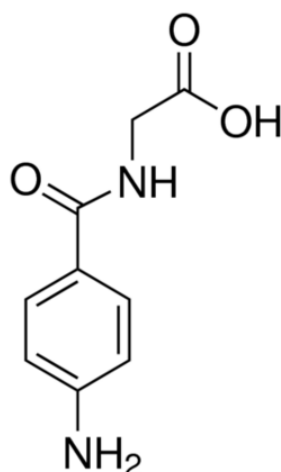
Std. rekke	Prøve	A <sub>530</sub>	Sann konsentrasjon betanin (mg/L)	Fortynningsfaktor DF (dekstrin)
A	1	0,220	2,06	520,2
	2	0,372	3,41	595,2
	3	0,581	5,32	567,2
	4	0,986	9,04	561,1
	5	1,961	17,97	559,7
	6	2,828	25,92	582,1
	7	3,927	36,00	561,1
B	1	0,224	2,02	530,6
	2	0,413	3,78	549,6
	3	0,623	5,71	537,6
	4	1,015	9,31	540,5
	5	1,991	18,25	556,1
	6	2,865	26,26	576,9
	7	4,097	37,55	536,3
	Gjennomsnitt			555,3 ± 20,3

Resultatene viser tilfredsstillende reproduserbarhet mellom de to uavhengig tillagede standarddrikkene (RSD < 5%).

### 3.1.1.2 Internstandard PAH

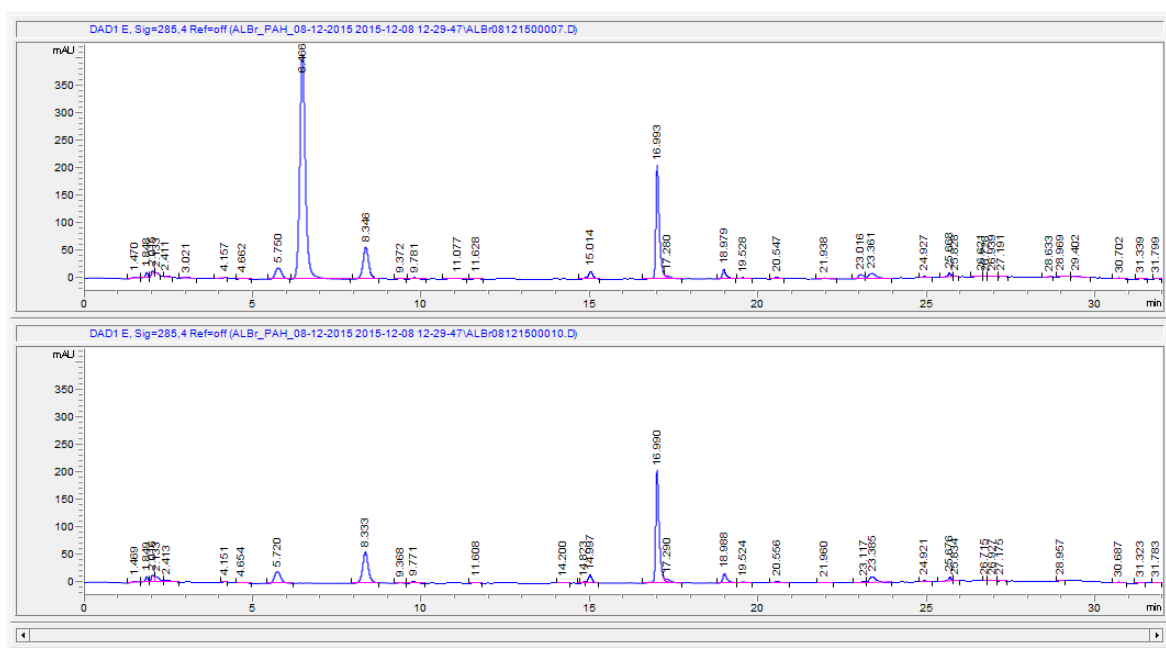
I denne oppgaven ble para-aminohippursyre (PAH) brukt som internstandard (istd.) for å få et omtrentlig mål på hvor effektiv ekstraksjonen av fargestoff var. Den fungerte også som en referanse for retensjonstider ved RT drift, siden betalaintoppene forflyttes samme antall min som PAH. PAH er ikke toksisk (i normale mengder) og brukes vanligvis til å undersøke nyrefunksjon hos dyr og mennesker (Baccard et al., 1999). Grunnen til at denne forbindelsen ble valgt som internstandard var fordi det er vannløselig og er et kjent stoff med noen strukturelligheter med betalain ved at den er aromatisk og har en syre- og aminogruppe (Figur 3.5).

## Resultater og diskusjon



Figur 3.5: Strukturformel for para-aminohippursyre PAH (Sigma-Aldrich).

Før PAH kunne benyttes som internstandard var det nødvendig å undersøke hvilken retensjonstid forbindelsen hadde, at det ikke overlappet med noen av toppene i rødbete-ekstraktet og at retensjonstiden var separert fra betalaintoppene. Det ble også sjekket at den ikke hadde interfererende effekt på betalainene. PAH ble målt ved 285 nm i henhold til beskrivelse i Baccard *et al.* (1999). Figur 3.6 viser prøve med og uten PAH.

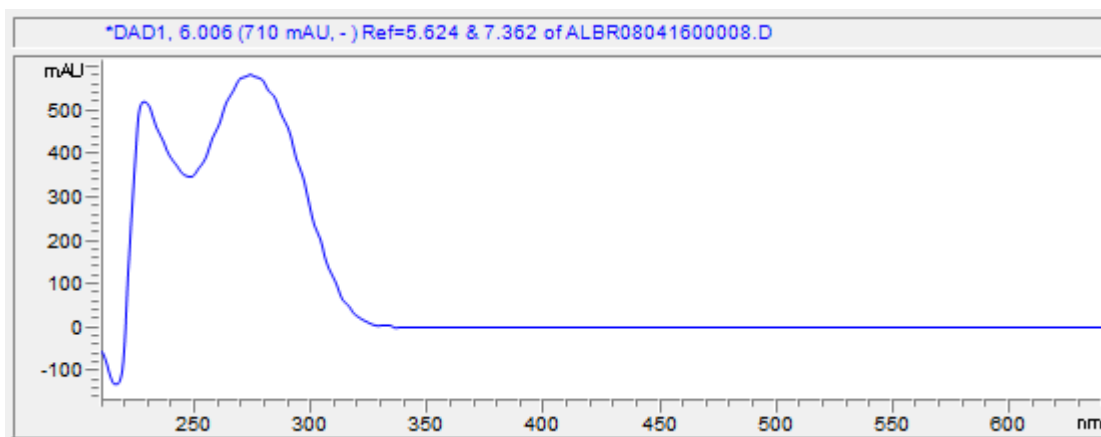


Figur 3.6: Rødbeteekstrakt tilsatt para-aminohippursyre (PAH) (øverst) og samme prøve uten PAH (nederst) målt ved  $\lambda=285$  nm.

De to kromatogrammene i Figur 3.6 viser ingen forskjell bortsett fra PAH-toppene med retensjonstid ca. 6,5 min. Denne toppen er kun synlig ved 285 nm og ikke ved de andre bølgelengdene (Figur 3.7). PAH ser ikke ut til å påvirke høyden eller formen til de andre toppene og er grunnlinjeseparert fra de nærmeste toppene. Kromatogrammene indikerer klart at PAH ikke binder til betalainene og dermed påvirker resultatene. PAH-toppene har også retensjonstid rett ved noen av betalaintoppene.



## Resultater og diskusjon



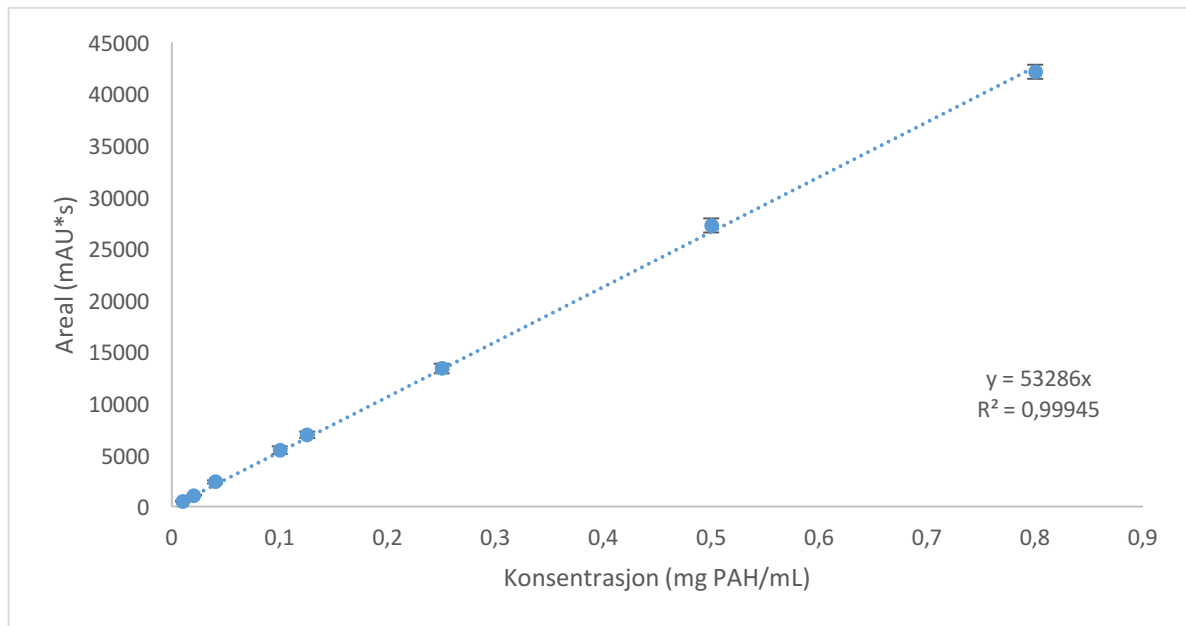
Figur 3.7: UV-Vis spekter av para-aminohippursyre.

Fra tre ulike stamløsninger PAH ble det laget fortynningsrekker som ble analysert på HPLC i samme sekvens som ekstraherte prøver. De tre fortynningsrekkene ble analysert på tre forskjellige dager i tillegg til at en av fortynningsrekkene ble analysert på nytt en fjerde dag, til sammen fire ganger. Det ble regnet ut gjennomsnittsareal, standardavvik og relativt standardavvik i prosent for hver konsentrasjon Tabell 3.2. En standardkurve ble beregnet fra verdiene i tabellen (Figur 3.8).

Tabell 3.2: Areal i mAU\*s med standardavvik og relativt standardavvik i prosent for ulike konsentrasjoner av para-aminohippursyre (PAH) målt ved  $\lambda=285$  nm på HPLC.  $n=4$  for hver konsentrasjon.

Prøve	Konsentrasjon (mg/mL)	Areal $\pm$ 1 SD	% RSD
1	0,01	536 $\pm$ 37	6,9
2	0,02	1114 $\pm$ 31	2,7
3	0,04	2423 $\pm$ 134	5,5
4	0,1	5481 $\pm$ 385	7,0
5	0,125	6977 $\pm$ 312	4,5
6	0,25	13403 $\pm$ 481	3,6
7	0,5	27265 $\pm$ 669	2,5
8	0,8	42129 $\pm$ 703	1,7

## Resultater og diskusjon



Figur 3.8: Standardkurve for para-aminohippursyre målt på HPLC ved  $\lambda=285$  nm.  $n=4$  for hvert målepunkt.

Standardkurven i Figur 3.8 viser at absorbansen til PAH er lineær for konsentrasjoner mellom 0,01 og 0,8 mg/mL ( $R^2 = 0,999$ ). Dette viser at innveinger av PAH er presise.

### 3.1.2 Etablering av ekstraksjonsmetode for betalainer i beter

En ekstraksjonsmetode av fargestoff fra rødbete skulle utvikles og målet var enklest mulig fremgangsmåte med minst mulig tap av prøvemateriale. Ulike prøveopparbeidelsesmetoder viste seg å være nødvendig ettersom prøvene skulle fryses, frysetørkes eller ekstraheres umiddelbart.

#### 3.1.2.1 Homogenisering

Polytron® ble benyttet til homogenisering i alle tilfeller. Ultralydbad ble også testet for homogenisering, men visuelt så ikke ut til at resultatet ble noe bedre enn ved bruk av kun Polytron®, da ekstraktene hadde like sterk farge i begge tilfeller. Av den grunn ble ultralydbad droppet.

#### 3.1.2.2 Sentrifugering

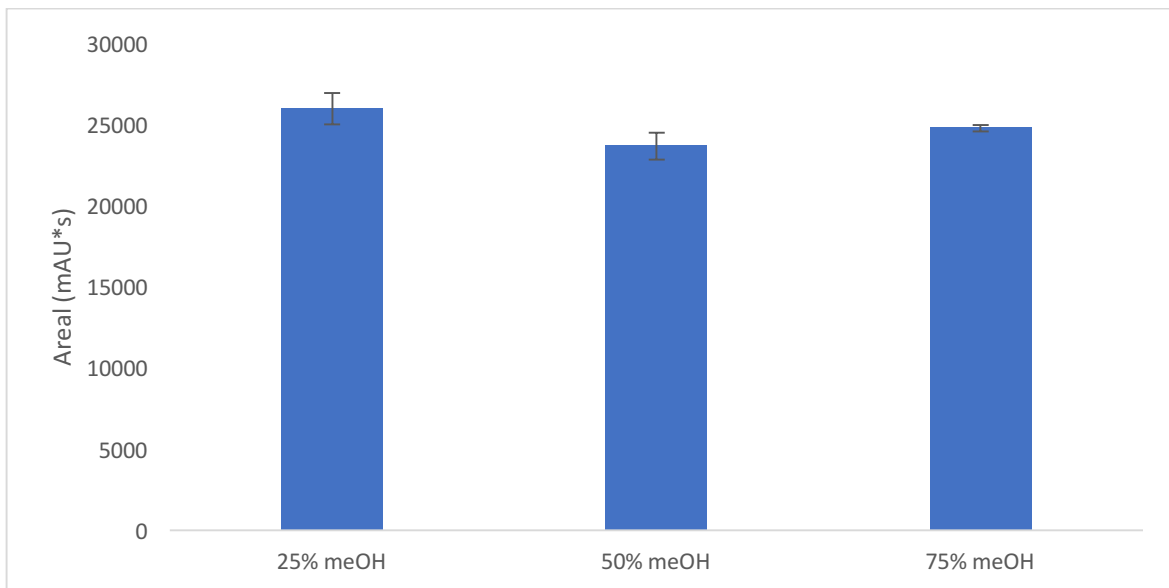
For å skille det faste rødbetematerialet fra ekstraktet var sentrifugering et naturlig valg. Det ble først testet ut sentrifugering ved  $4^{\circ}\text{C}$  og 2000 g i 5 min (lavhastighetssentrifuge), men denne betingelsen førte til at pelleten ble løs og gjorde det vanskelig å dekantere supernatanten. Antall g ble derfor økt til 3000 og 10 min, men fortsatt var pelleten lite fast. Antall g ble derfor økt ytterligere, til 39 000 g (høyhastighetssentrifuge), som ga en mye bedre pellet. Sentrifugeringstiden ble holdt ved 10 min for at ikke ekstraksjonen skulle ta for lang tid. Muligens burde sentrifugeringstiden blitt forlenget ytterligere. Pellet var fortsatt ved noen tilfeller litt for løs for fullstendig dekantering, men kanskje hadde dette gått på bekostning av ekstrahert fargemengde grunnet mulig degradering av fargestoffet over tid.

### 3.1.2.3 Løsemiddel/bete-ratio

Mengde løsemiddel er avgjørende for hvor mye fargestoff som er mulig å ekstrahere uten at løsningen blir mettet. De Azeredo *et al.* (2009) har i sin artikkel studert optimal ekstraksjon av betalainer fra rødbete med vann, og denne ble derfor brukt som et utgangspunkt for å finne beste løsemiddel/bete-ratio. Det ble først testet med en løsemiddel/bete-ratio på 3:1. Omtrent 10 gram bete ble veid inn og 30 mL løsemiddel bestående av en blanding av meOH og MilliQ-vann ble tilsatt før homogenisering og sentrifugering. Ved denne ratioen var det nødvendig med mer enn fire ekstraksjonstrinn for å få en nærmest fargeløs pellet. I neste omgang ble løsemiddel/bete-ratio 5:1 testet med akkurat samme fremgangsmåte. 5 gram bete ble veid inn og løst i 25 mL løsemiddel. Fire ekstraksjonstrinn var da nok for å få en visuelt fargeløs pellet og denne ratioen ble derfor benyttet til videre forsøk.

### 3.1.2.4 Blandingsforhold mellom metanol og vann i løsemiddel

I følge Delgado-Vargas *et al.* (2000) er det nødvendig med enten metanol eller etanol for å få en fullstendig ekstraksjonen av fargestoffet fra rødbetematerialet. Dette er mest sannsynlig fordi noen av stoffene ikke løses like godt i vann, men kan ekstraheres ved hjelp av en metanol/vann-blanding, siden metanol også har evnen til å løse noen mindre polare forbindelser. Vann er helt klart det billigste og minst toksiske alternativet, så det hadde vært en stor fordel om det var mulig å bruke rent vann til ekstraksjon. Løsemiddel med 25%, 50% og 75% metanol i vann (v/v) ble testet i ekstraksjonsforsøk. Metode 2 for prøveopparbeidelse og betar lagret ved  $-80^{\circ}\text{C}$  (avsnitt 2.4.2), samt ekstraksjonsmetode 2 (avsnitt 2.5.2) ble benyttet i forsøket. Figur 3.9 viser resultatet etter HPLC-UV-Vis analyse for ekstrakter med de ulike løsemidlene.



Figur 3.9: Areal for betanintopp ved  $\lambda=530$  nm målt på HPLC ved ekstraksjon med ulike mengder meOH i løsemiddelet.  $n=3$ ,  $n=3$  og  $n=4$  for henholdsvis 25%, 50% og 75% meOH.

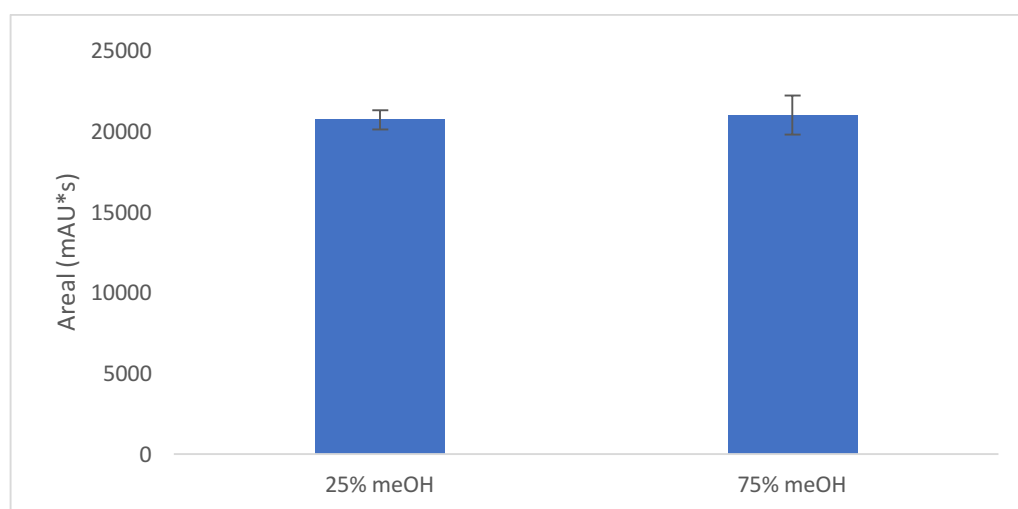
Det ble utført en ANOVA Single Factor-analyse for å sjekke om det var signifikant forskjell i betanintoppareal mellom de forskjellige løsemidlene. Det ble funnet en signifikant forskjell i utbytte av betalainer (ANOVA;  $df=2$ ,  $P=0,015$ ). Gruppene med 25% og 75% meOH var ikke signifikant forskjellige (t-test;  $df=5$ ,  $P=0,053$ ), men både 25% og 75% meOH var signifikant forskjellige fra 50% meOH (t-test;  $df=4$ ,  $P=0,036$  og  $df=5$ ,  $P=0,0496$ ). At 75% meOH utbyttet ble tilnærmet like høyt som 25% var overraskende, men i videre forsøk ble 25% meOH

## Resultater og diskusjon

benyttet siden utbyttet var like høyt, samtidig som det var det billigste og minst toksiske alternativet. Det hadde vært interessant å prøve ut en ekstraksjon med lavere konsentrasjon metanol (< 10%) eller en med rent vann for både å se om det kan gi et høyere utbytte av betalainer, og om det vil føre til at noen forbindelser ikke blir ekstrahert, vist som ulikheter i HPLC-kromatogrammene.

### 3.1.2.5 Internstandard i ekstrakter med ulike mengder meOH i løsemiddelet

For å sjekke hvor effektiv ekstraksjonen av betalainer var, ble internstandard tilsatt prøvene ekstrahert med 25% og 75% meOH løsemiddel. Prøvene ble analysert på HPLC-UV-Vis og Figur 3.10 viser PAH-arealene ved 285 nm.



Figur 3.10: Sum av areal for para-aminohippursyre-topp ved  $\lambda=285$  nm ved ekstraksjon med ulike mengder meOH i løsemiddelet. n=3

Det var ingen signifikant forskjell i PAH areal mellom 25% og 75% meOH i løsemiddelet (t-test; df=5, P=0,73). Det betyr at like mye PAH ble gjenfunnet i de to prøvene.

