

## Bestemmelse af flavanoler (tanniner) i bygkerner

*Determination of flavanols (tannins) in barley grains*

Ebbe Truelsen

### Resumé

Forskellige parametre blev undersøgt ved bestemmelse af tanninindholdet i bygkerner med 4-dimethylaminocinnamaldehyd (DAC). Flavanolerne blev ekstraheret med  $2 \times 5$  ml 70% acetone, 10 mM HCl ved stuetemperatur. Ved reaktionen mellem flavanoler (tanniner) og DAC dannedes et grønt reaktionsprodukt med et absorptionsmaksimum ved 640 nm. Reaktionshastigheden var ens ved reaktionen mellem DAC og henholdsvis catechin (standard) og tanninerne i bygekstrakt. Endvidere udviste reaktionsproduktet i de to tilfælde ens absorptionskurver. Der fandtes en lineær standardkurve ved måling af den maksimale absorbans (efter 1–3 minutter). I 80 bygprøver blev der fundet mellem 0,078% og 0,131% tanniner med en standardafvigelse på 0,0012% svarende til en variationskoefficient på 1,1%. Metodens egnethed til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af tanniner i bygkerner diskuteres.

**Nøgleord:** Tanniner, flavanoler, proanthocyanidiner, bygkerne.

### Summary

A rapid method for determination of tannins in barley grains is described. The flavanols were extracted with 70% acetone, 10 mM HCl at room temperature and determined by reaction with 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DAC). The green reaction product had an absorption maximum at 640 nm. A linear standard curve was found by measuring the maximum absorbance, which appeared 1–3 minutes after mixing the reagents.

The reaction rates were identical for the reaction between DAC and catechin (standard) and the extracted barley tannins, respectively. Between 0.078% and 0.131% of tannins with a standard deviation of 0.0012% corresponding to a CV of 1.1% were found in 80 barley samples. The adequacy of this method for the determination of tannins in barley grains is discussed.

**Key words:** Tannins, flavanols, proanthocyanidins, barley grain.

## Indledning

Tanniner eller garvestoffer findes ret udbredt i planteriget. Deres hovedfunktion i planterne er sandsynligvis at binde sig til indtrængende enzymer fra mikrobielle angreb og derved hæmme deres virkning (Swain, 1979). Tanninmolekylerne indeholder adskillige fenolgrupper, som bevirker dannelse af brintbindinger til carbonylgrupperne i proteinernes peptid- og amidbindinger (van Sumere et al., 1975).

I foderplanter har tanninerne i nogle tilfælde givet anledning til ret store fodringsmæssige problemer (Marquardt et al., 1977; Swain, 1979). Det skyldes, at fordøjelsesenzymerne i én-mavede dyr kun i begrænset omfang er i stand til at nedbryde tannin-proteinkomplekset, hvorved fordøjelsen af proteinerne nedsættes (Swain, 1979). Blandt kornarterne er der især fundet en høj tanninkoncentration i sorghum (Maxson & Rooney, 1972), men også i byg kan tanninindholdet have en negativ indflydelse på foderværdien (Eggum & Christensen, 1975; Gohl & Thomke, 1976).

Tanninerne inddeles i to hovedgrupper, de hydrolyserbare og de kondenserede tanniner, hvoraf kun de sidstnævnte er påvist i bygkerner. Disse tanniner, der også kaldes proanthocyanidiner, hører kemisk set til flavanolerne (Haslam, 1981). De dannes ved polymerisering af monomere flavan-3-oler (Gupta & Haslam, 1980), således at hvert tanninmolekyle indeholder 2 til 10 af disse enheder (Ribéreau-Gayon, 1972). Bate-Smith (1973) undersøgte kondenserede tanniner med 2 til 4 flavanolenheder og fandt en ret kraftig stigning i deres proteinbindende evne ved stigende polymerisering. Hagerman og Butler (1980) fandt, at 1 mg kondenserede tanniner fra sorghum kunne binde sig til og fælde omkring 12 mg protein.