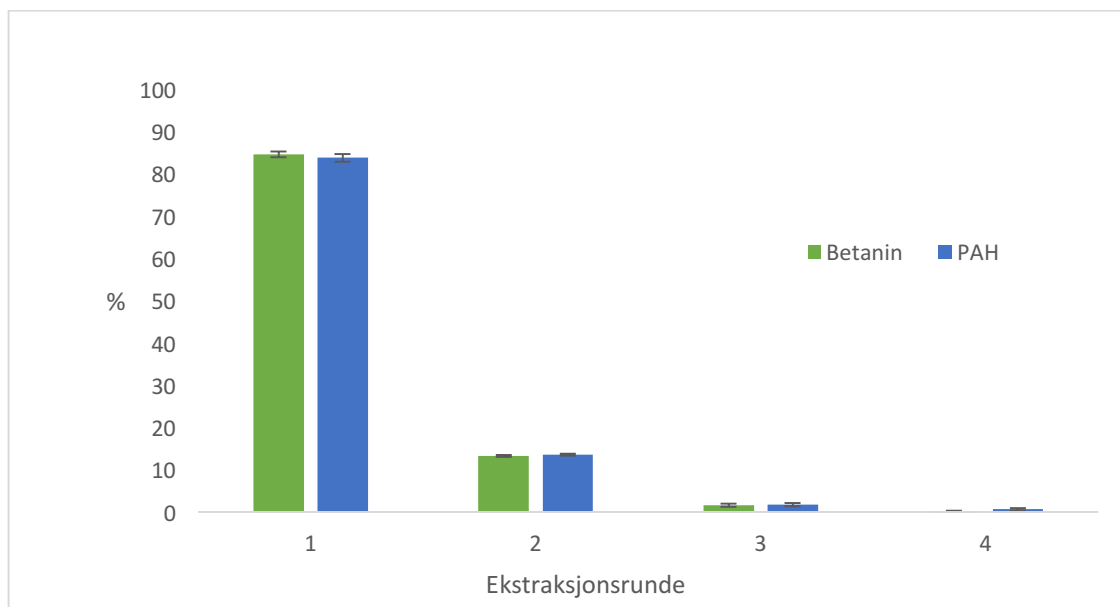
Hvor mye PAH som ble gjenfunnet i 1.ekstraksjonsrunde ble beregnet ved hjelp av Formel 2.1 fra PAH standardkurve (Figur 3.8) og vises i Tabell 3.3. Totalmengden ekstrahert kunne ikke regnes ut fordi informasjon om mengde gjenværende løsemiddel i pellet ikke ble registrert. Data finnes i avsnitt Tabell 7.1 i appendiks.

Tabell 3.3: Oversikt over tilsatt mengde para-aminohippursyre (PAH) i mg og gjenfunnet mengde PAH i mg og % for 1. ekstraksjonsrunde. n=3

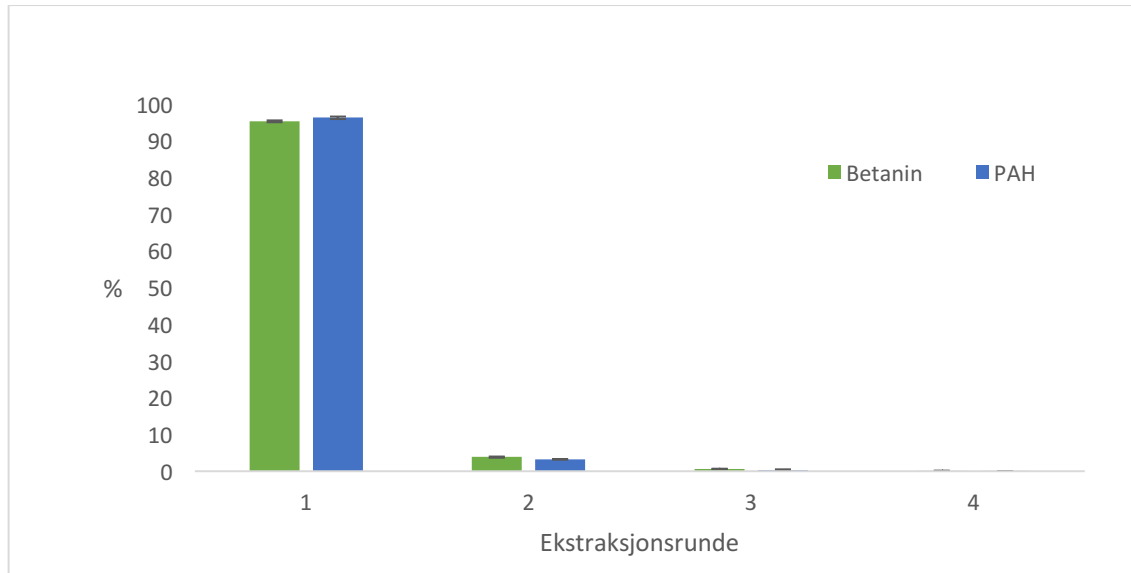
Prøve	Tilsatt PAH (mg)	Gjenfunnet mengde (mg) $\pm$ SD	% RSD	% gjenfunnet
25% meOH	12,50	9,5 $\pm$ 0,1	1,1	76
75% meOH	12,53	11,1 $\pm$ 0,5	4,5	88

## Resultater og diskusjon

Det ble også undersøkt hvor mange % betanin og PAH av total mengde ekstrahert stoff som ble funnet i hver ekstraksjonsrunde for å se på effektiviteten av ekstraksjonen. 25% meOH ble analysert i første forsøk (Figur 3.11) og 75% meOH ble analysert i andre forsøk (Figur 3.12).



Figur 3.11: Prosentandel betanin/para-aminohippursyre (PAH) ekstrahert for hver ekstraksjonsrunde ved hjelp av løsemiddel med 25% meOH. Betanin målt ved  $\lambda=530$  nm og PAH målt ved  $\lambda=285$  nm. n=3



Figur 3.12: Prosentandel betanin/para-aminohippursyre (PAH) ekstrahert for hver ekstraksjonsrunde ved hjelp av løsemiddel med 75% meOH. Betanin målt ved  $\lambda=530$  nm og PAH målt ved  $\lambda=285$  nm. n=4

Fargestoffet i prøvene fra ekstraksjonsrunde 4 er visuelt detekterbar for begge ekstraksjoner ved at det er en svak rosa farge på ekstraktet. Fra Figur 3.11 og Figur 3.12 er det tydelig likhet i prosentandelene av betanin og PAH er i hver ekstraksjonsrunde. Siden PAH ikke er bundet til rødbete i prøven skulle første ekstraksjon teoretisk sett gitt nært 100% utbytte i begge tilfeller. Grunnen til at det er gjenværende PAH i ekstraksjonsrunde 2, 3 og 4 viser at dekantering av supernatanten ikke har vært fullstendig. Grunnen til dette var at pelletet ikke var

fast nok til at all supernatant kunne fjernes uten at pelletet også fulgte med og prøvemateriale gikk tapt. Resultatet var 1-3 mL gjenværende supernatant før neste ekstraksjonsrunde. At betanin følger samme ekstraksjonsmønster som PAH illustrerer dette. Dette indikerer at første ekstraksjonsrunde vasker ut mesteparten av fargestoffet, men at en del supernatant blir igjen ved dekantering. Trinn 2, 3 og 4 er derfor heller rene vasketrinn enn ekstraksjonstrinn.

Forskjellen i utbytte i forsøkene med 25% meOH og 75% meOH ved første ekstraksjonsrunde viser bare at dekanteringen tilsynelatende er mer fullstendig for sistnevnte. Grunnen til dette er derfor sannsynligvis en mer fast pellet for 75% meOH. Det er gjenfunnet mer PAH i 75% meOH enn i 25% meOH (Tabell 3.3) noe som igjen stemmer med resultatene i Figur 3.11 og Figur 3.12 da det tydelig sitter igjen mer PAH i 2. ekstraksjonstrinn for 25% meOH. Forsøket viser at sentrifugeringshastighet og tid må optimaliseres videre for å få en mer fullstendig ekstraksjon og vask. Ekstraksjonen viser at tilnærmet 100 % betanin blir ekstrahert ved første ekstraksjonsrunde og det dokumenteres ved at PAH følger samme forløp. Konklusjonen er at med mer effektiv sentrifugering og bedre høsting av supernatant ville det vært nok med ett ekstraksjonstrinn. Filtrering kan kanskje være et alternativ til sentrifugering.

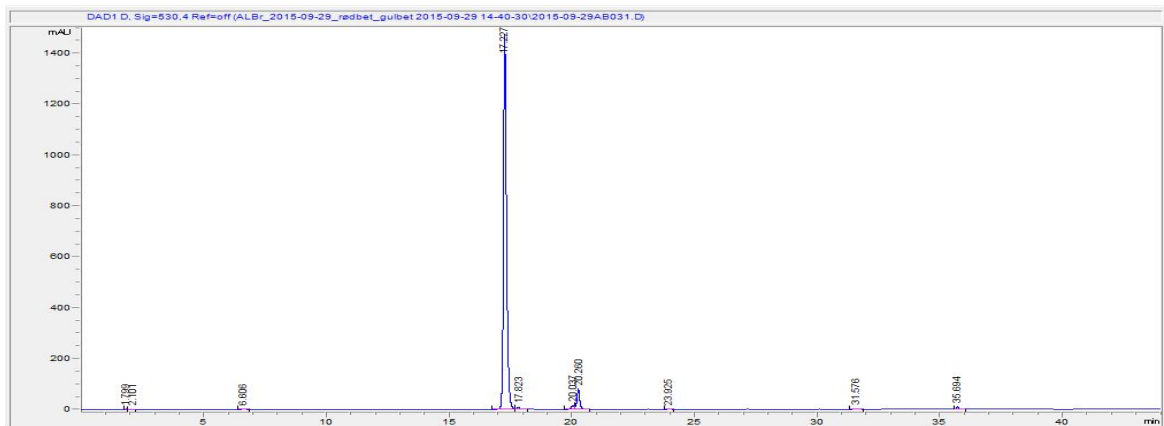
### 3.1.3 Tilpasning av HPLC-gradient og mobilfaser

#### 3.1.3.1 Mobilfaser og gradient

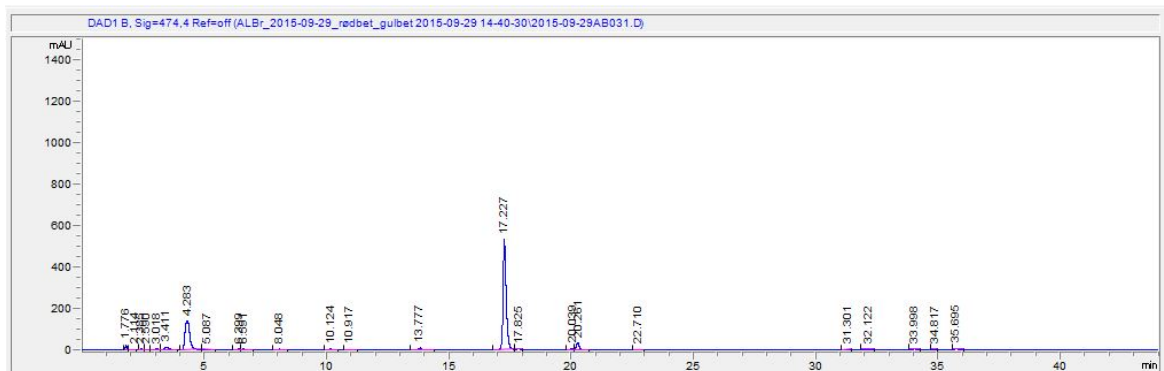
En Kinetex XB C18-reversfasekolonne ble brukt til separasjon av betalainer. Stintzing (2006), Albano (2015) og Kujala (2002) med flere har alle benyttet reversfasekolonner og oppnådd vellykket separasjon. Kinetex kolonnen tåler løsninger med pH mellom 1,5 og 8,5 og et trykk opp mot 1000 bar. Det ble ikke testet ut noen andre kolonner, siden Kinetex XB C18 viste seg å gi tilstrekkelig separasjon. Det var naturlig å velge reversfase fordi det er beskrevet i litteratur som den mest effektive måten å analysere betalainer på (Delgado-Vargas et al., 2000).

I tidligere studier av betalainer er det stort sett benyttet mobilfaser med vann og ACN tilsatt maursyre, eller annen buffer. Det var viktig at mobilfasene kunne overføres til LC-MS og da var vann/ACN med maursyre et godt valg. Maursyre skaper ingen sterke bindinger til organiske molekyler og sørger for god pH-stabilitet og dermed bedre separasjon, uten at ioniseringen i MS blir forhindret (ProteoChem, 2016). Det er også en flyktig forbindelse noe som er et krav i MS. En buffer som trifluoracetic acid (TFA) var ikke et alternativ fordi denne kan gi interferenser i MS ved at den danner gassfaseionepar med positivt ladede analyttioner som undertrykker ESI-signalene (Shou and Naidong, 2005). Det samme gjelder for andre løsemidler med for høye elektrolyttkonsentrasjoner (Hoffmann and Stroobant, 2007). Prosentandel buffer varierer i ulike studier fra 0,1% til 5% (Stintzing et al., 2006, Yizhong Cai, 2005). Siden stabiliteten og strukturen til betalainer er pH-avhengig var det viktig at pH i mobilfasen ikke ble for lav. Det var også et mål å unngå for stor andel buffer på grunn av interferensene nevnt tidligere. Vann med 0,1% maursyre, hvor pH ble målt til 2,8, ble derfor testet ut først. Det var ønskelig at maursyrepresenten i de to mobilfasene var lik, slik at pH ikke skulle endre seg for mye med gradienten, derfor ble ACN også tilsatt 0,1% maursyre. Separasjon vises i Figur 3.13 og Figur 3.14 ved henholdsvis 530 og 474 nm.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.13: Kromatogram som viser separasjon av betalainer (betacyaniner) ved  $\lambda=530$  nm med 0,1% maursyre i vann og 0,1% maursyre i ACN som mobilfaser.

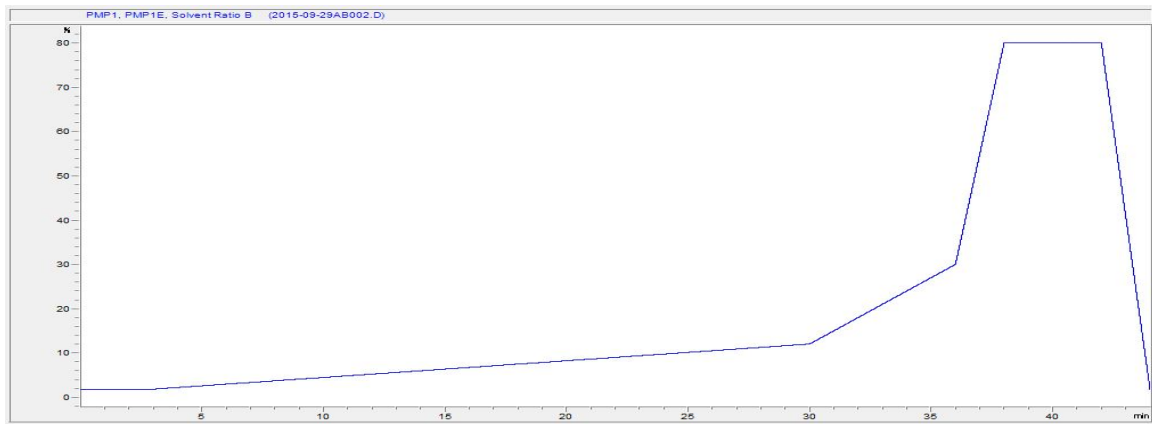


Figur 3.14: Separasjon av betalainer (betaxanthiner) ved  $\lambda=474$  nm med 0,1% maursyre i vann og 0,1% maursyre i ACN som mobilfaser.

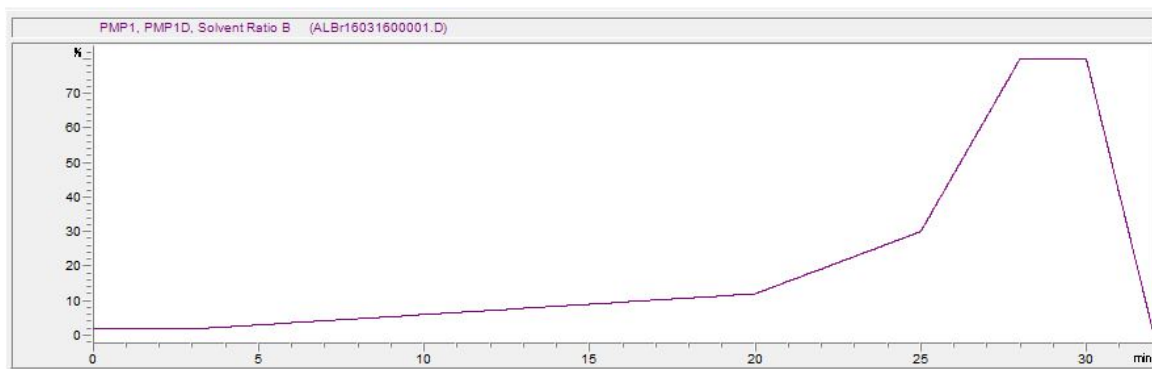
Resultatene i Figur 3.13 og Figur 3.14 viser at vann og ACN med 0,1% maursyre gir god separasjon ved gradienteluering og dermed ble disse mobilfasene benyttet i videre forsøk.

Mobilfasegradienten ble optimalisert for separasjon av topper. Lengden på analysetiden var først på 44 min (Figur 3.15), men ble kortet ned til 32 min (Figur 3.16). De første tre minuttene var isokratisk med 1,8% B, deretter ble andelen B økt til 12% over 17 min. Over 5 min ble gradienten økt til 30% B, før en rask økning til 80% B over 3 min. Deretter var elueringen isokratisk i 4 min med 80% B før andelen ble nedjustert til startmengden, 1,8% B. Ventetid mellom prøver hvor kolonnen ekvilibres med startbetingelsene ble satt til 4 min.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.15: Mobilfase B (0,1% maursyre i ACN) ratio. Gradienten går fra 1,8% B ved start til 80% B ved 38 min.



Figur 3.16: Mobilfase B (0,1% maursyre i ACN) ratio. Gradienten går fra 1,8% B ved start til 80% B ved 28 min.

Begge metodene fungerte, men den hurtigste ble valgt fordi alle betalainene kom ut innen 25 min. Stabilitet av fargestoffene var en sentral faktor som skulle undersøkes i oppgaven. Det var derfor viktig at analysemetoden var så effektiv som mulig for å kunne skille aktivitetstap fra ekstraksjonstap.

### 3.1.3.2 Kolonnetemperatur

Temperaturen på kolonnen ble satt til 25°C da separasjonen av betalainer var vellykket ved denne temperaturen.

### 3.1.3.3 Injeksjonsvolum og flow

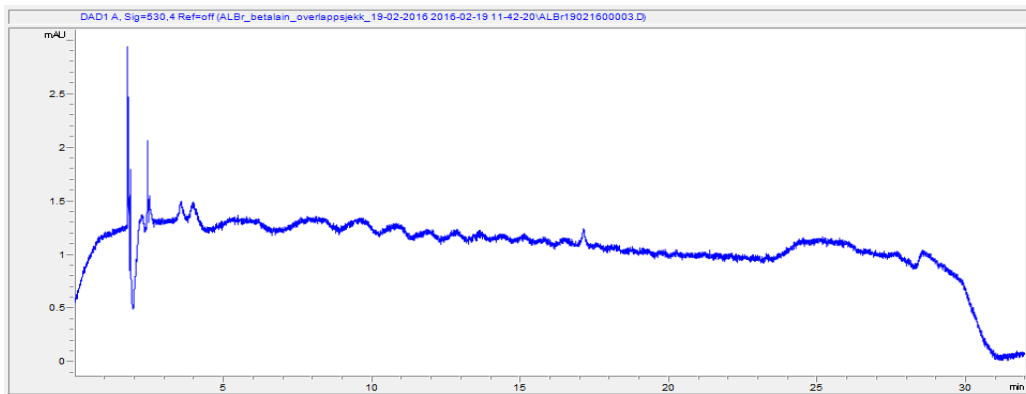
Injeksjonsvolum på HPLC ble satt til 1  $\mu\text{L}$  for å unngå for høye signaler ved kjøring av veldig konsentrerte prøver. Samtidig ble signalet på mindre konsentrerte prøver bra nok. Ved å ha så lite injeksjonsvolum var det ikke nødvendig å fortynne prøvene, og ved kvantitativ analyse kan det være en fordel å slippe fortynning som mulig feilkilde. På LC-MS ble injeksjonsvolumet økt til 6  $\mu\text{L}$  fordi prøvene her ble fortynnet på forhånd. Fortynningstrinnet her var mindre viktig siden analysen kun skulle brukes til kvalitativ informasjon og ikke kvantifisering.

Flow på 0,2 mL/min ble benyttet i alle forsøk og trykket i kolonnen lå på mellom 230 og 250 bar. Endringer i flow ble ikke testet ut, men kunne vært gjort for å prøve å korte ned tiden på analysen.

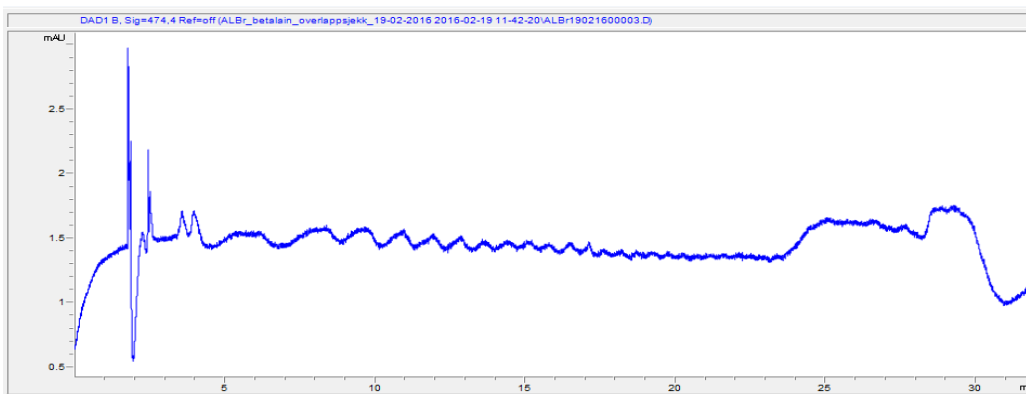


### 3.1.3.4 Kontaminering mellom prøver kjørt etter hverandre i HPLC-sekvensen

Det ble undersøkt om prøvemateriale fra en HPLC-analyse ble funnet i neste analyse ved å kjøre blank-prøve av 100% metanol mellom sample-prøvene. Figur 3.17 og Figur 3.18 viser ingen tegn til detekterbare topper ved kjøring av blank-prøven ved henholdsvis 530 og 474 nm. Det så altså ikke ut til at betalainene ble hengende igjen på kolonnen, men at alt ble vasket ut i løpet av analysesiden (run). Grunnen til at andelen ACN økes kraftig mot slutten av analysesiden er nettopp for å rense ut de mer hydrofobe stoffene som vil ha høy affinitet til stasjonærfasen i kolonnen og dermed unngå kontaminering.