Det forøgede kendskab til tanninmolekylernes struktur har medført, at det er blevet muligt at benytte mere specifikke analysemetoder til bestemmelse af dem end tidligere. De metoder, der bygger på bestemmelse af totalfenolindholdet i uoprenset planteekstrakt ved forskellige farvereaktioner (A.O.A.C., 1975), har således vist sig at

være for grove og utilstrækkelige til tanninbestemmelse (Haslam, 1981). Det skyldes hovedsagelig, at de giver positiv reaktion med alle fenoler, også tyrosin, ferulinsyre, p-hydroxybenzoesyre, p-coumarinsyre m.m., som ikke hører til tanniner eller flavanoler. Således fandt Griffiths og Welch (1982), at flavanolindholdet udgjorde mindre end en tredjedel af totalfenolindholdet i kerner fra en række bygsorter. De fandt desuden et markant fald i totalfenolindholdet i løbet af de første tre måneder efter høst, sandsynligvis på grund af fald i fenolsyrekoncentrationen (Slomiński, 1980). Derimod fandt de ingen ændringer i flavanolindholdet efter høst, og det må også derfor antages, at metoder, der specifikt bestemmer flavanoler, vil være mere velegnede til tanninbestemmelse i bygkerner. En kromatografisk oprensning af tanninmolekylerne med efterfølgende bestemmelse af deres struktur, polymeriseringsgrad m.m. vil givetvis give en bedre baggrund for vurderingen af deres biologiske virkning, men er til gengæld ret tidskrævende og derfor ikke egnet til rutineanalyser (Gupta & Haslam, 1980).

De kondenserede tanniner bliver nu i stigende omfang bestemt ved reaktion med aldehyder. Metoden bygger i princippet på, at visse aldehyder i sur opløsning vil reagere specifikt med bestemte polyfenoler, hvortil de kondenserede tanniner hører (Ribéreau-Gayon, 1972), hvorimod de ikke reagerer med enkle fenoler som tyrosin, fenolsyrer m.m. I ekstrakt fra bygkerne vil de nævnte aldehyder således næsten udelukkende reagere med flavanoler (McMurrough & McDowell, 1978).

I det følgende er der beskrevet en hurtig og reproducerbar analysemetode til bestemmelse af flavanoler (tanniner) i bygkerner. Den er udarbejdet som en modifikation af en metode, som McMurrough og McDowell (1978) anvendte til bestemmelse af flavanoler i bygkerner ved reaktion med 4-dimethylaminocinnamaldehyd (DAC).

Metoden vil blive anvendt til bestemmelse af tanninindholdet i de almindeligt dyrkede bygsorter ved varieret gødskning.

## Materiale og metoder

Undersøgelserne blev gennemført ved analyse af formalede bygkerner (1 mm sigte). Hvor ikke andet er anført, blev ca. 0,3 g formalet bygkerne slemmet op i 5 ml 70% vandig acetone, 10 mM HCl i et 10 ml centrifugeglas på en Whirlimixer og ekstraheret på et roterende rysteapparat i 2 timer ved stuetemperatur. Derefter centrifugeredes prøverne v.  $3000 \times g$  i 5 min., supernatanten dekanteredes fra, og bundfaldet blev ekstraheret endnu en gang på samme måde. De to supernatanter blev slået sammen og fyldt op til 10 ml med ekstraktionsvæsken. 200  $\mu$ l ekstrakt blandedes med 3 ml DAC-reagens, og den maksimale absorptions blev målt ved 640 nm.

Ved gennemførelsen af undersøgelsen fandtes dog, at  $2 \times 5$  min. ekstraktion var tilstrækkelig