Figur 3.17: Blankprøve (100% meOH) kromatogram ved  $\lambda=530$  nm.



Figur 3.18: Blankprøve (100% meOH) kromatogram ved  $\lambda=474$  nm.

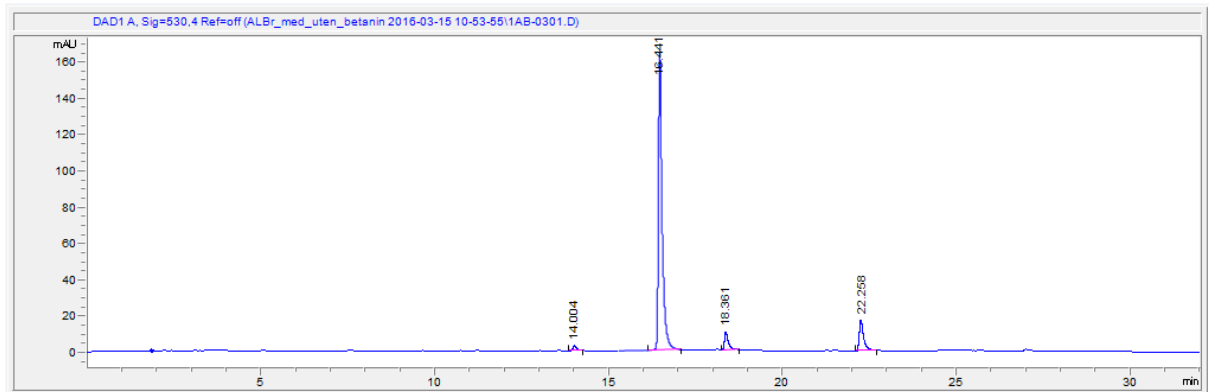
## 3.2 Kvalitativ analyse av betalainer i beter

### 3.2.1 Identifisering ved sammenligning med kommersiell betaninstandard

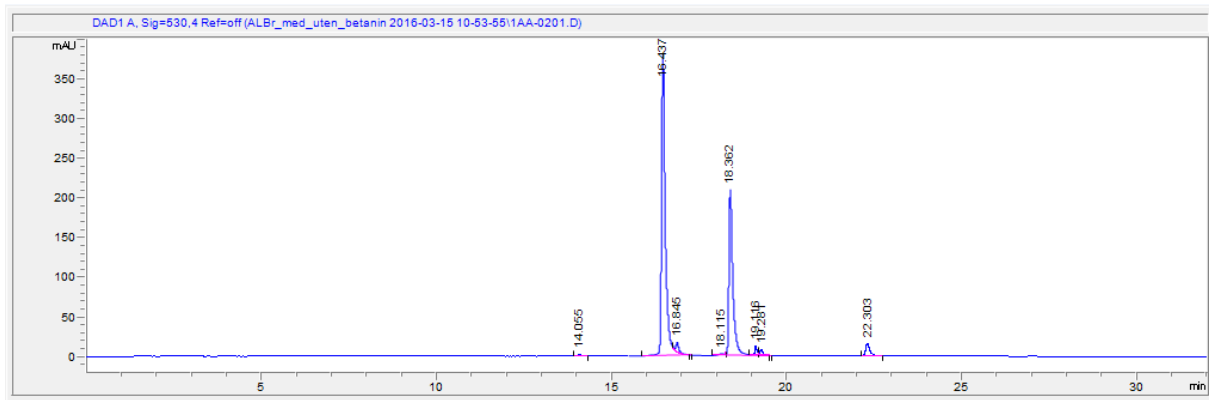
I disse forsøkene var målet å identifisere flest mulig av fargekomponentene (betalainer) i beter. Prøvene ble preparert i henhold til prøveopparbeidelse metode 1 (avsnitt 2.4.1) og ekstraksjonsmetode 1 (avsnitt 2.5.1) hvor 5 g bete ble tilsatt 25 mL løsemiddel med 25% meOH og ekstrahert fire ganger. De fire ekstraktene ble overført til HPLC-vials adskilt. Ekstrakt fra 2. ekstraksjonsrunde ble brukt.

## Resultater og diskusjon

Rødbeteekstrakt ble tilsatt betaninstandard fra Sigma-Aldrich for å undersøke om toppene i kromatogrammet samsvarte. Figur 3.19 viser rødbeteekstrakt uten betaninstandard. Figur 3.20 viser samme rødbeteekstrakt tilsatt betaninstandard.



Figur 3.19: Rødbeteekstrakt.  $\lambda=530$  nm.



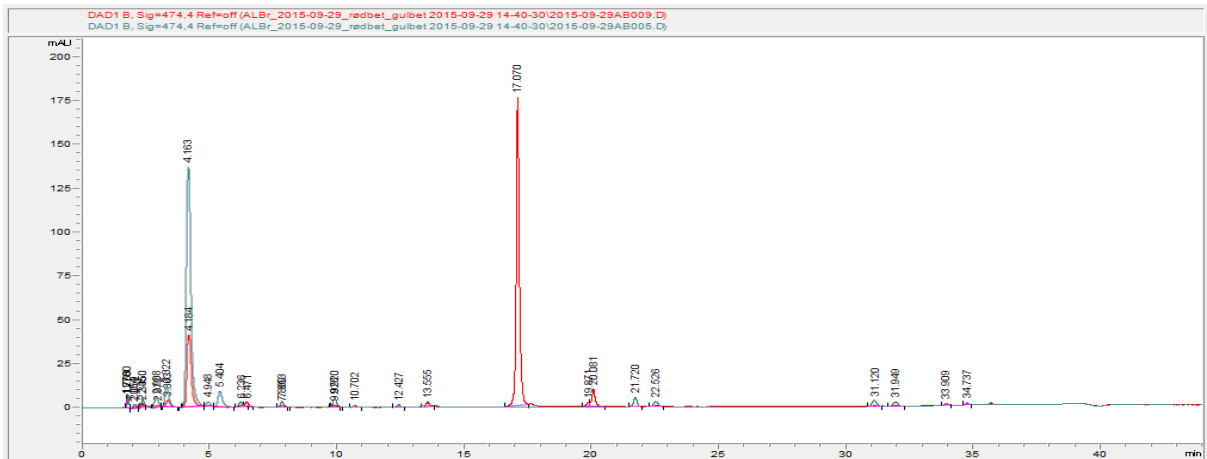
Figur 3.20: Ekstrakt fra Figur 3.19 tilsatt betaninstandard.  $\lambda=530$  nm.

Toppene i Figur 3.19 samsvarer med standarden vist i Figur 3.20. Dette viser at ekstraktet fra betene inneholdt betanin. Ekstraksjonsrekkefølgen til de to isomere strukturene betanin og isobetanin har tidligere blitt dokumentert, og det ble funnet at betanin eluerer før isobetanin (Delgado-Vargas et al., 2000). Dette betyr at toppen med retensjonstid 16,4 min mest sannsynlig er betanin, mens toppen som eluerer med retensjonstid 18,3 min mest sannsynlig er isobetanin. I ekstraherte prøver er størrelsesforholdet mellom betanintoppene annerledes enn i betaninstandard. Det er tidligere dokumentert at betalainkomponenter kan variere i andel mellom sorter (Slatnar et al., 2015), og siden det kan være brukt ulike sorter beter i betaninstandard sammenlignet med egne forsøk er dette en mulig årsak.

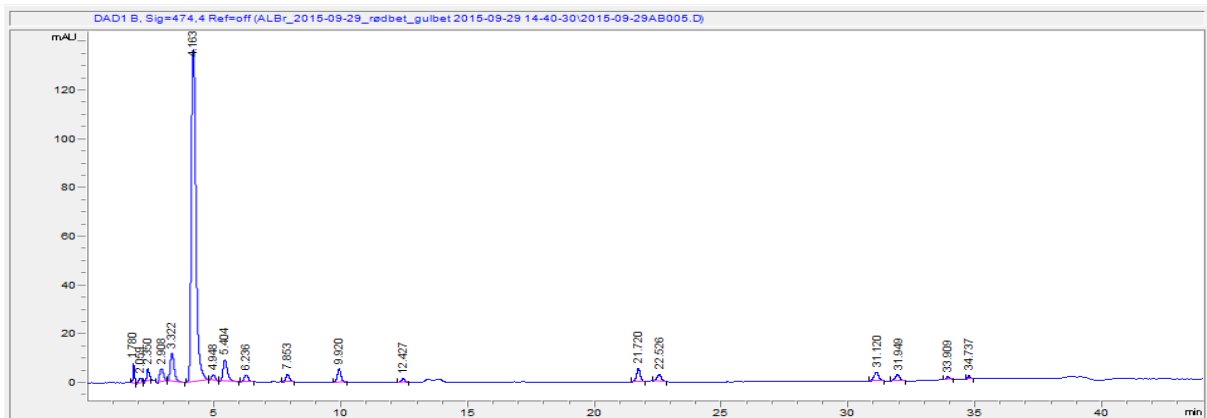
### 3.2.2 Sammenligning av gulbete og rødbete

Det ble kjørt et ekstrakt av gulbete fra 1. ekstraksjonsrunde og et annet av rødbete fra 2. ekstraksjonsrunde på HPLC. Gulbeteekstraktet var mindre konsentrert enn rødbeteekstraktet så derfor ble to ulike ekstraksjonsrunder sammenlignet for at ikke topphøyden skulle være for forskjellig. Prøvene ble preparert i henhold til prøveopparbeidelse metode 1 (avsnitt 2.4.1) og ekstraksjonsmetode 1 (avsnitt 2.5.1) hvor 5 g bete ble tilsatt 25 mL løsemiddel med 50% meOH og ekstrahert fire ganger. De fire ekstraktene ble overført til HPLC-vials hver for seg. Figur 3.21 viser spekter av begge prøvene lagt oppå hverandre, Figur 3.22 viser kromatogram av gulbete og Figur 3.23 viser kromatogram for rødbete, alle ved 474 nm.

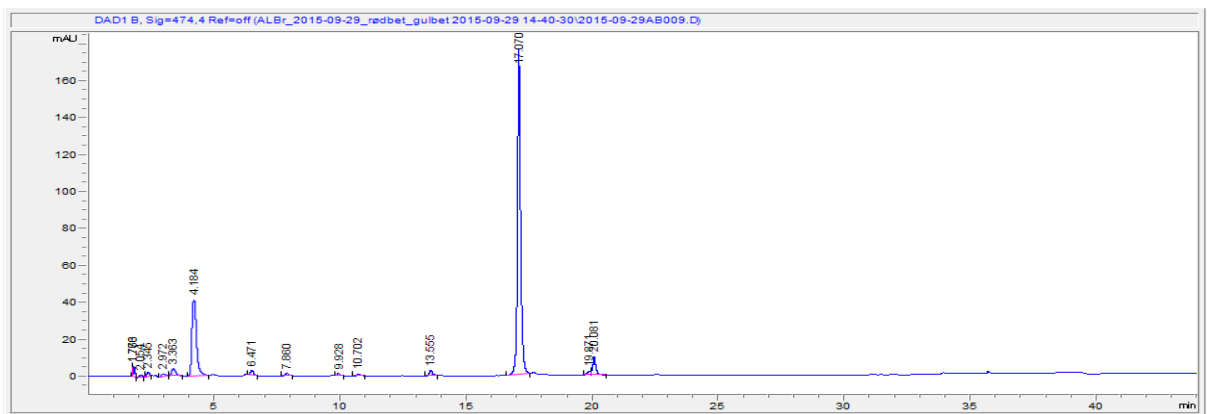
## Resultater og diskusjon



Figur 3.21: Kromatogram ved  $\lambda=474$  nm som viser både gulbete (grå) og rødbete (rød).



Figur 3.22: Gulbete  $\lambda=474$  nm.

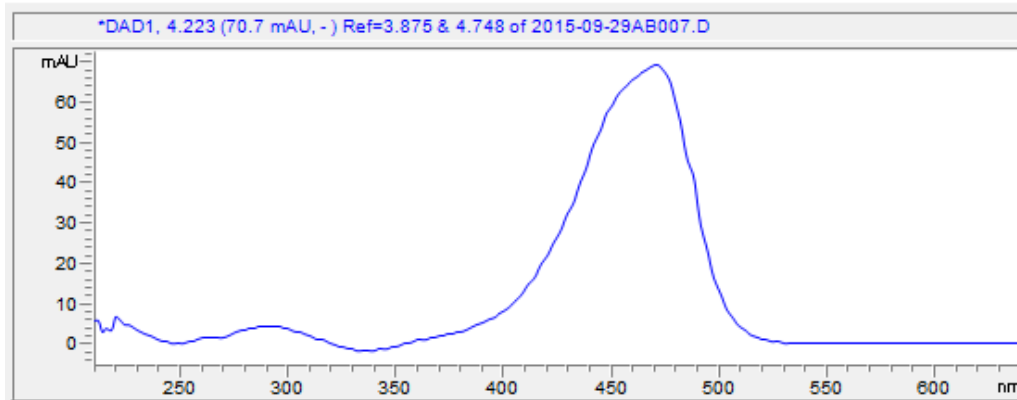


Figur 3.23: Rødbete  $\lambda=474$  nm.

Kromatogrammet i Figur 3.22 viser at det ikke er tilstede noen 17 minutters topp i gulbeten. I rødbeten er toppen med retensjonstid 17 min den høyeste ved 474 nm (Figur 3.23) og den samme toppen kan sees i kromatogrammet for 530 nm (Figur 3.19) og er derfor sannsynligvis et betacyanin. Hvis denne toppen sammenlignes med den første store toppen i betaninstandarden ser det ut til at det er samme topp. Toppene med retensjonstid 4 min er tilstede i både rødbete og gulbete, men er kun synlig ved 474 nm og er derfor en

## Resultater og diskusjon

betaxanthinforbindelse. For å være helt sikker ble UV-Vis spekteret til toppen i Figur 3.22 undersøkt nærmere, se Figur 3.24.



Figur 3.24: UV-Vis spekter av topp med retensjonstid 4 min.

Fra Figur 3.24 er det tydelig at toppen er et betaxanthin fordi den har absorpsjonsmaksimum ved 474 nm og mangler absorpsjon ved 530 nm.

### 3.1 MS analyse av rødbete

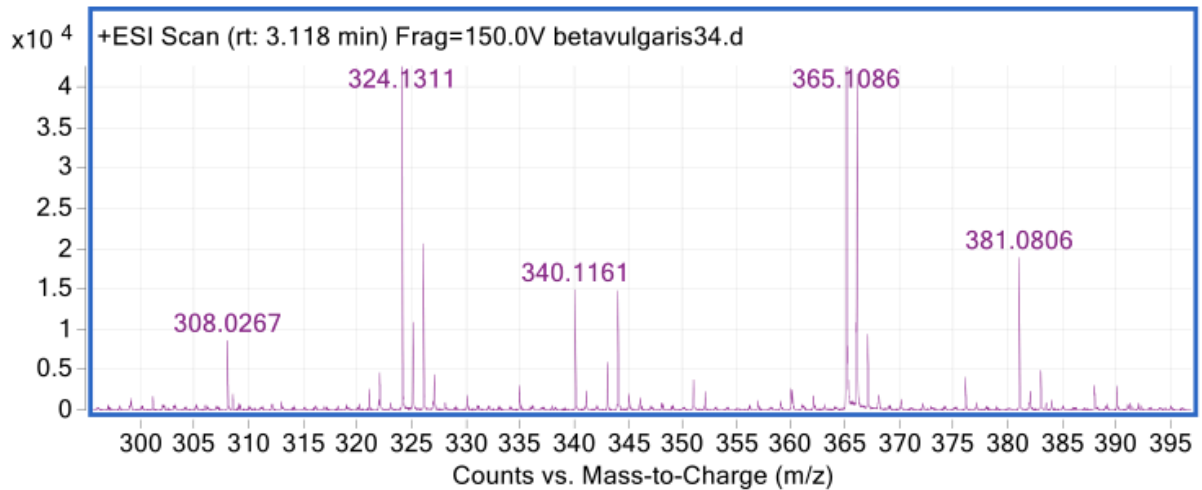
For å kunne identifisere betalainer med større sikkerhet enn ved UV-Vis deteksjon ble rødbeteekstrakt analysert med HPLC-Q-TOF. I MS identifiseres massene til analyttforbindelsene med stor nøyaktighet.

Positiv modus ble valgt til skanning, siden det ikke var noen signifikant forskjell mellom positiv og negativ modus. I tillegg protoneres nitrogenforbindelser lett i positiv modus noe som var essensielt for analysen da betalainer inneholder nitrogenatomer (Mallet, 2014). KnapSack og artikler ble benyttet for å finne kjente forbindelser i rødbete og samlet i en egen database i analyseprogrammet MassHunter. Området som ble skannet var  $m/z$  100 – 1700. Dette området inneholdt massene til betalainforbindelsene av interesse. Det var viktig at det ble registrert nok datapunkter per topp for å klare å fange opp massene til alle de separerte forbindelsene, derfor ble skanntiden satt til 1 spekter/sekund.

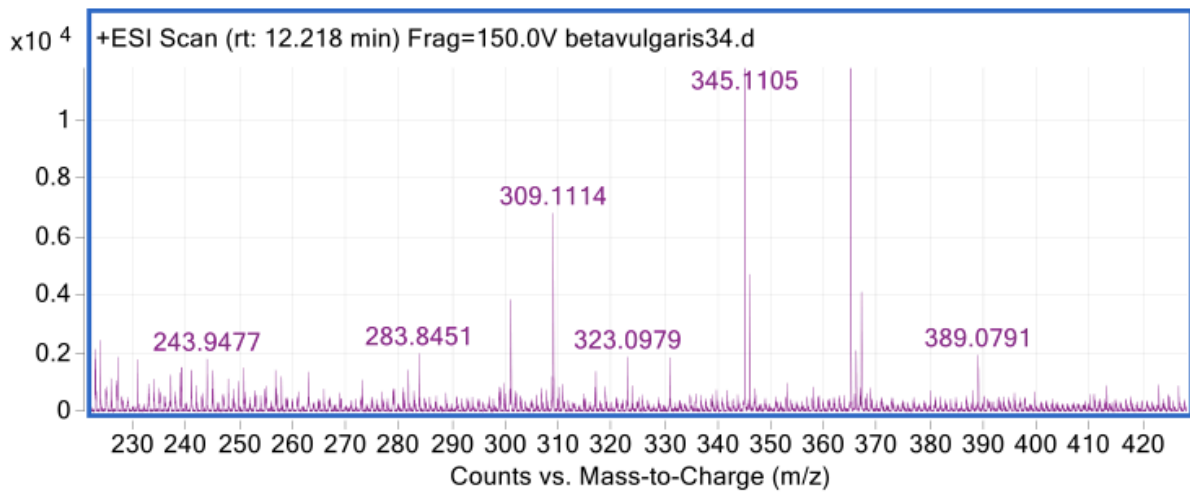
Rødbeteekstraktet tillaget i avsnitt 3.2.1 ble benyttet som prøvemateriale. Før injisering ble ekstraktet fra 1. ekstraksjonsrunde fortynnet 10 ganger.

Blant forbindelser som fikk match fra databasen ble 10 betalainforbindelser identifisert. Rekkefølgen til de 10 massespektrene under følger økende retensjonstid fra HPLC-kjøringen.

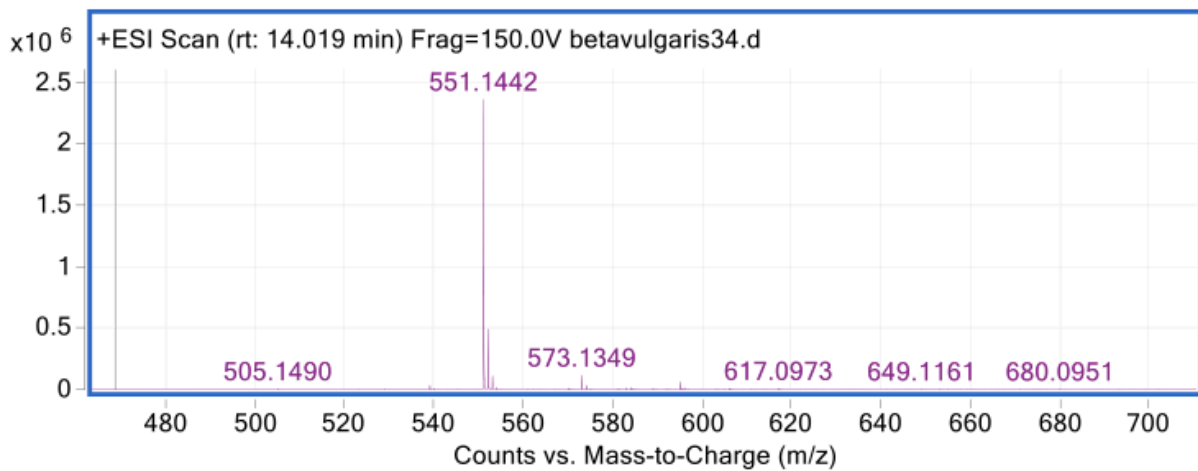
## Resultater og diskusjon



Figur 3.25:  $m/z$  340,1161 = vulgaxanthin I. Retensjonstid 3,1 min. Score: 93,23.

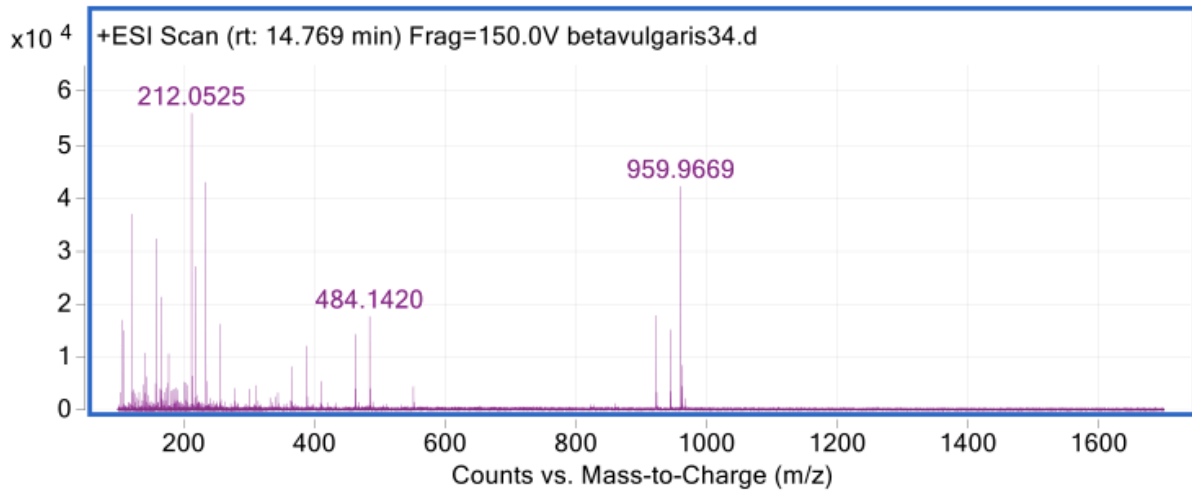


Figur 3.26:  $m/z$  309,1114 = indicaxanthin. Retensjonstid 12,2 min. Score: 83,72.

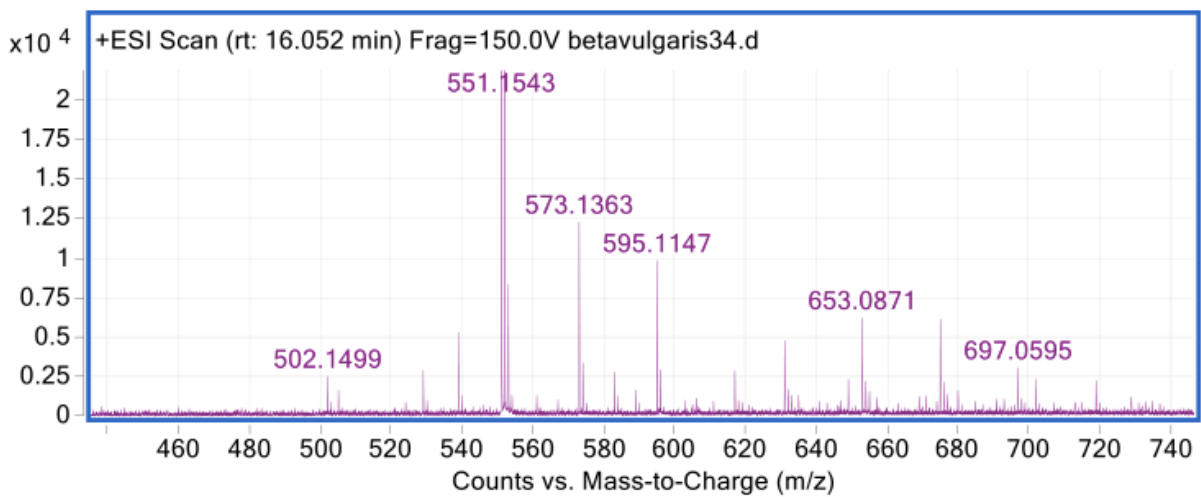


Figur 3.27:  $m/z$  551,1442 = betanin/isobetanin. Retensjonstid 14 min. Score: 94,84.

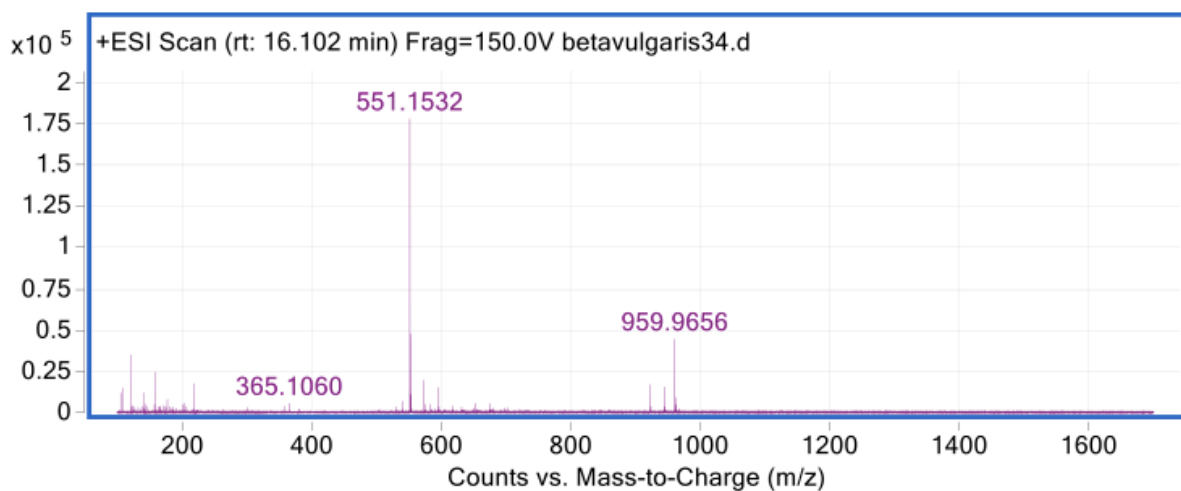
## Resultater og diskusjon



Figur 3.28:  $m/z$  212,0525 = betalamic acid. Retensjonstid 14,8 min. Score: 95,64.

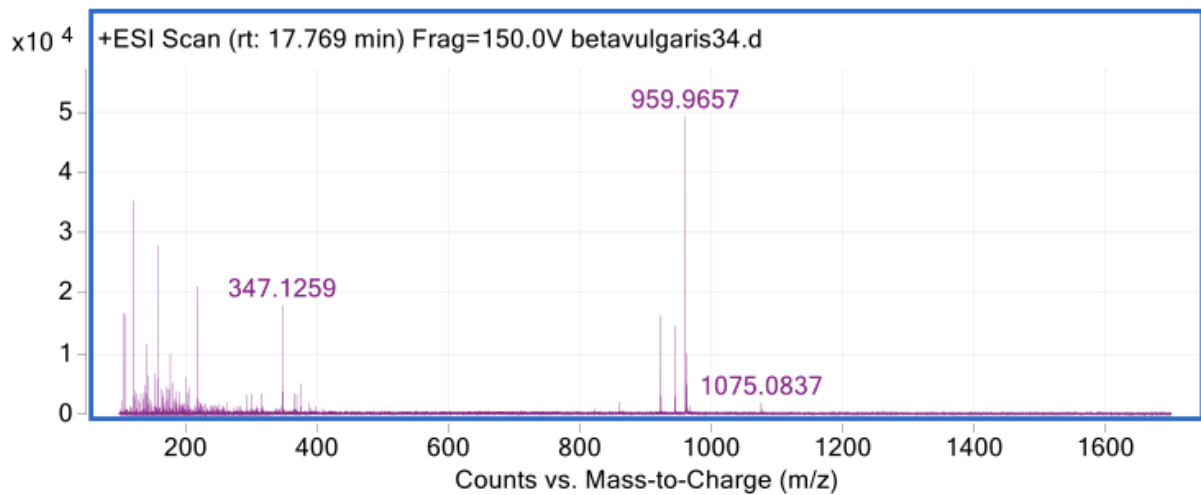


Figur 3.29:  $m/z$  573,1363 = prebetanin. Retensjonstid 16 min. Score: 74,34.

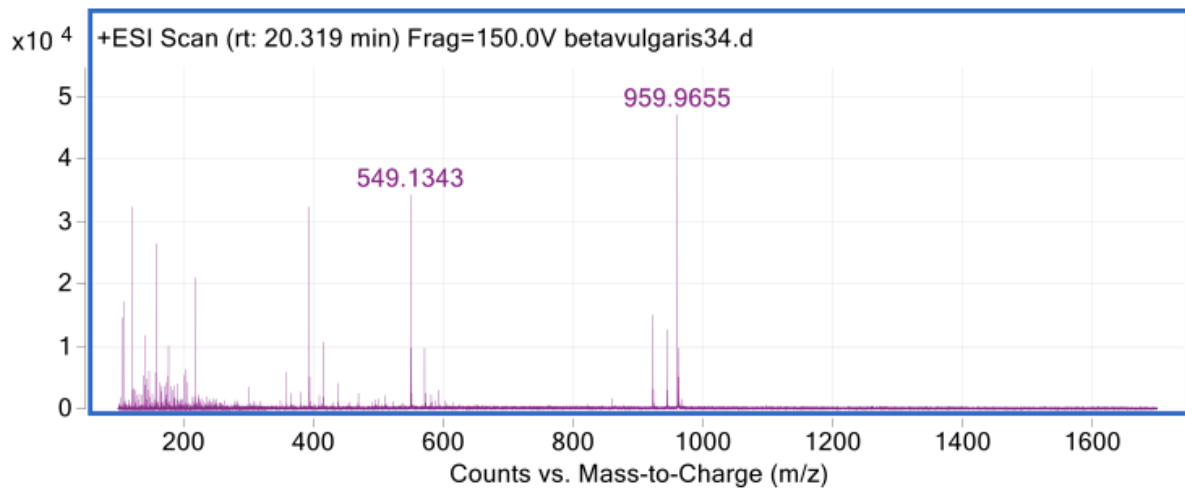


Figur 3.30:  $m/z$  551,1532 = betanin/isobetanin. Retensjonstid 16,1 min. Score: 96,43.

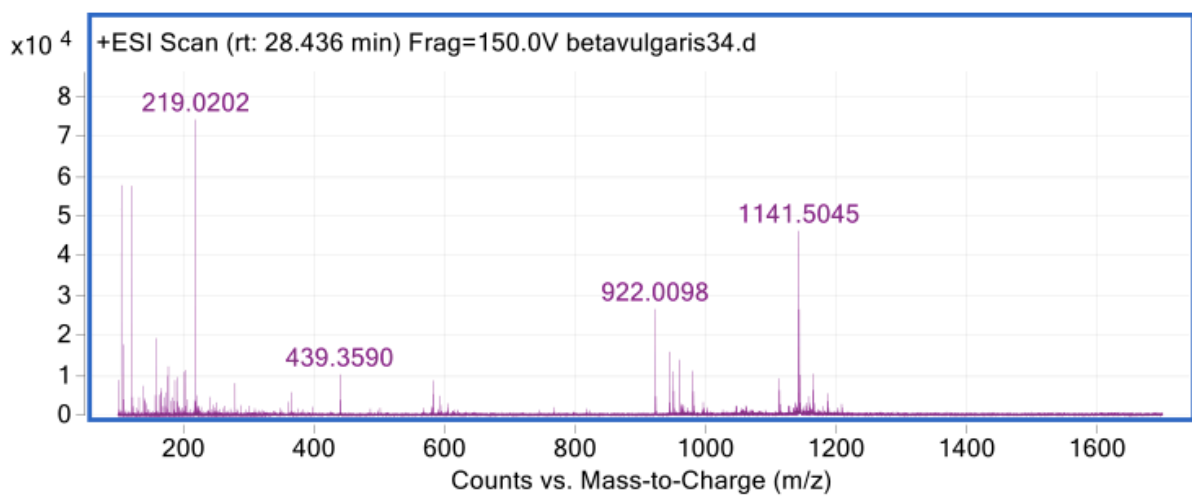
## Resultater og diskusjon



Figur 3.31:  $m/z$  347,1259 = miraxanthin. Retensjonstid 17,8 min. Score: 86,97.

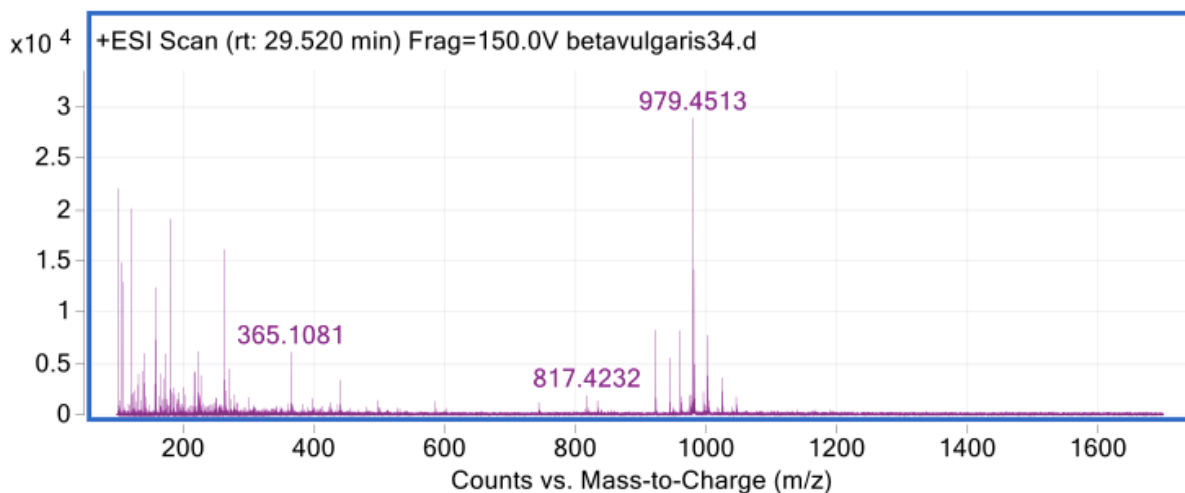


Figur 3.32:  $m/z$  549,1343 = neobetainin. Retensjonstid 20,3 min. Score: 99,1.



Figur 3.33:  $m/z$  1141,5045 = betavulgaroside V. Retensjonstid 28,4 min. Score: 97,48.

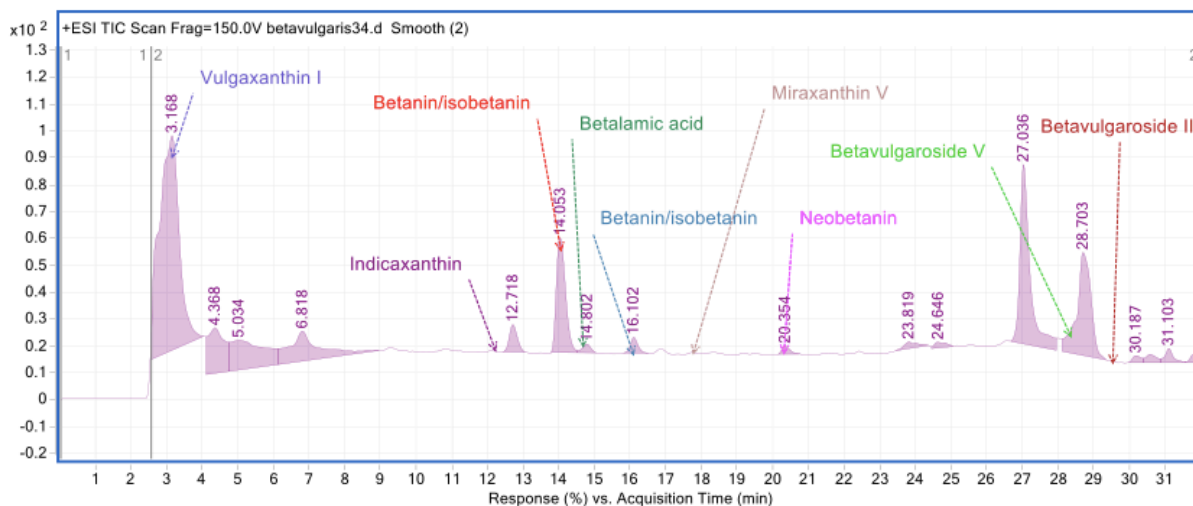
## Resultater og diskusjon



Figur 3.34:  $m/z$  979, 4561 = betavulgaroside III. Retensjonstid 29,5 min. Score: 96,18.

Det er to masser på 551 som detekteres med 2 minutter mellomrom (vises i Figur 3.27 og Figur 3.30) som begge matchet med betanin. Dette betyr at forbindelsene må være isomerer. Videre bekreftes dette også av det som kan sees i kromatogrammet fra betaninstandarden der de to høyeste toppene (betanintoppene) kommer med 2 min mellomrom (Figur 3.2). Dette stemmer med litteraturen som sier at betanin elueres ut først, etterfulgt av isobetanin med samme masse (Delgado-Vargas et al., 2000). Massen med retensjonstid 14 min er derfor med stor sikkerhet betanin, mens massen med retensjonstid 16 min er isobetanin.

Figur 3.35 viser det totale ionekromatogrammet for rødbeteekstrakt med identifiserte forbindelser med annotasjoner på de identifiserte massene.



Figur 3.35: Totalt ionekromatogram av rødbeteekstrakt som viser retensjonstider og identifiserte forbindelser.

Alle forbindelser som matcher noen i databasen vil bli gitt en score fra 0 - 100 ut ifra hvor god match det er. Denne scoren gir et estimat for hvor sikker identifiseringen er. Score over 90 vil si god match. Score under 90 vil være mer usikkert. Syv av ti forbindelser hadde score over 90. Miraxanthin, prebetanin og indicaxanthin hadde lavere score og er dermed mer usikre.



## Resultater og diskusjon

Separasjonen ble ikke optimal. Noen topper er nesten ikke synlige i TIC. Det kan ha sammenheng med den relativt høye bakgrunnsstøyen fra løsemiddelet som ikke er trukket fra, samt urenheter i prosessutstyr.

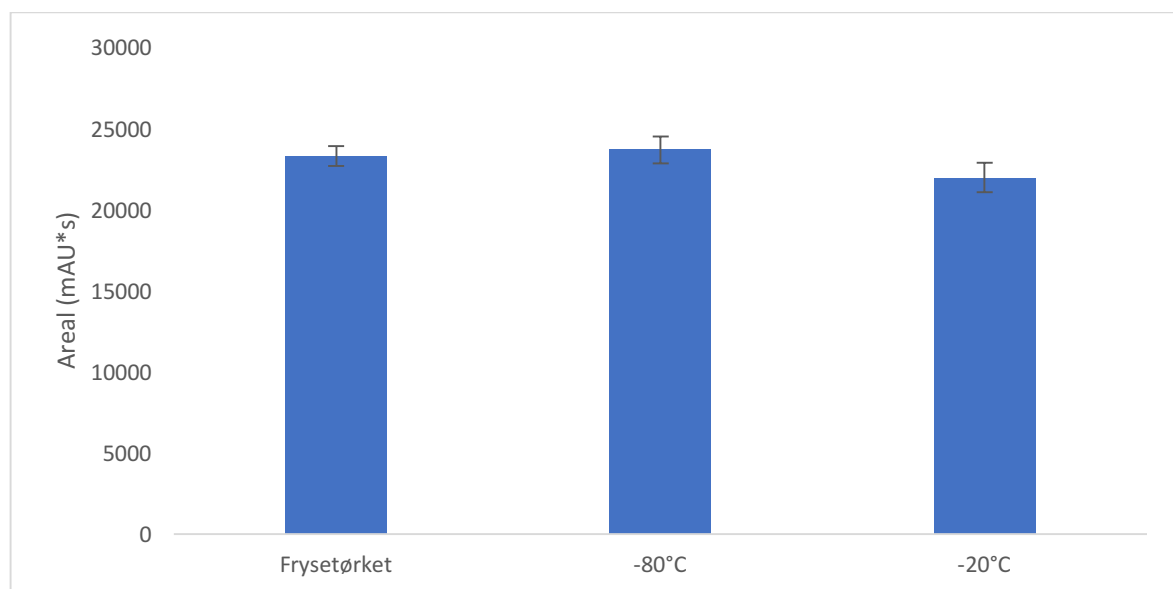
### 3.2 Stabilitet av prøvemateriale og ekstrakter

#### 3.2.1 Stabilitet av betalainer i beter som råvare ved forskjellige fryselagringsbetingelser

Det var ønskelig å se på stabiliteten til betacyaniner i skrelte og oppkuttete beter ved ulike fryselagringsmetoder. Betene ble behandlet og lagret i henhold til beskrivelse for prøveopparbeidelsesmetode 2 (avsnitt 2.4.2).

Ekstraksjonsmetode 2 (avsnitt 2.5.2) ble brukt ved ekstraksjon av fryste prøver, mens ekstraksjonsmetode 3 (avsnitt 2.5.3) ble brukt for frysetørket prøve. Som løsemiddel ble det benyttet 50% meOH. Etter prøveopparbeidelsen ble prøvene lagret i ca. én måned før analyse. For de frysetørkede prøvene var det nødvendig med 6 ekstraksjoner før pelleten ikke lenger ga fra seg farge. For de fryste prøvene, både ved  $-20^{\circ}\text{C}$  og  $-80^{\circ}\text{C}$ , holdt det med 4 ekstraksjonsrunder.

Det ble så kjørt HPLC-analyser av de tre ekstraktene med påfølgende bestemmelse av mengde betanin i hver av dem. Figur 3.36 viser betanintopp-arealet for hver av de tre ekstraktene.

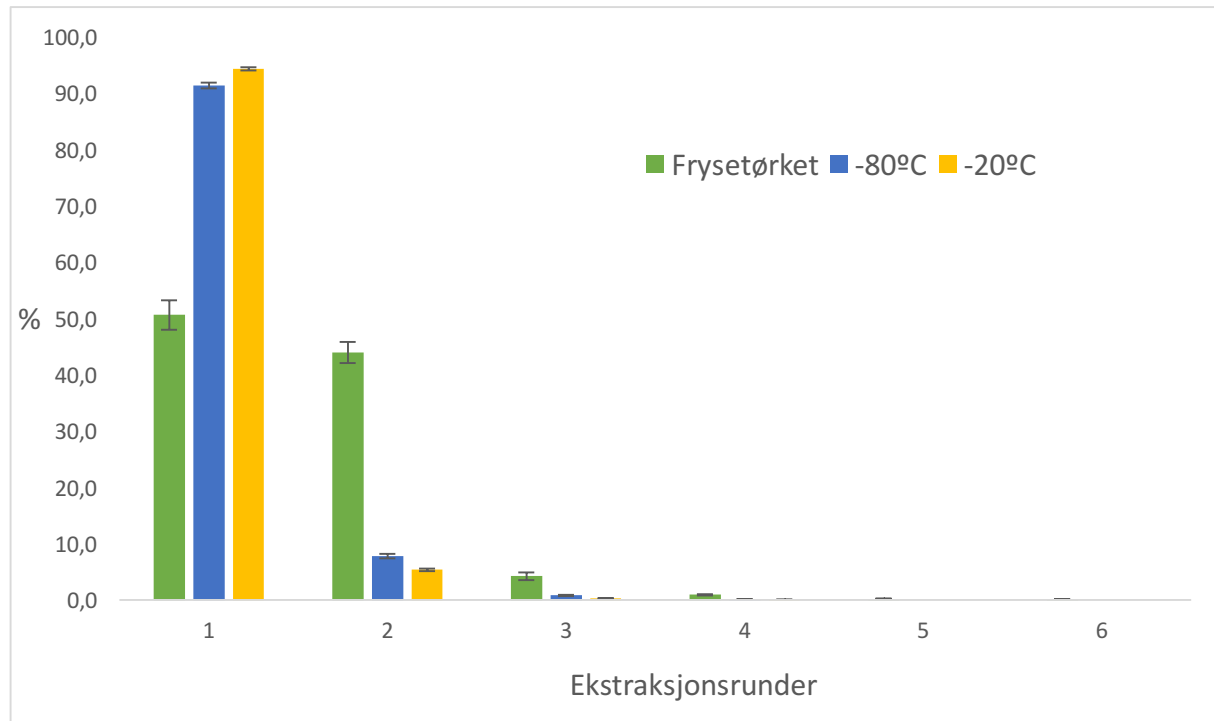


Figur 3.36: Areal for betanintopp ved  $\lambda=530$  nm for alle ekstraksjoner ved frysetørring, lagring ved  $-80^{\circ}\text{C}$  og lagring ved  $-20^{\circ}\text{C}$ .  $n=3$

Søylene i Figur 3.36 representerer summen av betanin fra alle ekstraksjonsrunder. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell i totalt betaninutbytte ved de forskjellige lagringsmetodene (ANOVA;  $df=2$ ,  $P=0,08$ ). Likevel var det forskjeller under ekstraksjonsprosessen.