% tanniner i tørstof  
% tannins in DM

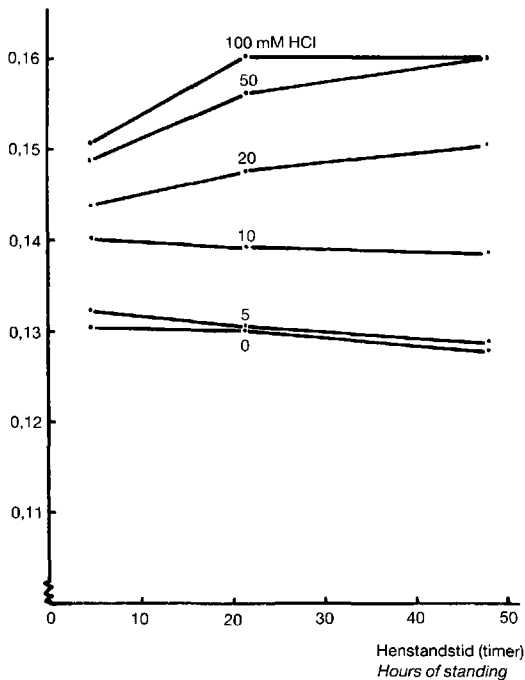


Fig. 1. Ekstraktionsudbytter af tanniner ved forskellige saltsyrekonzentrationer i 70% acetone og ekstraktstabilitet ved henstand.

*Extraction yields of tannins at different concentrations of hydrochloric acid in 70% acetone and extract stability after standing.*

(fig. 2), og at ekstrakten var stabil i mindst 48 timer (fig. 1).

DAC-reagens (*McMurrough & McDowell*, 1978): 200 mg 4-dimethylaminocinnamaldehyd (Sigma) opløstes i en til stuetemperatur afkølet blanding af 140 ml methanol og 50 ml koncentreret HCl. Derefter blev der fyldt op til 200 ml med methanol. Ved opbevaring i mørke ved stuetemperatur kunne DAC-reagenset anvendes i en uge.

Som standard benyttedes catechin (Sigma) opløst i 70% acetone, 10 mM HCl.

Alle målinger blev foretaget på et Bausch & Lomb, Spectronic 2000 spektrofotometer, udstyret med 10 mm gennemløbskuvette.

## Resultater og diskussion

Det mest benyttede aldehyd til bestemmelse af kondenserede tanniner i foderplanter er vanillin, der ved reaktionen med flavanoler danner et rødfarvet kompleks. *Price et al.* (1978) undersøgte forskellige parametre ved denne reaktion og fandt frem til en analysemetode, som var anvendelig til bestemmelse af tanniner i sorghum; men den viste sig at være uegnet til tanninbestemmelse i byg.

I stedet valgtes et andet aldehyd, DAC, som *McMurrough og McDowell* (1978) benyttede til bestemmelse af flavanoler i bygkerner efter separation på en Sephadex G-25 kolonne. De opnåede herved en kvantitativ bestemmelse af de enkelte proanthocyanidiner, men metoden er ret tidskrævende, og den blev derfor omarbejdet til bestemmelse af total-flavanolindholdet i bygkerne.

### Ekstraktion

Som ekstraktionsmiddel ved bestemmelse af tanniner benyttes oftest 70% eller 75% vandige, undertiden svagt sure, opløsninger af methanol eller acetone. Derved hæmmes bindingen mellem tanniner og proteiner, og eventuelle enzymatiske reaktioner inaktiveres. I fig. 1 er vist, hvorledes stigende saltsyreindhold i 70% vandig acetone påvirker ekstraktionen af flavanoler i bygkerne, og hvorledes syrekonzentrationen indvirker på ek-

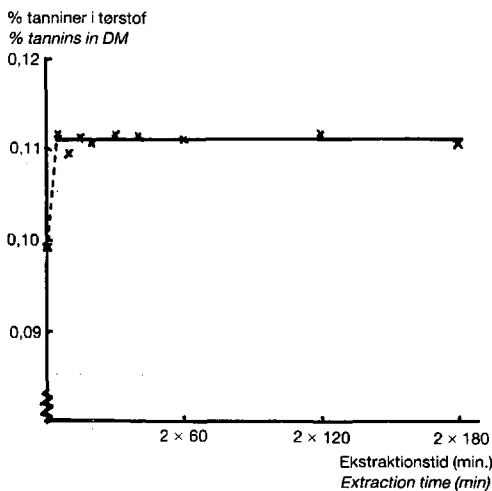


Fig. 2. Ekstraktionsudbytter af tanniner ved forskellige ekstraktionstider.