## Resultater og diskusjon

Fordi det ble totalt seks ekstraksjonsrunder på frysetørket prøve og fire på de fryste ble ekstraksjonsmønster undersøkt. Utbytteprofilen til betanin i ekstraktene fra hver av lagringsbetingelsene ble undersøkt (Figur 3.37).



Figur 3.37: Prosentandel betanin ekstrahert for hver ekstraksjonsrunde for prøver med ulike lagringsbetingelser.  $\lambda=530$  nm.  $n=3$

Fra Figur 3.37 er det tydelig at mer betanin ble ekstrahert i første trinn for fryste prøver enn for frysetørkede. Aller mest betanin ble ekstrahert fra prøver lagret ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Figuren viser at tilnærmet alt fargestoff ble ekstrahert ved 1. ekstraksjon for begge de fryste prøvene, mens den frysetørkede prøven viser en annen interessant profil. Her kom kun rundt 50% ut ved 1. ekstraksjon etterfulgt av opp mot 44% i andre omgang. Resultatene for de fryste prøvene stemmer godt med resultatene i ekstraksjonsforsøk i avsnitt 3.1.2.5 der konklusjonen var at alt ble vasket ut i 1. ekstraksjonsomgang, men at ufullstendig dekantering av supernatant var avgjørende for utbyttet.

Den frysetørkede prøven viser imidlertid et annet mønster. Her må tilsynelatende deler av fargestoffet binde seg til røddefibrene ved denne prøveprepareringsmetoden slik at ytterligere en ekstraksjonsrunde er nødvendig for å få ut totalt mer enn 90% av fargestoffet. Frysetørring så derfor ikke ut til å være foretrukket lagringsmetode for å få en enklest mulig ekstraksjonsutførelse. I tillegg er frysetørring en svært dyr og tidkrevende prosess.

I lys av at lagringsresultatene viser at nedfrysning til  $-80^{\circ}\text{C}$  er noe bedre enn  $-20^{\circ}\text{C}$ , og en  $-80^{\circ}\text{C}$  fryser var tilgjengelig, ble denne lagringsmetoden valgt for prøveoppbevaring for videre forsøk. Dette ga også en sikkerhet i tilfelle et strømbrudd skulle inntreffe. Prøvematerialet vil tines fortere i en  $-20^{\circ}\text{C}$  fryser enn i en  $-80^{\circ}\text{C}$  fryser, og  $-80^{\circ}\text{C}$  fryseren er tilkoplest alarmsystem.

## Resultater og diskusjon

I forsøket ble prøvene kun lagret i én måned, så det er fullt mulig at frysetørring vil være mer holdbart hvis betene skal lagres over mye lenger tid, for eksempel over flere år.

Generelt vil imidlertid frysing ved  $-20^{\circ}\text{C}$  være tilstrekkelig, som er en frysetemperatur som oftest benyttes både av industrien og i husholdning hos forbruker.

### 3.2.2 Stabilitetsforsøk med senket pH

Mange studier har vist en sammenheng mellom pH og fargestabiliteten til betalainer (Stintzing and Carle, 2004, Delgado-Vargas et al., 2000, Strack et al., 2003). Derfor var det interessant å se om stabiliteten til betalainer i ekstraktene og ekstraksjonsutbyttet ble påvirket av prøvens pH. I dette forsøket ble metode 2 for prøveoppbehandling benyttet (avsnitt 2.4.2). Det ble tatt utgangspunkt i ekstraksjonsmetode 2 (avsnitt 2.5.2). Forsøket ble delt i to uavhengige oppsett for å studere stabilitet opp til 6 dager kombinert med reproduktibilitetsforsøk dag 0 av selve ekstraksjonen. Dette for å kunne utelukke ekstraksjonsvariasjoner fra dag til dag og dermed ha sikrere tolkning av data.

#### 3.2.2.1 Stabilitet av rødbeteekstrakter 0-2 dager

Prøvene (oppsett 1) ble delt i 4 grupper à 3 paralleller. To av gruppene ble tilsatt internstandard som var forhåndsinnveid. Innveid mengde internstandard var ca. 12 mg per parallell (gruppe 2 og 4). En av gruppene med internstandard og en uten ble tilsatt løsemiddel med 0,1% maursyre (gruppe 1 og 2). Se Tabell 3.4.

Tabell 3.4: Oversikt over internstandard tilsatt, pH og % maursyre i de fire gruppene.

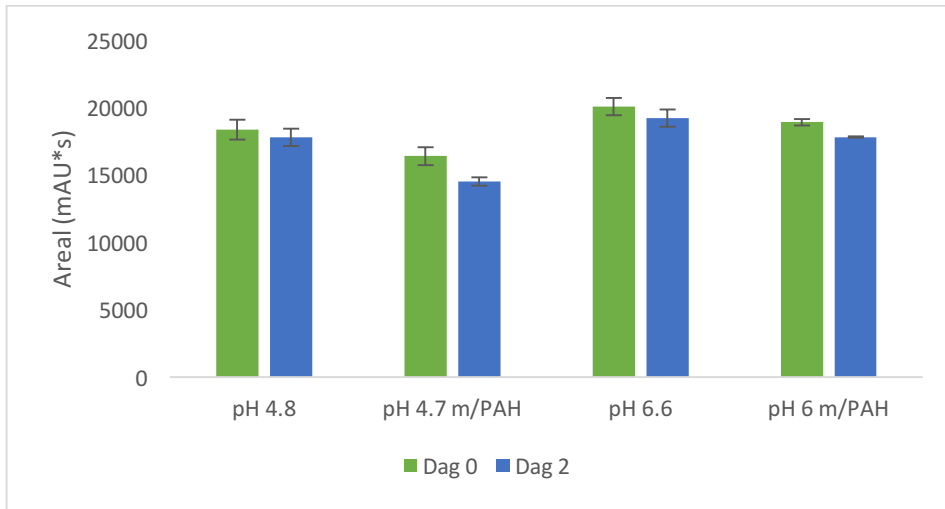
Gruppe	Istd. tilsatt	pH	% maursyre
1	Nei	4,8	0,1
2	Ja	4,7*	0,1
3	Nei	6,6	0
4	Ja	6,0*	0

\* Tilsetningen av istd. i løsemiddelet resulterte i endring av pH da løsemiddelet ikke bufret.

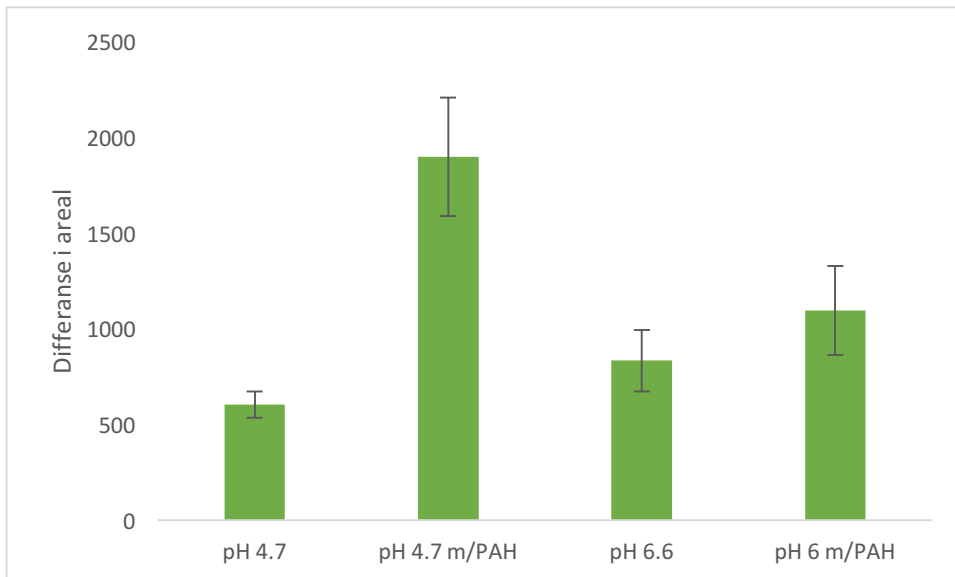
Det ble tilsatt maursyre i to av gruppene (1 og 2, se Tabell 3.4). De ferdig ekstraherte prøvene (4 grupper à 3 paralleller) ble så analysert på HPLC-UV-Vis. Alle prøvene ble plassert i autoinjektoren som var innstilt på  $5^{\circ}\text{C}$  og prøvene ble analysert samme dag og etter 2 dagers lagring ved  $5^{\circ}\text{C}$ .

Figur 3.38 viser areal av betanintoppen ved 530 nm ved de ulike pH verdiene ved dag 0 og dag 2. Differansen i arealet mellom dag 0 og dag 2 ble beregnet og vises i Figur 3.39.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.38: Areal av betanintopp ved  $\lambda=530$  nm for prøver med forskjellig pH ved dag 0 og dag 2.



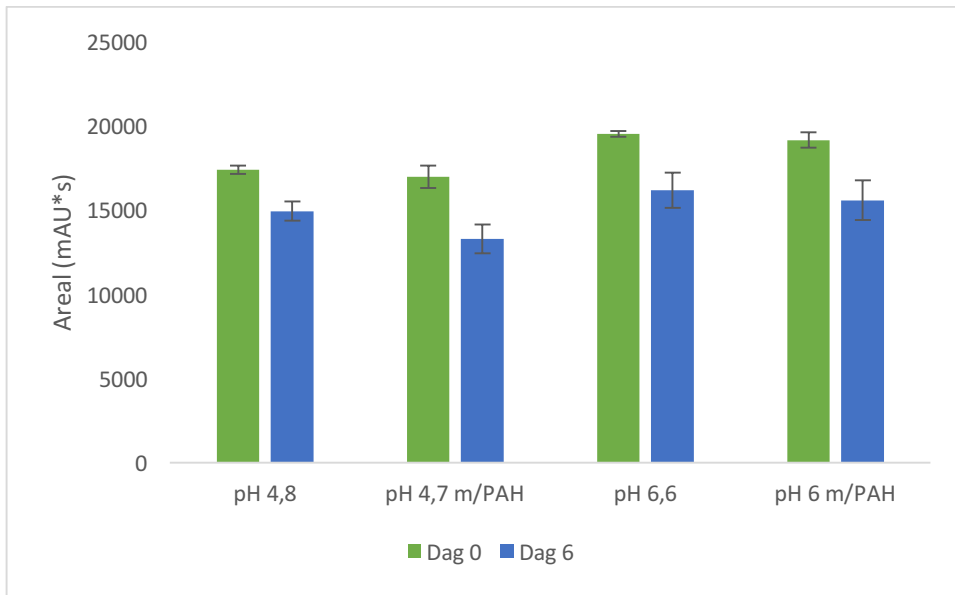
Figur 3.39: Differanse i arealnedgang for betanin mellom dag 0 og dag 2 for prøver med forskjellig pH.  $n=3$  for hver gruppe.

Ved sammenligning mellom alle de fire gruppene var det signifikant forskjell i stabiliteten til prøvene (ANOVA;  $df=3$ ,  $P=0,0015$ ). Fra Figur 3.39 er det likevel tydelig at prøven med PAH ved pH 4,7 skilte seg ut, derfor ble det foretatt en ny ANOVA-test hvor denne gruppen var fjernet. Da var det ingen signifikant forskjell i stabiliteten (ANOVA;  $df=2$ ,  $P=0,07$ ). Det ble ikke funnet signifikant nedgang i betalaininnhold fra dag 0 til dag 2 (t-test;  $df=6$ ,  $P=0,4$ ).

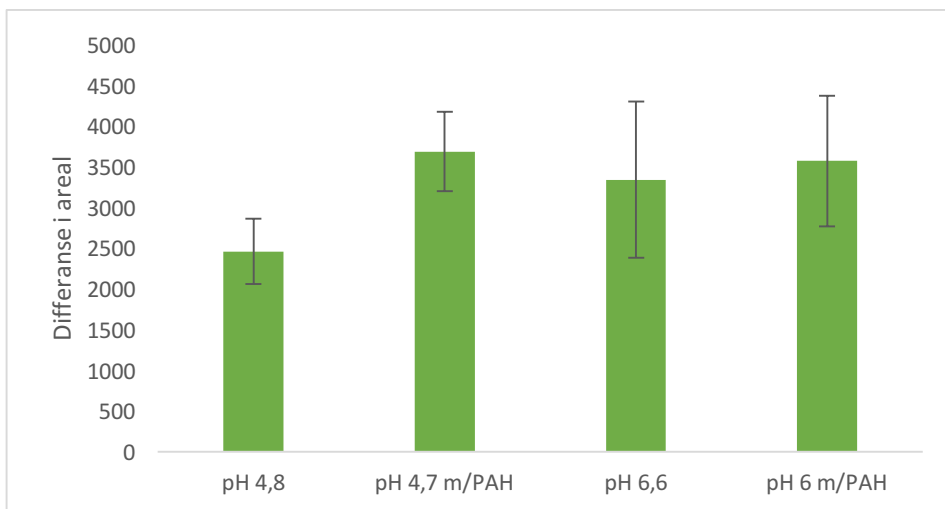
### 3.2.2.2 Stabilitet av rødbeteekstrakter 0-6 dager

Forsøket ble så gjentatt med nye og uavhengige ekstraksjoner (oppsett 2) for å studere stabilitet ved opp til 6 dagers lagring ved  $5^{\circ}\text{C}$  i kjøleskap. Oppsettet var identisk med oppsettet i avsnitt 3.2.2.1. Resultater fra HPLC-UV-Vis analysen ved dag 0 og dag 6 vises i Figur 3.40. Differansen i areal mellom dag 0 og dag 6 ble beregnet og vises i Figur 3.41.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.40: Areal av betanintopp ved  $\lambda=530$  nm for prøver med forskjellig pH ved dag 0 og dag 6.  $n=3$  for hver gruppe.



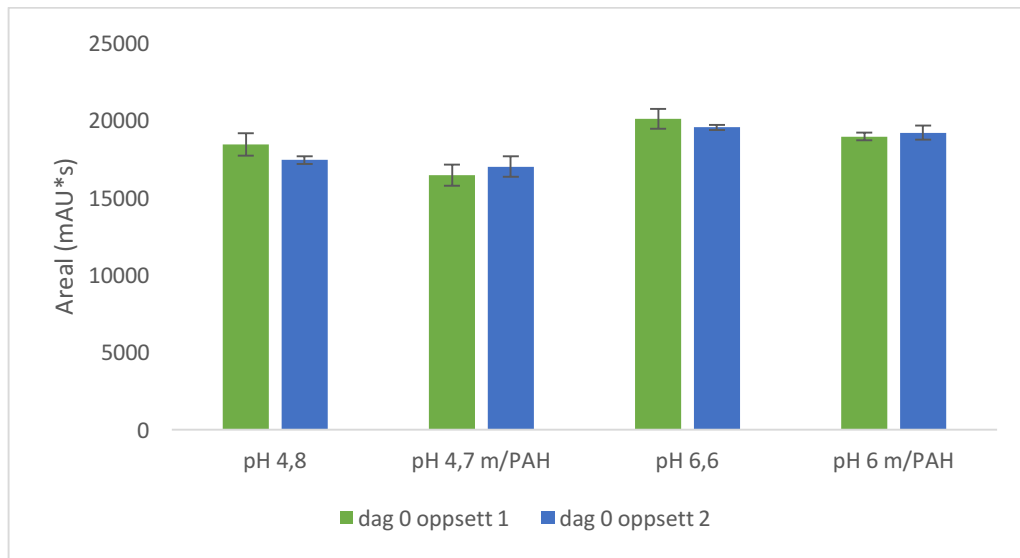
Figur 3.41: Differanse i arealnedgang for betanin mellom dag 0 og dag 6 for prøver med forskjellig pH.  $n=3$  for hver gruppe.

Mengden betanin sank ved alle betingelsene som ble testet ut. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell i stabiliteten til ekstrakter med pH 4,7, 4,8, 6,0 og 6,6 (ANOVA;  $df=3$ ,  $P=0,35$ ) etter 6 dagers lagring. Det ble imidlertid funnet signifikant nedgang i betalaininnhold fra dag 0 til dag 6 (t-test;  $df=6$ ,  $P=0,01$ ).

### 3.2.2.3 Ekstraksjonsreproduserbarhet dag 0

0-dags prøvene fra oppsett 1 (avsnitt 3.2.2.1) og 2 (avsnitt 3.2.2.2) skulle vise hvor reproduserbar ekstraksjon og analysemetode var. Resultatene for de fire gruppene er vist under i Figur 3.42.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.42: Areal for betanin ved  $\lambda=530$  nm ved dag 0.  $n=3$  for hver søyle.

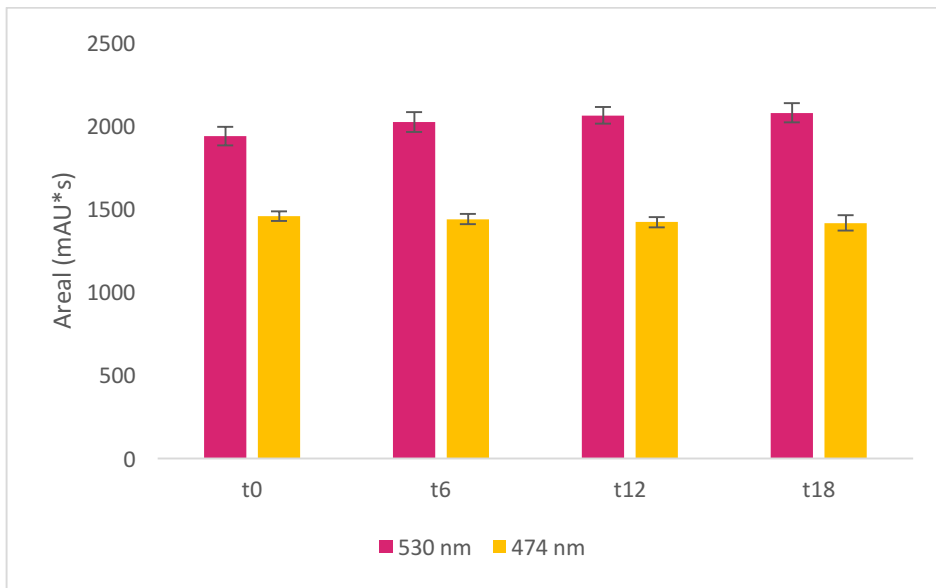
Resultatene viser god overensstemmelse da det ikke er noen signifikant forskjell mellom dag 0 ekstraksjonene. Dette betyr at metoden er tilstrekkelig reproducerbar for å kunne sammenligne forskjeller fra dag 0, dag 2 og dag 6 (ANOVA;  $df=6$ ,  $P=0,85$ ).

De Azeredo *et al.* (2009) fant i sin studie at ekstraksjon ved pH 3 ga høyere betacyaninutbytte enn ved høyere pH. Figur 3.38 og Figur 3.40 viser her at ekstraksjon ved pH 6,6 ga høyere betacyaninutbytte. Figur 3.39 og Figur 3.41 viser at stabiliteten til ekstraktene ikke ble noe bedre ved lavere pH, spesielt ikke ved lagring lengre enn 5 dager. Årsaken til at ekstraktene med pH 4,7 m/PAH hadde dårligere stabilitet etter dag 2 kan muligens forklares av at pH var noe lavere i denne prøven enn i prøven uten PAH (pH 4,8). Tilsetning av PAH senker pH noe på grunn av liten bufferkapasitet i løsemiddelet.

### 3.2.3 HPLC-analyse av ekstrakter lagret mørkt og kjølig

For å gjøre HPLC-analyse av ekstrakter lagret mørkt og kjølig ble metode 1 for prøveoppbevaring benyttet (avsnitt 2.4.1). Fremgangsmåten ved ekstraksjon er beskrevet i ekstraksjonsmetode 1 (avsnitt 2.5.1). Løsemiddel var 25% meOH og det ble ikke tilsatt internstandard. Analysetiden på HPLC var 36 min per prøve. Med hensikt om å måle hver sjette time rakk instrumentet å analysere 10 prøver, derfor ble autoinjektoren lastet med 3 paralleller og 7 “dummy”-prøver. Dette ble gjentatt etter 6 timer, 12 timer og avsluttet med de siste tre parallellene ved 18 timer, totalt 12 prøver og 28 “dummy”-prøver. Stabiliteten til ekstrakter ble dermed undersøkt ved å se på endring i areal ved 530 nm og 474 nm etter 6, 12 og 18 timer sammenlignet med dag 0. Det var av interesse å undersøke stabiliteten til henholdsvis betaxanthiner og betacyaniner siden det er vist at gult fargestoff er mer ustabil enn rødt (Azeredo, 2009, Stintzing and Carle, 2004). Disse to hovedkomponentene ved 474 nm og 530 nm ble identifisert som vulgaxanthin I og betanin ved HPLC-MS analyse (avsnitt 3.1). Disse forbindelsene representerer henholdsvis betaxanthinene og betacyaninene i Figur 3.43.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.43: Areal ved 0-tid og etter 6, 12 og 18 timer for betanin ved  $\lambda=530$  og vulgaxanthin I ved  $\lambda=474$  nm.  $n=3$ .

Det var ingen signifikant nedgang i mengden betanin i løpet av de 18 timene prøvene ble analysert (ANOVA;  $df=3$ ,  $P=0,13$ ). Det var heller ingen signifikant forskjell i mengde vulgaxanthin I (ANOVA;  $df=3$ ,  $P=0,63$ ). Til tross for at det ikke er noen signifikant endring i fargestoff ser det ut til at gjennomsnittsarealet til betanin øker svakt fra 0-tid og under lagringen.

Ved ekstraksjon av gulbete er det tidligere observert en endring i farge fra klar gul til en dyp oransje når prøvene har stått i omtrent 10 min. En teori som kan forklare dette kan være at noe av det gule fargestoffet eller en annen forbindelse i beteekstraktet brytes ned med et skift i absorpsjonsmaksimum til høyere bølgelengde. Kjemiske reaksjoner kan skje under eksponering for lys og luft, men det er uvisst om en slik reaksjon med endring i kjemisk skift er mulig, så dette må undersøkes nærmere i kontrollerte forsøk av en mer omfattende art enn det utført her. Det er også uvisst om den oransje fargen er sterk nok til å gi absorpsjon ved 530 nm.

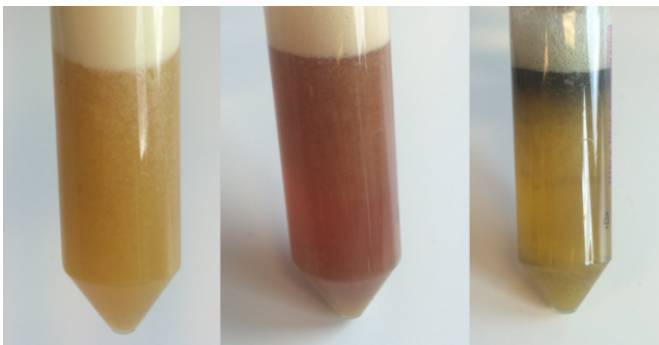
Det ble satt opp et kontrollforsøk hvor gulbete ble hakket i blender før de oppkuttete bitene ble plassert ved romtemperatur og eksponert for luft og lys. Det ble tatt bilder rett etter oppkutting og etter 10 min Figur 3.44.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.44: Oppkuttet gulbete. Bildet til venstre er tatt rett etter oppkuttingen, mens bildet til høyre er tatt etter ca. 10 min. Foto: Anette Brandsnes

Bildene viser at det skjer en fargeforandring mot rødt i opphakk til høyre etter 10 min. For å se om det samme skjer under ekstraksjon av ferskt opphakk, ble de opphakkede bitene til venstre tilsatt løsemiddel 25% meOH og homogenisert med Polytron®. Ekstraktene ble satt på laboratoriebank eksponert for lys og luft. Bilde ble tatt ved henholdsvis 0-tid, etter 10 min og etter 2 timer (Figur 3.45).



Figur 3.45: Bildet til venstre viser gulbete rett etter oppkutting og tilsetning av løsemiddel. Bildet i midten er samme ekstrakt etter ca. 10 min. Bildet til høyre er tatt etter 2 timer. Foto: Anette Brandsnes

Bildene viser en hurtig endring i farge fra gult mot rødt og over i en turbid grågul løsning etter et par timer. Fargeendringen fra gult til rødt kan være en forklaring på arealøkningen i betanintoppen under lagringsforsøket som beskrevet ovenfor og tilsvarende nedgang i vulgaxanthintoppen, men dette må undersøkes nærmere og kan være interessant å følge opp i videre forsøk.

### 3.3 Kvantitativ analyse av forskjellige betesorter

I mange tilfeller finnes det kommersielle standarder med høy renhetsgrad av stoffene som undersøkes. Uheldigvis var det ikke mulig å få tak i rene standarder av betalainer. Kvantifisering var derfor ikke mulig med HPLC. Isteden ble spektrofotometer benyttet til kvantifisering ved bruk av den kjente molare ekstinksjonskoeffisienten. Siden denne ikke skiller mellom stoffene med absorpsjon ved samme bølgelengde kunne HPLC bidra med informasjon om hvor stor prosent av totalen de ulike betalainforbindelsene utgjorde.



## Resultater og diskusjon

Den molare ekstinksjonskoeffisienten for betacyanin og betaxanthin ble brukt for å finne konsentrasjonen i ekstrakter da det ikke var mulig å få tak i rene standarder. Formel 2.2 og betingelser i metoddelen ble benyttet for utregning (avsnitt 2.6.1).

### 3.3.1 Betalaininnhold i ulike betesorter

Fire ulike betesorter ble analysert og sammenlignet for å finne ut hvilken betesort som inneholdt mest betalain. Både innholdet av betacyanin og betaxanthin ble undersøkt. Sortene som ble analysert var 'Touchstone Gold' (gulbete), 'Guardsmark' (polkabetete), 'Bettollo' (rødbete) og 'Taunus' (industri-rødbete).

For prøveopparbeidelse ble metode 3 benyttet (avsnitt 2.4.3) og ved ekstraksjon ble ekstraksjonsmetode 2 benyttet (avsnitt 2.5.2). Siden forsøket på lagring av prøvemateriale viste at frysetørking ikke gir noen stor fordel med tanke på betaninutbytte, ble analysene utført på ferske prøver som hadde vært fryst ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Før nedfrysning hadde betene vært lagret mørkt i omtrent 5 mnd på kjølelager ved  $2^{\circ}\text{C}$ . Det ble også tatt ut prøver til frysetørking fra hver sort for å undersøke vanninnholdet i sortene (se metode 3 for prøveopparbeidelse). Til ekstraksjon ble løsemiddel med 25% meOH benyttet. Det var tilstrekkelig med 3 ekstraksjonsrunder for polkabetene, mens de andre betesortene trengte 4 ekstraksjonsrunder. Totalt ble fem individer av hver sort skrelt og kuttet, og deretter ekstrahert. 3 paralleller av hvert individ ble analysert (primærdata i avsnitt 7.2 i appendiks).

#### 3.3.1.1 Bestemmelse av vanninnhold i bete

Vanninnholdet i de fire sortene ble bestemt ved frysetørking av 10 gjentak fra hver av sortene. Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik i prosent vises i Tabell 3.5. Vanninnholdet varierte mellom sortene fra  $83,1 \pm 0,4$  til  $88,0 \pm 0,4$ . 'Taunus' hadde høyeste vanninnholdet fulgt av 'Touchstone Gold', 'Bettollo' og 'Guardsmark', men totalt sett var forskjellen mellom sortene relativt liten ( $\text{RSD} < 2,5$ ).

Tabell 3.5: Vanninnhold i betesorter. n=10

Betesort	% vanninnhold	SD	% RSD
Touchstone Gold	85,8	0,5	0,6
Guardsmark	83,1	0,4	0,4
Bettollo	83,3	0,5	0,5
Taunus	88,0	0,4	0,4

### 3.3.1.2 Beregning av betalainer i tørrvekt bete

For å bestemme betalaininnholdet per gram tørrvekt måtte først innholdet i våtvekt bestemmes. Dette ble gjort ved ekstraksjon, analyse og beregninger fra ekstraksjonen som er benyttet under avsnitt 3.3.1. UV-Vis absorbanse ved 474 nm og 530 nm ble brukt som beregningsgrunnlag for utregning med tilhørende ekstinksjonskoeffisienter. Primærdata finnes i avsnitt 7.2 i appendiks.

Tabell 3.6 viser våtvektverdiene for de ulike betesortene. Tabell 3.7 viser tørrvektverdiene beregnet ut ifra vannprosentinnholdet og våtvektverdiene for hver av de fire betesortene. Totalinnholdet av betalainer per gram tørrvekt vises også i Figur 3.46. Formel 3.1 viser utregning av tørrvektverdi.

Formel 3.1

$$mg \text{ betalain/g våtvekt} \times 100 / (100 - \% \text{ vanninnhold}) = mg \text{ betalain/g tørrvekt}$$

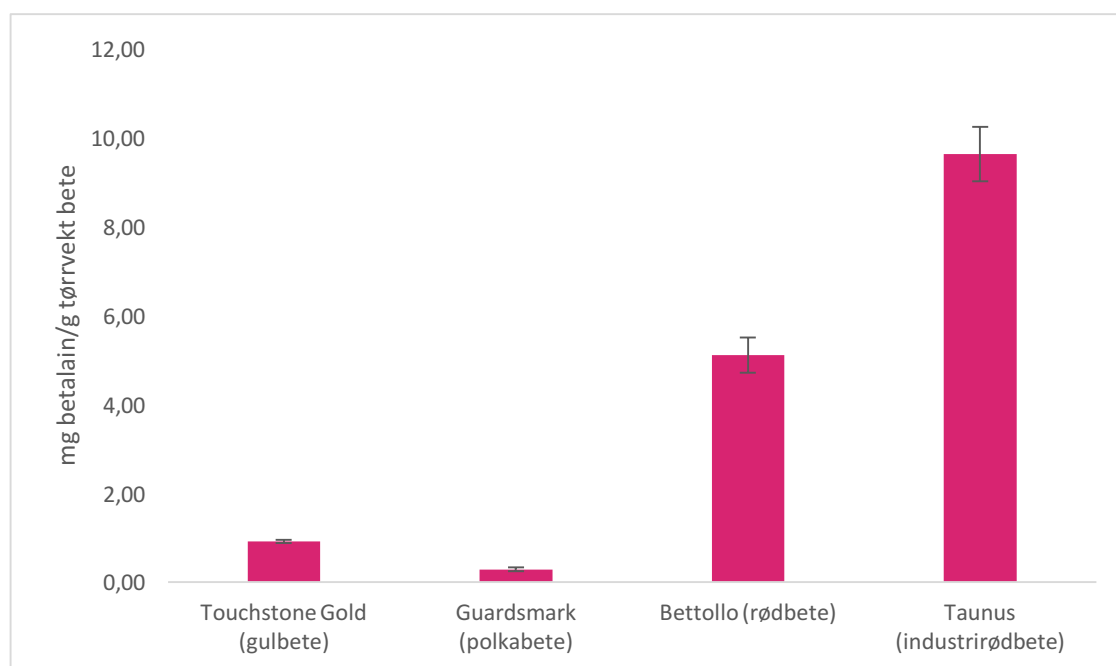
Tabell 3.6: Betalaininnhold for ulike betesorter i mg/g våtvekt bete og standardavvik.

Betesort	mg betacyanin/ g våtvekt bete	mg betaxanthin/ g våtvekt	Totalt betalain-innhold mg/g våtvekt ± SD
Touchstone Gold (gulbete)	0,032	0,097	0,13 ± 0,006
Guardsmark (polkabete)	0,029	0,019	0,05 ± 0,007
Bettollo (rødbete)	0,650	0,203	0,85 ± 0,066
Taunus (industrirødbete)	0,870	0,285	1,16 ± 0,073

## Resultater og diskusjon

Tabell 3.7: Vanninnhold i %, betalain i mg/g tørrvekt bete og totalt betalaininnhold i mg/g tørrvekt for de ulike betesortene.

Betesort	% vann	mg betacyanin/ g tørrvekt	mg betaxanthin/ g tørrvekt	Totalt betalain-innhold mg/g tørrvekt ± SD
Touchstone Gold (gulbete)	85,8	0,23	0,69	0,92 ± 0,04
Guardsmark (polkabete)	83,1	0,17	0,11	0,28 ± 0,04
Bettollo (rødbete)	83,3	3,85	1,21	5,06 ± 0,40
Taunus (industri-rødbete)	88,0	7,25	2,38	9,63 ± 0,61

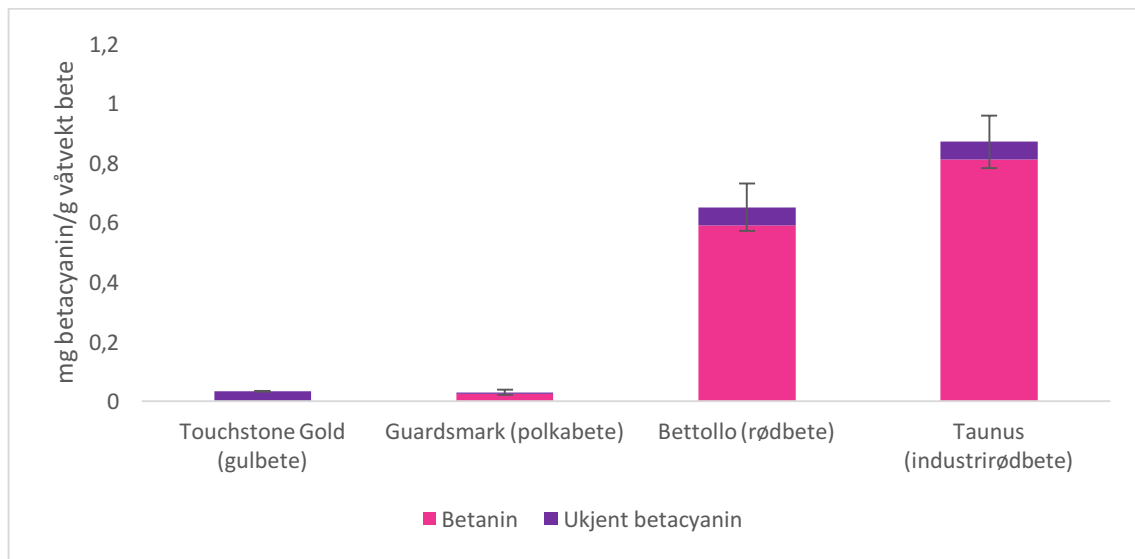


Figur 3.46: Innhold av betalainer i mg/g tørrvekt bete for de fire sortene. n=15 for hver sort.

Mengden betalainer i rødbeter varierer ifølge Nilsson (1970) fra 0,35 til 1,2 mg/g våtvekt bete. Innholdet av betacyaniner varierer mellom 0,04 til 0,21% av våtvekt og betaxanthiner fra 0,02 til 0,14% avhengig av kultivar. Våtvektsverdiene for rødbeter bestemt i denne studien (Tabell 3.7) lå innenfor disse intervallene med totalt 0,85 mg/g og 1,16 mg/g for henholdsvis 'Bettollo' og 'Taunus' (

Tabell 3.6). Av betacyanin inneholdt 'Bettollo' 0,07% og 'Taunus' 0,09% og av betaxanthin inneholdt 'Bettollo' 0,02% og 'Taunus' 0,03%.

### 3.3.1.3 Betacyanininnhold



Figur 3.47: Mengde betacyaniner i mg/g våtvekt bete i ulike sorter. Viser også prosentandel betanin av totalt betacyanininnhold.  $\lambda=530$  nm.  $n=15$  for hver sort.

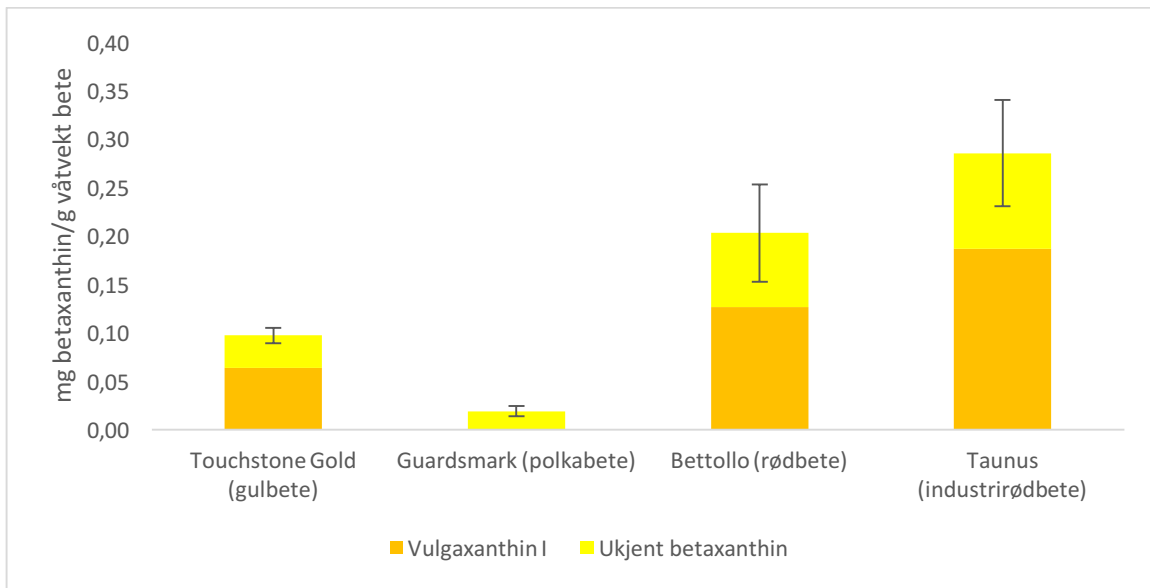
Figur 3.47 viser at i polkabeten ('Guardsmark') og rødbetene ('Bettollo' og 'Taunus') er over 90% av betacyaninene betanin, men det totale rødfargeinnholdet i rødbetene ligger høyt over mengdene i polkabeten og gulbeten ('Touchstone Gold'). Totalt betacyanininnhold i industrirødbete er  $0,87 \pm 0,09$  mg/g våtvekt bete, mens i forbrukerrødbete er innholdet  $0,65 \pm 0,08$  mg/g. Polkabeten og gulbeten inneholder omtrent samme mengde betacyanin, henholdsvis  $0,03 \pm 0,009$  mg/g og  $0,03 \pm 0,001$  mg/g.

I gulbeten var det veldig lavt betacyanininnhold og de få toppene som kom ut var ikke mulige å identifisere ut ifra retensjonstiden i HPLC-kromatogrammene fordi de var lave. Derfor var det ikke mulig å finne ut hvor mye av total betacyaninmengde som er betanin. Likevel var det absorpsjon ved 530 nm ved måling på spektrofotometer, så total mengde betacyanin kunne regnes ut.

### 3.3.1.4 Betaxanthininnhold

Totalinnhold av betaxanthin ble undersøkt tilsvarende som i avsnitt 3.3.1.3. For å få riktig verdi for betaxanthin ble ekstraktene analysert med HPLC-UV-Vis. Betanin absorberer også ved 474 nm (Figur 3.3 og Figur 3.4), noe som var viktig å ta hensyn til ved utregning av totalt betaxanthininnhold fra spektrofotometermålinger. Dette vil gi et bidrag til totalabsorbansen ved 474 nm som er absorpsjonsmaksimum for betaxanthinene. Topparealer ved 474 nm til forbindelser som også har absorpsjon ved 530 nm (betacyaniner) ble derfor trukket fra totalarealet ved 474 nm. Dette ble omregnet til prosent. Denne samme betacyaninprosenten ble trukket fra absorbansverdiene fra spektrofotometermålingene for å få sann betaxanthinverdi. Figur 3.48 viser totalinnhold av betaxanthin i de fire sortene.

## Resultater og diskusjon



Figur 3.48: Mengde betaxanthin i mg/g våtvekt bete i ulike sorter. Viser også prosentandel vulgaxanthin I av totalt betaxanthininnhold.  $\lambda=474$ .  $n=15$  for hver sort.

‘Taunus’ inneholdt mest av både totalinnhold betaxanthin ( $0,3 \pm 0,06$  mg/g våtvekt) og komponenten vulgaxanthin I (Figur 3.48), etterfulgt av ‘Bettollo’ ( $0,2 \pm 0,05$  mg/g våtvekt). Det er tydelig at begge rødbetene inneholder betydelig mer betaxanthin enn ‘Touchstone Gold’ ( $0,1 \pm 0,01$  mg/g våtvekt). Andelen betaxanthin ligger over 60% for de tre sortene hvor denne ble bestemt.

Polkabete ble ikke analysert for mengde vulgaxanthin I fordi signalene fra HPLC-analysen ved 474 nm var for lave til å kunne tolkes. Polkabete ble ekstrahert med til sammen 75 mL løsemiddel, men burde blitt ekstrahert med et mindre volum, for å unngå for høy fortykning av prøven.

Det var en utfordring å finne det totale betaxanthininnholdet i rødbeter fordi betacyaniner også har absorpsjon ved 474 nm. Ved måling på spektrofotometer blir absorbansen påvirket av alle stoffer som absorberer ved den aktuelle bølgelengden, også betacyaniner (se Figur 3.3). HPLC-kromatogrammet måtte derfor brukes for å finne ut hvilke av toppene som egentlig er betacyaniner (topper som også absorberer ved 530 nm), deretter måtte arealene til de samme toppene trekkes fra totalarealet ved 474 nm. Andelen som da ble igjen ble det riktige målet på totalt betaxanthininnhold. Dette ble ikke gjort med polkabeten, igjen fordi signalene var for lave til å kunne tolkes.

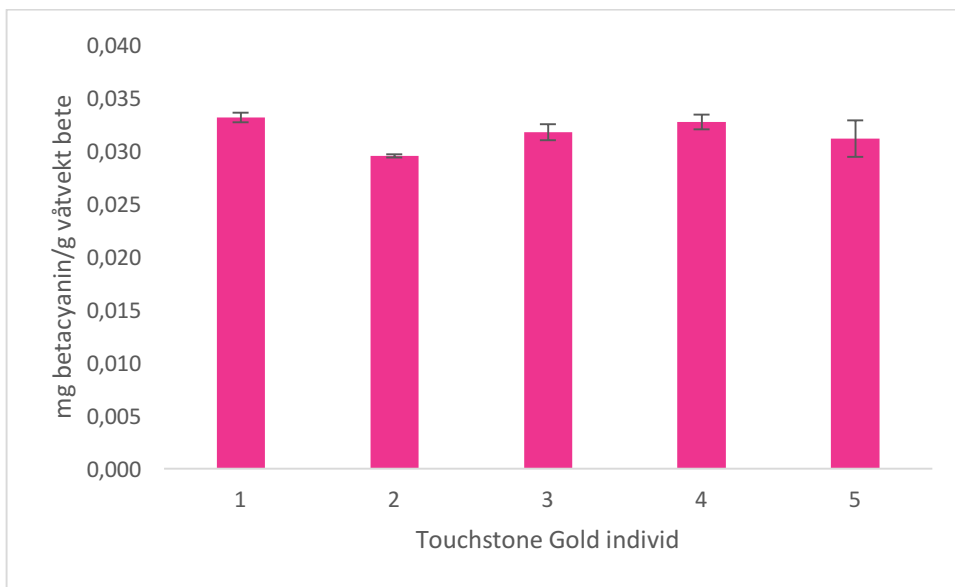
### 3.3.2 Biologisk variasjon mellom individer av samme sort

Det var ikke kun mellom sorter det var interessant å undersøke betalainforskjeller, men også mellom individer av samme sort. Individresultater er hentet fra de samlede data fra kjøringene vist i Figur 3.47 og Figur 3.48 (avsnitt 7.2).