*Extraction yields of tannins at different extraction times.*

straktens stabilitet. Ved måling af ekstrakterne umiddelbart efter ekstraktionens afslutning ses, at stigende syrekonzentration medfører højere måleresultater. Med saltsyrekonzentrationer på 0, 5 og 10 mM i ekstraktionsvæsken er ekstrakterne imidlertid stabile i mindst 48 timer ved stuetemperatur, mens højere syrekonzentrationer medfører, at måleresultaterne bliver højere ved henstand. Årsagen hertil kan være, at der sker en hydrolyse af de største tanninmolekyler, hvorved DAC af steriske grunde lettere kan reagere med de delvis nedbrudte molekyler (Lea, 1978). Af hensyn til ekstraktens stabilitet er der i det følgende benyttet 70% acetone, 10 mM HCl til ekstraktion af flavanoler i bygkerner.

Til belysning af ekstraktionshastigheden blev der gennemført et forsøg med forskellige ekstraktionstider. Resultaterne herfra er vist i fig. 2, hvoraf det fremgår, at det maksimale ekstraktionsudbytte allerede er opnået efter 2 x 5 minutters ekstraktion.

Flavanolernes ekstraherbarhed blev undersøgt ved 3 gentagne ekstraktioner af den samme prøve. Efter den første ekstraktion fandtes ca. 95%, efter den anden ca. 4% og efter den 3. ekstraktion mindre end 1% af den samlede mængde. Det må derfor anses for tilstrækkeligt at foretage 2 ekstraktioner af hver bygprøve.

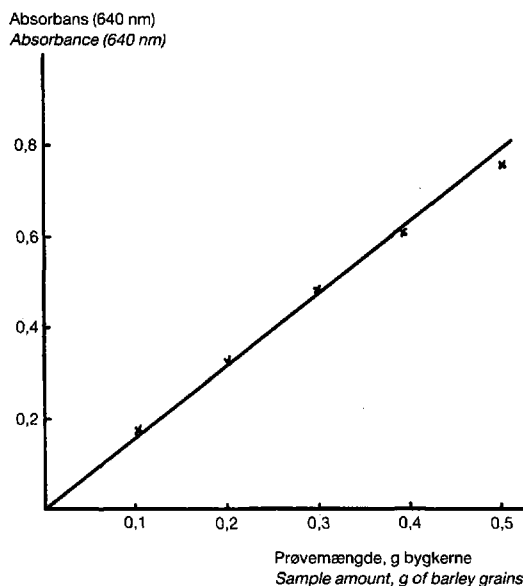


Fig. 3. Sammenhængen mellem afvejet stof og absorptions ved reaktionen mellem bygekstrakt og DAC.

*Relation between the amount of barley grains used for extraction and the absorbance formed by the reaction between the extract and DAC.*

tion mindre end 1% af den samlede mængde. Det må derfor anses for tilstrækkeligt at foretage 2 ekstraktioner af hver bygprøve.

Sammenhængen mellem stigende mængde bygkerne og målt absorptions er vist i fig. 3. Der synes at være proportionalitet op til 0,4 g, mens der ved 0,5 g sker en svag afbøjning. Anvendes omkring 0,3 g til analysen, må der derfor forventes proportionalitet mellem afvejet stof og flavanolindhold i ekstrakten.

Det har ikke været muligt at foretage egentlige genfindingsforsøg, da de kondenserede tanniner ikke kan fremskaffes kommercielt og vanskeligt lader sig oprense fra bygkerne. Ved tilsætning af forskellige mængder af den monomere catechin til ekstraktionsvæsken genfindes catechinet fuldstændigt efter ekstraktion af bygprøven.

#### Reaktion med DAC

Ved reaktionen mellem DAC og flavanoler dannes et grønt reaktionsprodukt med absorptions-

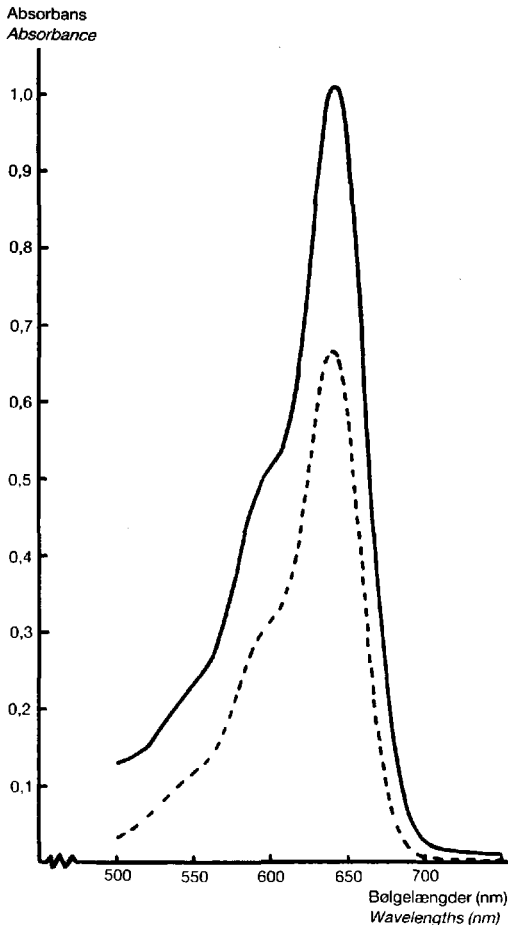


Fig. 4. Absorptionsspektrer af reaktionskomplekset mellem DAC og henholdsvis catechin (---) og bygekstrakt (—).

*Absorption spectra of the reaction complex between DAC and catechin (---) and barley extract (—), respectively.*

maksimum omkring 635–640 nm (Lea, 1978; McMurrough, & McDowell, 1978). I fig. 4 er vist et absorptionsspektrum af reaktionsproduktet mellem DAC og henholdsvis catechin og bygekstrakt. Begge kurver har et absorptionsmaksimum ved 640 nm, og der er i øvrigt ingen påviselige kvalitative forskelle mellem de to spektre i måleområdet. Med det anvendte ekstraktionsmiddel opnås en svagt gullig eller rødlig ekstrakt, der ikke absorberer ved 640 nm og derfor ikke vil øve indflydelse på de målte værdier.

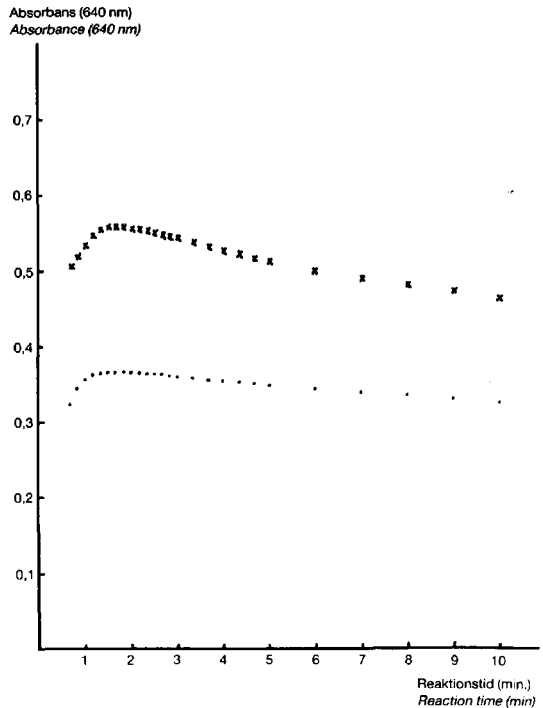


Fig. 5. Tidsforløbet ved reaktionen mellem DAC og henholdsvis catechin (·) og bygekstrakt (x).  
*The time course at the reaction between DAC and catechin (·) and barley extract (x), respectively.*

I fig. 5 er vist tidsforløbet ved reaktionen mellem DAC og henholdsvis catechin og bygekstrakt. Det ses, at absorbansen stiger til en maksimumsværdi ca. 1½ minut efter sammenblandingen af reagenserne, hvorefter den langsomt aftager, og forløbet er ens for catechin og bygekstrakt.

Den hastighed, hvormed absorbansen aftager igen, er stærkt temperaturafhængig. Det er derfor fundet mest hensigtsmæssigt at måle den maksimale absorbans fremfor at foretage målingen en bestemt tid efter sammenblandingen.