#### 3.3.2.1 Betacyanininhold i enkeltindivider

I analysen for betacyaniner ble absorbans ved 530 nm benyttet som mål på konsentrasjon av rødt fargestoff i prøvene. Figurene under viser resultatene for individene av de fire valgte betesortene. For å finne mengde betacyanin ble ekstinksjonskoeffisienten for betanin på 60 000 L/mol·cm og molekylvekt 550 g/mol benyttet (se Formel 2.2).

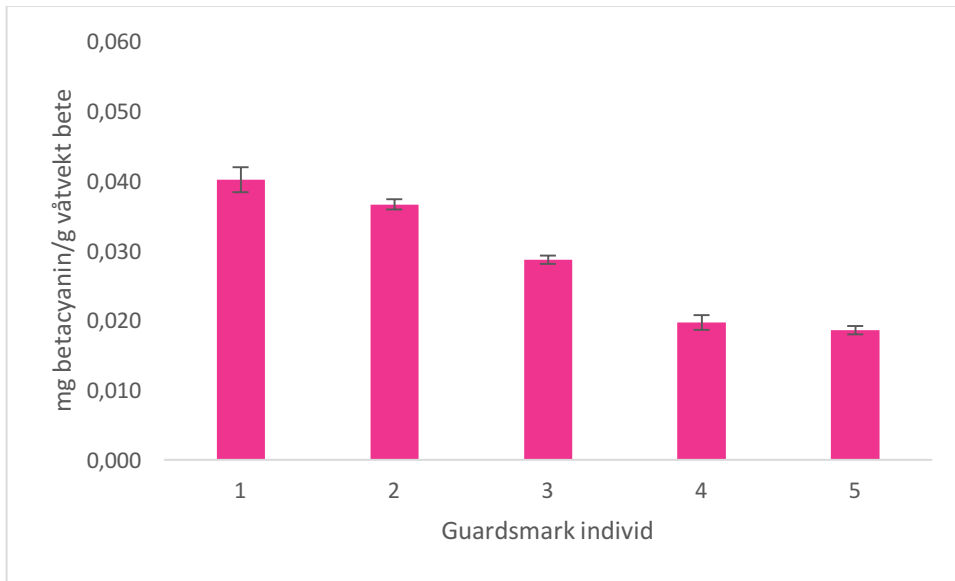
##### 3.3.2.1.1 Gulbete



Figur 3.49: Innhold av betacyanin i mg/g våtvekt bete for ulike gulbeteindivider ('Touchstone Gold').  $\lambda=530$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,032 \pm 0,001$  mg betacyanin/g våtvekt bete. Det er signifikant forskjell i betacyanininholdet i de ulike gulbeteindividene (ANOVA;  $df=4$ ,  $P=0,018$ ). Det er 12% mer i individet med den høyeste toppen sammenlignet med den laveste (henholdsvis individ 1 og 2).

### 3.3.2.1.2 Polkabete



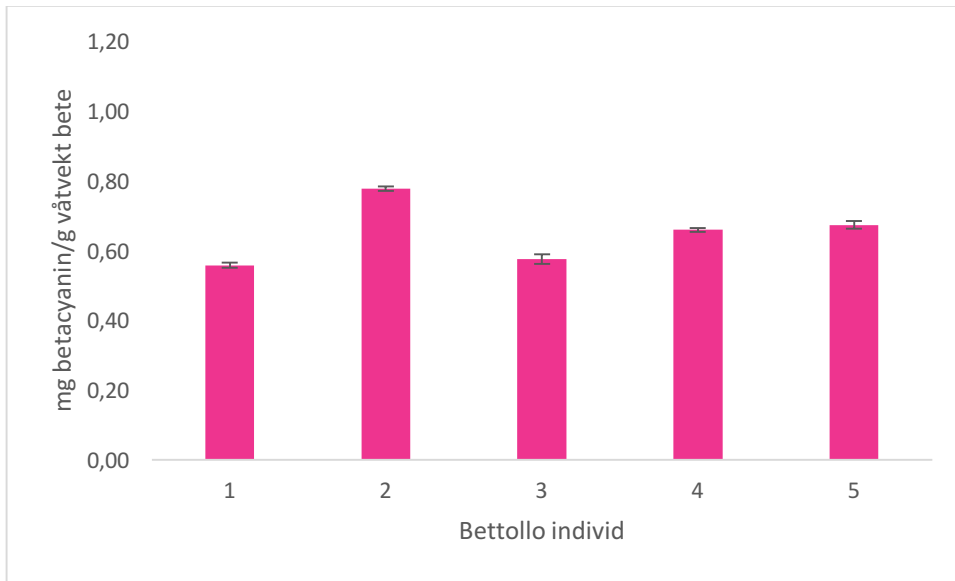
Figur 3.50: Innhold av betacyanin i mg/g våtvekt bete for ulike polkabeteindivider ('Guardsmark').  $\lambda=530$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,029 \pm 0,009$  mg betacyanin/g våtvekt bete. Også her er det signifikant forskjell i betacyanininnholdet i de forskjellige individer (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-9}$ ). Det er mer enn dobbelt så mye (116%) betacyanin i individet med den høyeste verdien sammenlignet med den med lavest innhold (henholdsvis individ 1 og 5). Denne relativt store forskjellen illustreres godt i Figur 3.51. Her vises to individer som er delt på midten. Visuelt ser man også tydelig stor forskjell i mengde fargestoff i denne sorten.



Figur 3.51: To ulike individer av beten 'Guardsmark' (polkabete). Foto: Anette Brandsnes

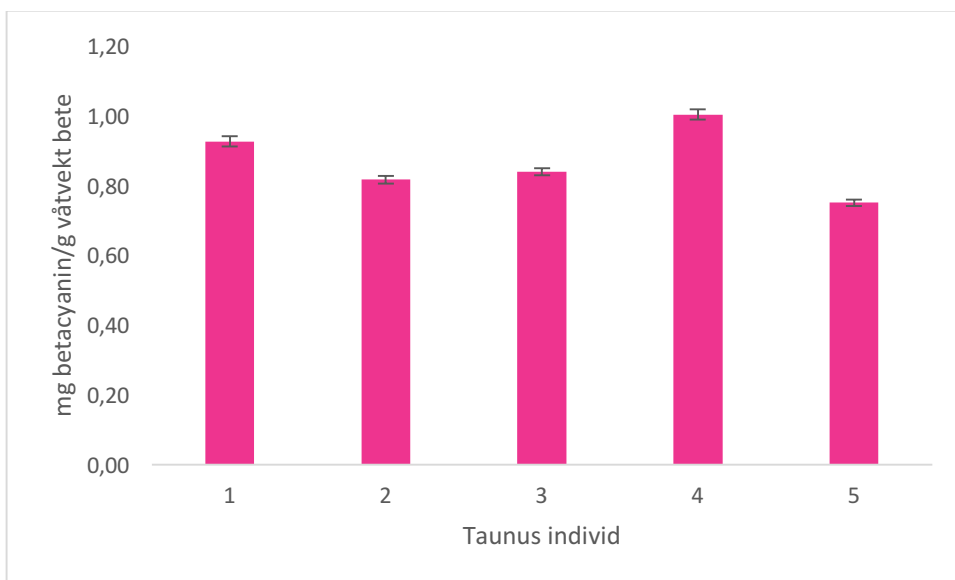
### 3.3.2.1.3 Forbrukerrødbete



Figur 3.52: Innhold av betacyanin i mg/g våtvekt bete for ulike rødbeteindivider ('Bettollo').  $\lambda=530$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,65 \pm 0,08$  mg betacyanin/g våtvekt bete. Her ble det også vist signifikant individforskjell (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-9}$ ). Det er 40% mer i individet med den høyeste toppen sammenlignet med den laveste (henholdsvis individ 2 og 1).

### 3.3.2.1.4 Industrirødbete



Figur 3.53: Innhold av betacyanin i mg/g våtvekt bete for ulike industrirødbeteindivider ('Taurus').  $\lambda=530$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,87 \pm 0,09$  mg betacyanin/g våtvekt bete. I industrirødbeten var det også signifikant forskjell i betacyanininnhold mellom individer



## Resultater og diskusjon

(ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-8}$ ). Det er 34% mer i individet med den høyeste toppen sammenlignet med den laveste (henholdsvis individ 4 og 5).

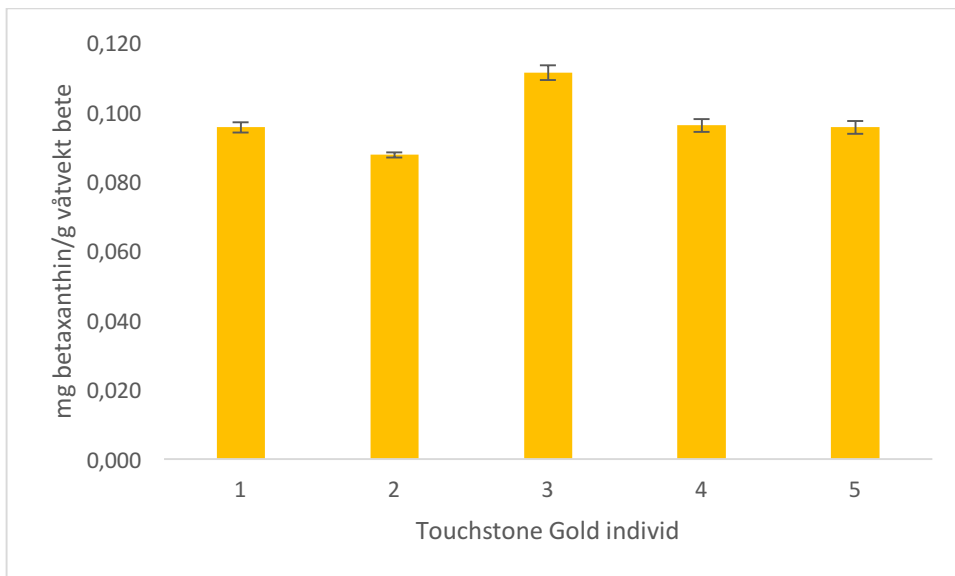
### 3.3.2.1.5 Oppsummering av individanalysen - betacyanin

Betene viser varierende grad av individforskjell. Gulbeten og polkabeten inneholder mindre enn 5% betacyanin sammenlignet med mengden i de to rødbetesortene. De to rødbetesortene inneholder mer en 20 ganger mer betacyanin enn gul- og polkabeten. Rødbetene viser i tillegg høy variasjon blant individer, 34% og 40% forskjell mellom laveste og høyeste individ for henholdsvis industribeten ('Taunus') og forbrukerrødbete ('Bettollo'). Her kan derfor valg av individ være avgjørende for totalutbytte betacyanin og med dette det potensielt helsefremmende antioksidantinnholdet.

### 3.3.2.2 Mengde betaxanthin i ulike individer av samme sort

I analysen for betaxanthiner ble absorbans ved 474 nm benyttet som mål på konsentrasjon av gult fargestoff i prøvene. Figurene under viser resultatene for individene av de fire valgte betesortene. For å finne mengde betacyanin ble ekstinksjonskoeffisienten for betanin på 48 000 L/mol·cm og molekylvekt 339 g/mol benyttet (se Formel 2.2).

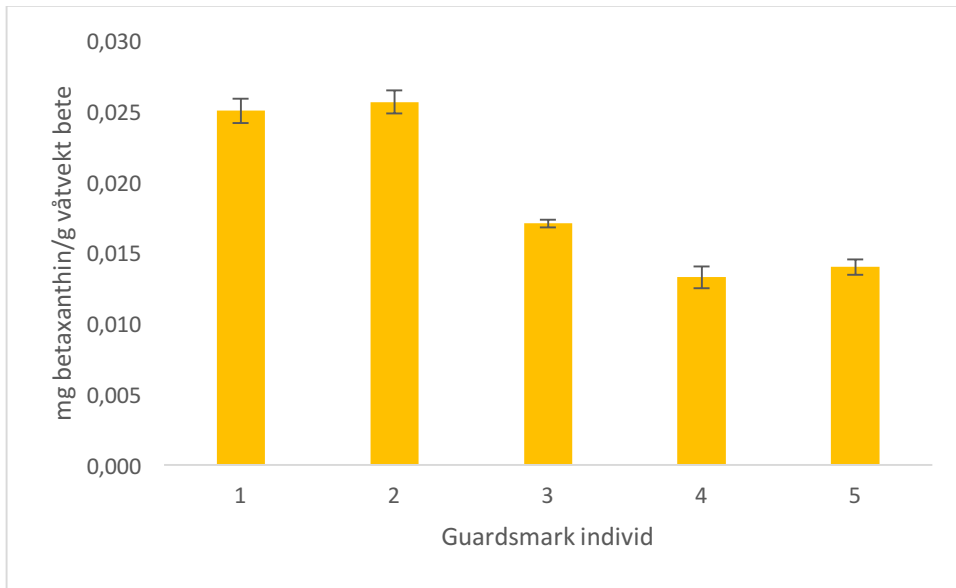
#### 3.3.2.2.1 Gulbete



Figur 3.54: Innhold av betaxanthin i mg/g våtvekt bete for ulike gulbeteindivider ('Touchstone Gold').  $\lambda=474$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,097 \pm 0,008$  mg betaxanthin/g våtvekt bete. Det var signifikant forskjell i betaxanthininnhold i ulike individer gulbete (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-6}$ ). Det er 26% mer betaxanthin i individet med den høyeste verdien sammenlignet med den med lavest innhold (henholdsvis individ 3 og 2).

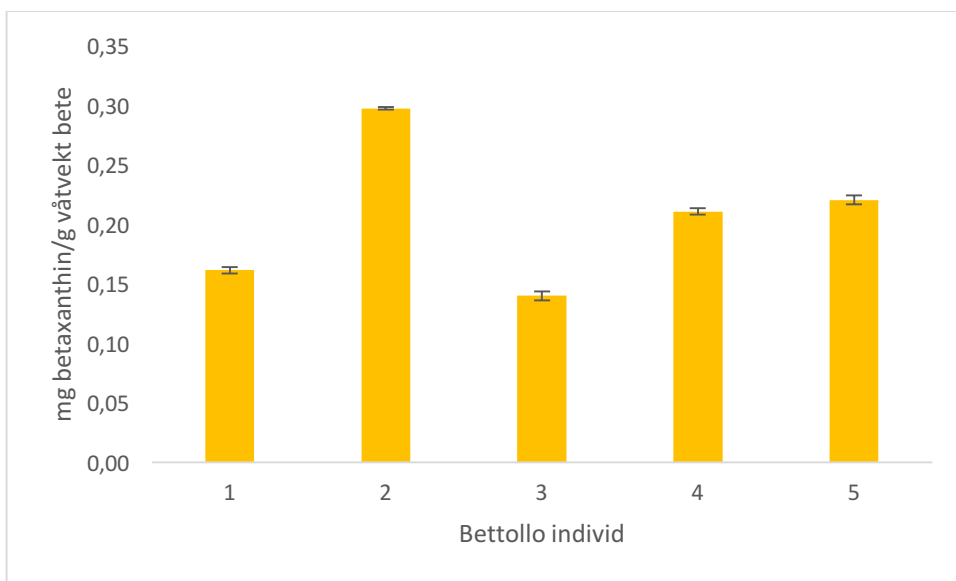
### 3.3.2.2.2 Polkabete



Figur 3.55: Innhold av betaxanthin i mg/g våtvekt bete for ulike polkabeteindivider ('Guardsmark').  $\lambda=474$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,019 \pm 0,005$  mg betaxanthin/g våtvekt bete. Det var signifikant forskjell i betaxanthininnhold i ulike individer gulbete (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-9}$ ). Det er 93% mer betaxanthin i individet med den høyeste verdien sammenlignet med den med lavest innhold (henholdsvis individ 2 og 4).

### 3.3.2.2.3 Forbrukerrødbete

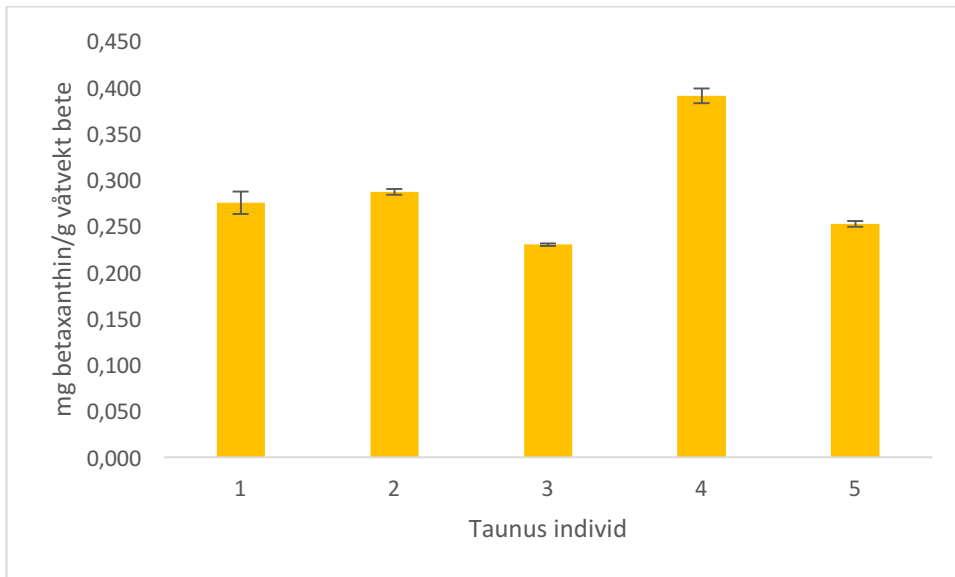


Figur 3.56: Innhold av betaxanthin i mg/g våtvekt bete for ulike rødbeteindivider ('Bettollo').  $\lambda=474$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

## Resultater og diskusjon

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,21 \pm 0,05$  mg betaxanthin/g våtvekt bete. Også her var det signifikant forskjell i betaxanthininnhold i ulike individer rødbete (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-12}$ ). Det er 112% mer betaxanthin i individet med den høyeste verdien sammenlignet med den med lavest innhold (henholdsvis individ 2 og 3).

### 3.3.2.2.4 Industrirødbete



Figur 3.57: Innhold av betaxanthin i mg betaxanthin/g våtvekt bete for ulike industrirødbeteindivider ('Taunus').  $\lambda=474$  nm.  $n=3$  for hvert individ.

I gjennomsnitt inneholdt de fem individene  $0,29 \pm 0,06$  mg/g våtvekt bete. Det var signifikant forskjell i betaxanthininnhold i ulike individer industrirødbete (ANOVA;  $df=4$ ,  $P<10^{-9}$ ). Det er 70% mer betaxanthin i individet med den høyeste verdien sammenlignet med den med lavest innhold (henholdsvis individ 4 og 3).

### 3.3.2.2.5 Oppsummering av individanalysen – betaxanthin

Som for betacyaninanalysen viste betene varierende grad av individforskjeller i mengde betaxanthin. Dette kan kanskje ha sammenheng med varierende vekstforhold for de ulike individene. Gulbeten ('Touchstone Gold') har den minste individvariasjonen av de fire sortene, fulgt av industrirødbeten ('Taunus'). Imidlertid er innholdet i det individet fra industrirødbeten med minst betaxanthin likevel det dobbelte av innholdet i den høyeste gulbeteindividmåling (Figur 3.57, individ 3 mot Figur 3.54, individ 3).

Polkabeten ('Guardsmark') inneholder tydelig minst betaxanthin i forhold til de andre sortene. Igjen er det de to rødbetesortene som skiller seg ut med de høyeste innholdene av betaxanthin. Også her er det industrirødbeten som kommer høyest ut og denne har dermed mest av både gule og røde fargestoffer.

### 3.3.2.2.6 Oppsummering innhold av betalainer i fire sorter beter

I denne studien ble det funnet at industrirødbeten ('Taunus') er den klart beste kilden til betalainer, både betacyaniner og betaxanthiner, etterfulgt av forbrukerrødbete ('Bettollo').

## Resultater og diskusjon

Industrirødbeten ('Taunus') inneholdt nesten dobbelt så mye betalainer som forbrukerrødbeten ('Bettollo') og 10 til 50 ganger mer enn polka- og gulbeten (henholdsvis 'Guardsmark' og 'Touchstone Gold'), beregnet per gram tørrvekt. Rødbeten er dermed et naturlig valg for dem som ønsker høyest fargeutbytte eller det sunneste alternativet med tanke på et høyt innhold av antioksidanter.

## 4. Konklusjon

Betaninstandarden kunne brukes til kvalitativ analyse av betalainkomponenter ved sammenligning av retensjonstider og topparealer. Den ble også brukt for å verifisere måleområdet til spektrofotometeret. Internstandarden kunne brukes for å studere ekstraksjonsmønsteret til betalainer, samt beregne % gjenfunnet mengde i ekstrakt.

Den mest effektive ekstraksjonsmetoden av betalainer som ble testet var homogenisering med Polytron®, løsemiddel med 25% meOH, 5:1 løsemiddel/bete-ratio og sentrifugering ved 39 000 g ved 4°C i 10 min.

Betalainer ble grunnlinjeseparert ved HPLC-analyse med en Kinetex XB C18 kolonne ved gradienteluering med vann og ACN med 0,1% maursyre som mobilfase, kolonnetemperatur 25°C, og flow 0,2 mL/min. Betacyaniner ble detektert med DAD UV-Vis ved 530 nm og betaxanthiner ved 474 nm.

HPLC-ESI-Q-TOF var egnet for kvalitativ analyse av betalainer. Ionisering i positiv skannmodus ga noe bedre resultater enn negativ modus. Det ble identifisert 10 betalainforbindelser i forbrukerrødbete, 7 sikre (score over 90) og 3 noe mer usikre (score under 90).