Undersøgelserne vist i fig. 5 er foretaget med frisk fremstillet DAC-reagens. Efterhånden som reagenset bliver ældre, tager det lidt længere tid, før den maksimale absorbans er opnået, op til 3 min. med en uge gammelt reagens. Samtidig findes lidt lavere værdier, hvorfor det er nødvendigt at foretage standardmålinger hver dag. DAC-re-

agenset blev opbevaret i mørke og blev kun benyttet i op til en uge efter fremstillingen.

Som standard ved bestemmelsen af tanniner anvendtes den monomere catechin, der hører til flavanolerne og i øvrigt forekommer i bygkerner. Ved reaktionen mellem DAC og stigende mængder catechin eller bygekstrakt fandtes i begge tilfælde en lineær sammenhæng mellem koncentrationen af flavanoler og absorptionskoefficienten af reaktionsprodukterne ved måling af absorptionskoefficienter op til 1,0.

#### *Tanninindholdet i bygkerner*

Ved undersøgelse af 80 bygprøver blev der med denne metode fundet mellem 0,078% og 0,131% tanniner i tørstof. Ud fra forskellen mellem dobbeltbestemmelserne fandtes en standardafvigelse på 0,0012% svarende til en gennemsnitlig variationskoefficient på 1,1%. Andre undersøgelser med aldehydmetoder har givet værdier fra 0,06% til 0,26% tanniner i kerner fra forskellige bygsorter (Coon *et al.*, 1979; Ford & Hewitt, 1979; Griffiths & Welch, 1982). Til sammenligning er der med kromatografiske metoder fundet fra 0,06% til 0,16% ved opsummering af de enkelte proanthocyanidiner i kerner fra forskellige sorter (McMurrough & McDowell, 1978; Jende-Strid & Møller, 1981; Brandon *et al.*, 1982; McMurrough *et al.*, 1983).

Det ser således ud til, at der med aldehydmetoder opnås værdier af samme størrelsesorden som med de kromatografiske bestemmelser, til trods for at aldehydmetoderne ikke er helt så specifikke. Dels reagerer aldehyderne også med de monomere flavanoler, f.eks. catechin, og dels reagerer de af steriske grunde dårligere med de højere polymeriserede tanniner (Lea, 1978). Om de to fejlkilder er ubetydelige, eller om de til dels ophever hinanden, er dog endnu ukendt.

Det er af afgørende betydning for aldehydmetodernes anvendelsesmuligheder, at flavanolerne har en ensartet kvalitativ sammensætning i de målte bygprøver, både fordi aldehyderne som nævnt ikke reagerer helt specifikt med tanninerne, og fordi tanninernes proteinbindende evne forøges kraftigt ved stigende polymerisering (Bate-Smith, 1973).

Nyere undersøgelser tyder på, at bygkernens flavanoler hovedsagelig findes som dimere og trimere proanthocyanidiner (Jende-Strid & Møller, 1981; Mulkay *et al.*, 1981; Williams *et al.*, 1983; McMurrough *et al.*, 1983), og der er indtil nu ikke fundet tegn på sortsforskelle med hensyn til den kvalitative sammensætning af proanthocyanidinerne (tanninerne) ved dyrkning under ens klimatiske forhold (Jende-Strid & Møller, 1981; McMurrough *et al.*, 1983). Hvorvidt der kan forekomme ændringer i sammensætningen fra år til år, er der ikke helt enighed om (Brandon *et al.*, 1982; McMurrough *et al.*, 1983), mens der tilsyneladende ikke sker ændringer under modningen af bygkerne (Brandon *et al.*, 1982).

Det ser således ud til, at aldehydmetoderne, og dermed også DAC-metoden, med rimelighed kan benyttes til kvantitativ bestemmelse af tanninindholdet i bygkerner.

#### **Konklusion**

Med den anvendte ekstraktionsmetode kan tanninerne ekstraheres i løbet af  $2 \times 5$  min., og ekstrakten er stabil i mindst 48 timer.

Reaktionen med DAC er hurtig og reproducerbar, og ekstrakterne har ikke egenabsorption i måleområdet. Reaktionshastigheden er ens for catechin og bygekstraktens tanniner. Ved måling af den maksimale farveintensitet findes en lineær standardkurve.

Metoden giver resultater af samme størrelsesorden som de sandsynligvis mere rigtige, men tidskrævende kromatografiske bestemmelser.

#### **Litteratur**

- Association of Official Analytical Chemists* (1975): Official methods of analysis, 12. udg. Washington D.C.
- Bate-Smith, E. C. (1973): Haemalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12, 907-12.
- Brandon, M. J., Foo, L. Y., Porter, L. J. & Meredith, P. (1982): Proanthocyanidins of barley and sorghum; composition as a function of maturity of barley ears. *Phytochemistry* 21, 2953-57.
- Coon, C. N., Shepler, R., McFarland, D. & Nordheim, J. (1979): The nutritional evaluation of barley selections and cultivars from Washington State. *Poultry Sci.* 58, 913-18.

- Eggum, B. O. & Christensen, K. D.* (1975): Influence of tannin on protein utilization in feedstuffs with special reference to barley. In: Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. IAEA, Vienna, 135-43.
- Ford, J. E. & Hewitt, D.* (1979): Protein quality in cereals and pulses. *Br. J. Nutr.* 41, 341-52.
- Gohl, B. & Thomke, S.* (1976): Digestibility coefficients and metabolizable energy of barley diets for layers as influenced by geographical area of production. *Poultry Sci.* 55, 2369-74.
- Griffiths, D. W. & Welch, R. W.* (1982): Genotypic and environmental variation in the total phenol and flavanol contents of barley grain. *J. Sci. Food Agric.* 33, 521-27.
- Gupta, R. K. & Haslam, E.* (1980): Vegetable tannins - structure and biosynthesis. In: Polyphenols in cereals and legumes. (Ed. *J. H. Hulse*). International Development Research Center; Ottawa, Canada, 15-24.
- Hagerman, A. E. & Butler, L. G.* (1980): Determination of protein in tannin-protein precipitates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 944-47.
- Haslam, E.* (1981): Vegetable tannins. In: The biochemistry of plants. (Ed. *P. K. Stumpf & E. E. Conn*). Vol. 7, 527-56.
- Jende-Strid, B. & Møller, B. L.* (1981): Analysis of proanthocyanidins in wild-type and mutant barley (*Hordeum vulgare* L.). *Carlsberg Res. Commun.* 46, 53-64.
- Lea, A. G. H.* (1978): The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. *J. Sci. Food Agric.* 29, 471-77.
- Marquardt, R. R., Ward, A. T., Campbell, L. D. & Cansfield, P. E.* (1977): Purification, identification and characterization of a growth inhibitor in faba beans (*Vicia faba* L. var. *minor*). *J. Nutr.* 107, 1313-24.
- Maxson, E. D. & Rooney, L. W.* (1972): Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.* 49, 719-29.
- McMurrrough, I., Loughrey, M. J. & Hennigan, G. P.* (1983): Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.* 34, 62-72.
- McMurrrough, I. & McDowell, J.* (1978): Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal. Biochem.* 91, 92-100.
- Mulkay, P., Touillaux, R. & Jerumanis, J.* (1981): Proanthocyanidins of barley: separation and identification. *J. Chromatogr.* 208, 419-23.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S. & Butler, L. G.* (1978): A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1214-18.
- Ribéreau-Gayon, P.* (1972): Plant Phenolics. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Ślomiński, B. A.* (1980): Phenolic acids in the meal of developing and stored barley seeds. *J. Sci. Food Agric.* 31, 1007-10.
- Sumere, C. F. van, Albrecht, J., Dedonder, A., Pooter, H. de & Pé, I.* (1975): Plant proteins and phenolics. In: The chemistry and biochemistry of plant proteins. (Ed. *J. B. Harborne & C. F. van Sumere*). Academic press, 211-64.
- Swain, T.* (1979): Phenolics in the environment. In: Recent advances in phytochemistry 12, 617-40.
- Williams, V. M., Porter, L. J. & Hemingway, R. W.* (1983): Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry* 22, 569-72.

Manuskript modtaget den 19. april 1984.