Beter ble lagret i opptil en måned ved -20°C eller -80°C uten tegn til signifikant forskjell i tap av farge. Frysetørking ga mindre utbytte ved 1. ekstraksjonsrunde og krevde flere ekstraksjonsrunder sammenlagt enn ferske og fryste prøver. Rødbeter ekstrahert ved pH mellom 4,7 og 6,6 viste ingen forskjell i stabilitet ved lagring i opptil 6 dager. Betalainer i ekstrakter holdt seg godt i minst 18 timer ved 4°C og uten eksponering for lys og luft. Reproducerbarheten innad i forsøk var tilstrekkelig (RSD < 5%), og ingen signifikant forskjell ble funnet mellom gjentatte dag til dag forsøk.

Betalaininnholdet i de fire analyserte betesortene ble bestemt ved hjelp av absorbansverdier fra spektrofotometermålinger og ekstinksjonskoeffisientene til betanin og vulgaxanthin I. Det var stor forskjell mellom individer av samme sort, og størst forskjell var det i betacyanininnhold mellom individer av sorten 'Guardsmark' (polkabete) med 116% forskjell mellom laveste og høyeste verdi. I betaxanthininnhold var det størst forskjell mellom individer av sorten 'Bettollo' (forbrukerrødbete) med 112% forskjell mellom laveste og høyeste verdi.

Det var også stor forskjell i totalt innhold av betalainer hvor 'Taunus' (industrirødbete) med 1,16 mg/g våtvekt hadde høyest innhold, etterfulgt av 'Bettollo' (forbrukerrødbete) med 0,85 mg/g våtvekt og 'Touchstone Gold' (gulbete) med 0,13 mg/g våtvekt. 'Guardsmark' (polkabete) hadde klart lavest totalinnhold med 0,05 mg/g våtvekt.

## 5. Videre arbeid

I denne oppgaven er det gjort forsøk for å optimalisere en metode for ekstraksjon og analyse av betalainer i rødbete. Noe arbeid gjenstår for å finne den mest ideelle metoden. Lenger sentrifugeringstid bør testes ut for å se om dette kan gi en fastere pellet, og om dette går ut over det totale betalainutbyttet. Eventuelt hadde det vært mulig å undersøke ekstraksjon ved filtrering. Ekstraksjon med mindre andel meOH kan også være aktuelt å studere.

Det ble oppdaget en endring i farge fra gult mot oransje i forsøk med gulbete. Det var tydelig at lys og luft innvirker på strukturer i betaxanthiner. Hva slags kjemisk reaksjon denne endringen skyldes er uvisst og kan være spennende å se nærmere på.

For videre lagringsstudier kan det være interessant å analysere betar direkte etter høsting som 0-tid. Betalainers stabilitet ved lagring i mer enn én måned gjenstår å teste. Frysetørking og frysing ved lave temperaturer kan være mer avgjørende for farge dersom lagringstiden går over flere måneder eller år.

Betalaininnhold i uprosesserte betar er studert ved ulike betingelser, men det hadde også vært interessant å undersøke hva som skjer med betalainer under prosessering som koking, steking og ovnsbaking. Det hadde også vært av helsemessig interesse å studere hvordan betalainer tas opp i kroppen og i hvilken grad.

Det hadde vært en stor fordel for kvantifisering å ha tilgang på rene standarder, så rensing av betalainer kan være aktuelt ved videre studier.

## 6. Referanseliste

2014. *Totaloversikten* [Online]. Opplysningskontoret for frukt og grønt. Available: <http://www.frukt.no/> [Accessed 27.04.2016].
- ALBANO, C., NEGRO, C., TOMMASI, N., GERARDI, C., MITA, G., MICELI, A., DE BELLIS, L. & BLANDO, F. 2015. Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 269-280.
- ANDERSON, J. J. B., ROOT, M. M. & GARNER, S. C. 2015. *Human Nutrition: Healthy Options for Life*, Jones & Bartlett Learning.
- ASARD, H., MAY, J. M. & SMIRNOFF, N. 2004. *Vitamin C: Functions and Biochemistry in Animals and Plants*, BIOS Scientific Publishers.
- AZEREDO, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365-2376.
- BACCARD, N., HOIZEY, G., FRANCES, C., LAMIABLE, D., TRENQUE, T. & MILLART, H. 1999. Simultaneous determination of inulin and p-aminohippuric acid (PAH) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 124, 833-836.
- CAI, Y. & CORKE, H. 1999. *Amaranthus* Betacyanin Pigments Applied in Model Food Systems. *Journal of Food Science*, 64, 869-873.
- CAI, Y., SUN, M. & CORKE, H. 2003. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294.
- CASTELLANOS-SANTIAGO, E. & YAHIA, E. M. 2008. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758-5764.
- CLEMENT, J. S. & MABRY, T. J. 1996. Pigment Evolution in the Caryophyllales: a Systematic Overview\*. *Botanica Acta*, 109, 360-367.
- CLIFFORD, T., HOWATSON, G., WEST, D. J. & STEVENSON, E. J. 2015. The Potential Benefits of Red Beetroot Supplementation in Health and Disease. *Nutrients*, 7, 2801-2822.
- DAHLIN, A. *ESI* [Online]. Available: <http://www.waters.com/> [Accessed 16.04.2016 2016].
- DE AZEREDO, H. M. C., PEREIRA, A. C., DE SOUZA, A. C. R., GOUVEIA, S. T. & MENDES, K. C. B. 2009. Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2464-2469.
- DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. R. & PAREDES-LÓPEZ, O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis,

## Referanseliste

- Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.
- DEWICK, P. M. 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons.
- FENNEMA, O. R. 1996. *Food Chemistry*, Marcel Dekker, Inc.
- GIROD, P.-A. & ZRYD, J.-P. 1991. Secondary Metabolism in Cultured Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Cells: Differential Regulation of Betaxanthin and Betacyanin Biosynthesis. *Journal of Plant Biotechnology*, 25.
- GRØNT, O. F. F. O. 2016. *Rødbete* [Online]. Opplysningskontoret for frukt og grønt. Available: <http://www.frukt.no/ravarer/gronnsaker/rodbete/> [Accessed 28.04.2016].
- HAGE, D. S. & CARR, J. D. 2011. *Analytical Chemistry and Quantitative Analysis*, Pearson Prentice Hall.
- HELSEDIREKTORATET. 2016. *Kostråd fra Helsedirektoratet* [Online]. [Accessed 08.05.2016 2016].
- HERBACH, K., STINTZING, F. & CARLE, R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science*, 69, C491-C498.
- HOFFMANN, E. D. & STROOBANT, V. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd.
- HOLTEBEKK, T. 2009. *Spektrofotometer* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/spektrofotometer> [Accessed 17.04.2016].
- HUI, Y. H., FARID, M. M., WELTI-CHANES, J., FASINA, O. & NOOMHORM, A. 2006. *Food Drying Science and Technology: Microbiology, Chemistry, Application*, DEStech Publications, Inc.
- JIANG, J., HE, X. & CANE, D. E. 2007. Biosynthesis of the Earthy Odorant Geosmin by a Bifunctional *Streptomyces Coelicolor* Enzyme. *Nature Chemical Biology*, 3, 711-715.
- JONES, S. 2012. *Simulation of Radio Frequency Quadrupole Mass Analyzer* [Online]. Available: [http://militzer.berkeley.edu/EPS109/final\\_projects\\_2012/](http://militzer.berkeley.edu/EPS109/final_projects_2012/) [Accessed 16.04.2016].
- KNIGHT, J. A. 1998. Free Radicals: Their History and Current Status in Aging and Disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 28.
- KUGLER, F., GRANEIS, S., STINTZING, F. C. & CARLE, R. 2007a. Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *Z Naturforsch C*, 62, 311-8.
- KUGLER, F., STINTZING, F. C. & CARLE, R. 2007b. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MS n. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387, 637-648.



## Referanseliste

- KUJALA, T. S., LOPONEN, J. M., KLIKA, K. D. & PIHLAJA, K. 2000. Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5338-5342.
- KUJALA, T. S., VIENOLA, M. S., KLIKA, K. D., LOPONEN, J. M. & PIHLAJA, K. 2002. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *European Food Research and Technology*, 214, 505-510.
- LIU, R. H. 2003. Health Benefits of Fruit and Vegetables are from Additive and Synergistic Combinations of Phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78.
- LORENTZEN, G. 2009. *Frysetørring* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/frysetørring> [Accessed 18.04.2016].
- MALLET, T. 2014. *Atmospheric Pressure Ionisation of Small Molecules* [Online]. Wiley. [Accessed 08.05.2016].
- MATVAREGUIDEN. *Oversikt over E-nummer i mat og drikke* [Online]. [Accessed 16.04.2016].
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C. & THEOHARIDES, T. C. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 637-751.
- MILLER, J. M. 2005. *Chromatography: Concepts and Contrasts*, John Wiley & Sons, Inc.
- NEELWARNE, B. 2012. *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications*, Springer US.
- NIJVELDT, R. J., NOOD, E. V., HOORN, D. E. C. V., BOELEN, P. G., NORREN, K. V. & LEEUWEN, P. A. M. V. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- NILSSON, T. 1970. Studies into Pigments of Beet Root. *Lantbrukshögskolans Annaler*.
- OH, M. 2008. *Plant Adaptation and Enhancement of Phytochemicals in Lettuce in Response to Environmental Stresses*.
- PAVOKOVIC, D. & KRŠNIK-RASOL, M. 2011. Complex Biochemistry and Biotechnological Production of Betalains.
- PHENOMENEX. 2016. *Kinetex column* [Online]. Available: <http://www.phenomenex.com/Kinetex> [Accessed 16.04.2016].
- PROTEOCHEM. 2016. *Applications for LC-MS Acetonitrile with 0,1% Formic Acid v/v* [Online]. Available: <http://www.proteochem.com/lcmsacetonitrilewith01formicacidv11-p-212.html> [Accessed 03.05.2016].

## Referanseliste

- SAXENA, M., SAXENA, J., NERNA, R., SINGH, D. & GUPTA, A. 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1.
- SHOU, W. Z. & NAIDONG, W. 2005. Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds. *Journal of Chromatography*, 825, 186-192.
- SIGMA-ALDRICH. *p-Aminohippuric acid* [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1422?lang=en&region=NO> [Accessed 18.04.2016].
- SJØVOLD, J. 2006. *Ny lavtemperatur tørketeknikk som konserveringsmetode for biobankmaterialer*. Master, NTNU.
- SLATNAR, A., STAMPAR, F., VEBERIC, R. & JAKOPIC, J. 2015. HPLC-MSn Identification of Betalain Profile of Different Beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) Parts and Cultivars. *Journal of Food Science*, 80, C1952-C1958.
- SOLBERG, S. 2016 *Rødbete* [Online]. Agropub: Nettside for økologisk landbruk. Available: <http://www.agropub.no/id/2380?hidemenu=true&kap=kap6> [Accessed 16.04.2016].
- SONG, W., DERITO, C. M., LIU, M. K., HE, X., DONG, M. & LIU, R. H. 2010. Cellular Antioxidant Activity of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6621-6629.
- STINTZING, F. C. & CARLE, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 19-38.
- STINTZING, F. C. & CARLE, R. 2007. Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 514-525.
- STINTZING, F. C., TRICHTERBORN, J. & CARLE, R. 2006. Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food chemistry*, 94, 296-309.
- STRACK, D., VOGT, T. & SCHLIEMANN, W. 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- SUMAYA-MARTÍNEZ, M. T., CRUZ-JAIME, S., MADRIGAL-SANTILLÁN, E., GARCÍA-PAREDES, J. D., CARIÑO-CORTÉS, R., CRUZ-CANSINO, N., VALADEZ-VEGA, C., MARTINEZ-CARDENAS, L. & ALANÍS-GARCÍA, E. 2011. Betalain, Acid Ascorbic, Phenolic Contents and Antioxidant Properties of Purple, Red, Yellow and White Cactus Pears. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6452.
- UGGERUD, E., HOLTEBEKK, T. & WIBETOE, G. 2009. *Massespektrometer* [Online]. Store norske leksikon. Available: <https://snl.no/massespektrometer> [Accessed 16.04.2016].

## Referanseliste

USDA 2016. 11080 Beets, raw. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28: United States Department of Agriculture.

VIEIRA, E. R. 1996. *Elementary Food Science*, Springer Science+Business Media, B.V.

WROBLEWSKA, M., JUSKIEWICZ, J. & WICZKOWSKI, W. 2011. Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 178-178.

YIZHONG CAI, M. S., AND HAROLD CORKE 2005. HPLC Characterization of Betalains from Plants in the Amaranthaceae.

## 7. Appendiks

### 7.1 Internstandard data

Tabell 7.1: Data som ble brukt ved beregning av % gjenfunnet para-aminohippursyre. Vanninnhold i betene brukt her var 85,9%.

Prøve	Innveid bete (g)	Innveid PAH (mg)	Løsemidl (mL)	Areal (mAU*s)	Teoretisk konsentrasjon (mg/mL)	Gjenfunnet konsentrasjon (mg/mL)	% gjenfunnet
25% meOH	5,003	12,53	25	17028	0,428	0,320	74,6
	5,005	12,48	25	17569	0,426	0,330	77,3
	5,005	12,50	25	17349	0,427	0,326	76,2
75% meOH	4,999	12,46	25	20878	0,426	0,392	92,0
	5,006	12,59	25	20804	0,430	0,390	90,8
	5,003	12,58	25	20484	0,430	0,384	89,4
	5,003	12,50	25	18462	0,427	0,346	81,1

### 7.2 Absorbansverdier fra spektrofotometermåling

Tabell 7.2: 'Touchstone Gold' (gulbete). I prøvenavnet betegner tallene individ og bokstaven parallell.

Prøve	Innveid bete (g)	Fortynnings grad (DF)	Løsemiddel (mL)	A474	A530	Betacyanin (mg/L)	Betaxanthin (mg/L)
1a	5,069	1	100	0,7709	0,1863	1,7088	5,4447
1b	5,034	1	100	0,7554	0,1793	1,6445	5,3353
1c	5,052	1	100	0,7393	0,1819	1,6687	5,2212
2a	5,009	1	100	0,6757	0,1608	1,4750	4,7724
2b	5,026	1	100	0,6915	0,1627	1,4928	4,8835
2c	5,007	1	100	0,6806	0,1603	1,4704	4,8067
3a	4,965	1	100	0,8398	0,1696	1,5559	5,9314
3b	4,992	1	100	0,8521	0,1692	1,5527	6,0176
3c	4,996	1	100	0,8826	0,1784	1,6370	6,2334
4a	5,034	1	100	0,7615	0,1819	1,6692	5,3779
4b	5,031	1	100	0,7286	0,1740	1,5959	5,1459
4c	4,990	1	100	0,7525	0,1808	1,6588	5,3144
5a	5,037	1	100	0,7975	0,1813	1,6636	5,6321
5b	5,038	1	100	0,7616	0,1586	1,4552	5,3790
5c	5,008	1	100	0,7824	0,1719	1,5768	5,5257

## Appendiks

Tabell 7.3: 'Guardsmark' (polkabetete). I prøvenavnet betegner tallene individ og bokstaven parallell.

Prøve	Innveid bete (g)	Fortynnings grad (DF)	Løsemiddel (mL)	A474	A530	Betacyanin (mg/L)	Betaxanthin (mg/L)
1a	5,001	1	75	0,2420	0,3031	2,7811	1,7090
1b	5,016	1	75	0,2434	0,2987	2,7400	1,7188
1c	5,040	1	75	0,2269	0,2756	2,5287	1,6024
2a	5,003	1	75	0,2534	0,2733	2,5075	1,7899
2b	5,054	1	75	0,2408	0,2650	2,4308	1,7006
2c	5,044	1	75	0,2376	0,2644	2,4261	1,6777
3a	5,011	1	75	0,1630	0,2092	1,9191	1,1508
3b	5,065	1	75	0,1597	0,2052	1,8828	1,1281
3c	5,007	1	75	0,1639	0,2133	1,9572	1,1575
4a	5,037	1	75	0,1180	0,1335	1,2248	0,8330
4b	5,008	1	75	0,1245	0,1448	1,3286	0,8795
4c	5,014	1	75	0,1350	0,1514	1,3894	0,9534
5a	5,018	1	75	0,1344	0,1386	1,2715	0,9492
5b	5,006	1	75	0,1255	0,1292	1,1853	0,8863
5c	5,005	1	75	0,1373	0,1376	1,2628	0,9697

Tabell 7.4: 'Bettollo' (forbrukerrødbete). I prøvenavnet betegner tallene individ og bokstaven parallell.

Prøve	Innveid bete (g)	Fortynnings grad (DF)	Løsemiddel (mL)	A474	A530	Betacyanin (mg/L)	Betaxanthin (mg/L)
1a	5,051	7	100	0,3734	0,4442	28,5246	18,4585
1b	5,008	7	100	0,3632	0,4360	27,9974	17,9547
1c	4,993	7	100	0,3548	0,4256	27,3333	17,5384
2a	5,013	7	100	0,5664	0,6052	38,8669	28,0009
2b	5,007	7	100	0,5697	0,6119	39,2939	28,1631
2c	5,010	7	100	0,5651	0,6013	38,6190	27,9391
3a	4,993	7	100	0,3341	0,4381	28,1348	16,5181
3b	5,010	7	100	0,3421	0,4436	28,4887	16,9136
3c	5,048	7	100	0,3606	0,4673	30,0101	17,8272
4a	5,001	7	100	0,4374	0,5090	32,6868	21,6225
4b	4,993	7	100	0,4340	0,5109	32,8101	21,4559
4c	5,025	7	100	0,4495	0,5210	33,4562	22,2231
5a	5,000	7	100	0,4477	0,5122	32,8910	22,1322
5b	5,023	7	100	0,4669	0,5315	34,1331	23,0814
5c	5,015	7	100	0,4655	0,5324	34,1890	23,0127

## Appendiks

Tabell 7.5: 'Taurus' (industrirodete). I prøvenavnet betegner tallene individ og bokstaven parallell.

Prøve	Innveid bete (g)	Fortynnings grad (DF)	Løsemiddel (mL)	A474	A530	Betacyanin (mg/L)	Betaxanthin (mg/L)
1a	4,948	7	100	0,5839	0,7065	45,3706	28,8675
1b	4,993	7	100	0,6070	0,7356	47,2388	30,0100
1c	5,080	7	100	0,5564	0,7243	46,5182	27,5080
2a	5,081	7	100	0,5649	0,6345	40,7460	27,9253
2b	4,949	7	100	0,5657	0,6386	41,0093	27,9683
2c	5,002	7	100	0,5650	0,6381	40,9810	27,9302
3a	5,052	7	100	0,5147	0,6595	42,3534	25,4435
3b	5,007	7	100	0,5031	0,6457	41,4685	24,8710
3c	5,048	7	100	0,5138	0,6704	43,0541	25,3995
4a	5,033	7	100	0,7424	0,7894	50,6971	36,7004
4b	4,945	7	100	0,7493	0,7840	50,3464	37,0445
4c	5,003	7	100	0,7216	0,7667	49,2361	35,6721
5a	5,029	7	100	0,4983	0,5785	37,1502	24,6327
5b	5,013	7	100	0,5114	0,5945	38,1790	25,2804
5c	4,957	7	100	0,4971	0,5800	37,2504	24,5749

### 7.3 Frysetøking data

Tabell 7.6: 'Touchstone Gold' (gulbete) vekt før og etter frysetøking og % vanninnhold.

Prøve	Førvekt (g)	Ettervekt (g)	Differanse	% vann
1a	48,152	6,465	41,687	86,57
1b	51,658	7,147	44,511	86,16
2a	56,585	8,422	48,163	85,12
2b	62,711	9,314	53,397	85,15
3a	57,845	8,324	49,521	85,61
3b	57,927	7,985	49,942	86,22
4a	56,111	7,970	48,141	85,80
4b	56,094	8,252	47,842	85,29
5a	53,061	7,395	45,666	86,06
5b	61,720	8,438	53,282	86,33

## Appendiks

Tabell 7.7: 'Guardsmark' (polkabete) vekt før og etter frysetørrking og % vanninnhold.

Prøve	Førvekt (g)	Ettervekt (g)	Differanse	% vann
1a	58,075	9,852	48,223	83,04
1b	56,008	9,439	46,569	83,15
2a	58,081	10,040	48,041	82,71
2b	58,124	10,217	47,907	82,42
3a	58,775	9,603	49,172	83,66
3b	64,673	10,922	53,751	83,11
4a	54,907	9,115	45,792	83,40
4b	62,961	10,399	52,562	83,48
5a	61,204	10,486	50,718	82,87
5b	53,833	9,029	44,804	83,23

Tabell 7.8: 'Bettollo' (forbrukerrødbete) vekt før og etter frysetørrking og % vanninnhold.

Prøve	Førvekt (g)	Ettervekt (g)	Differanse	% vann
1a	55,181	9,170	46,011	83,38
1b	54,964	8,934	46,030	83,75
2a	55,948	9,351	46,597	83,29
2b	59,797	9,844	49,953	83,54
3a	60,190	9,606	50,584	84,04
3b	59,025	9,640	49,385	83,67
4a	60,052	10,164	49,888	83,07
4b	57,034	9,560	47,474	83,24
5a	58,901	10,271	48,630	82,56
5b	54,308	9,474	44,834	82,56

Tabell 7.9: 'Taurus' (industrirødbete) vekt før og etter frysetørrking og % vanninnhold.

Prøve	Førvekt (g)	Ettervekt (g)	Differanse	% vann
1a	65,896	8,192	57,704	87,57
1b	62,718	7,144	55,574	88,61
2a	62,362	7,644	54,718	87,74
2b	59,793	7,066	52,727	88,18
3a	60,183	7,560	52,623	87,44
3b	63,628	7,721	55,907	87,87
4a	54,588	6,415	48,173	88,25
4b	45,512	5,203	40,309	88,57
5a	57,672	6,980	50,692	87,90
5b	65,634	7,800	57,834	88,12

## Appendiks

Tabell 7.10: Rødbete av ukjent sort (fra butikk), vekt før og etter frysetørrking og % vanninnhold.

<b>Prøve</b>	<b>Førvekt (g)</b>	<b>Ettervekt (g)</b>	<b>Differanse</b>	<b>% vann</b>
1	36,506	5,158	31,348	85,87
2	34,833	5,093	29,740	85,38
3	35,107	5,103	30,004	85,46
4	38,320	5,602	32,718	85,38
5	29,466	4,425	25,041	84,98
6	38,119	5,669	32,450	85,13
7	33,776	5,151	28,625	84,75
8	36,143	5,451	30,692	84,92
9	35,215	4,976	30,239	85,87







Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway