



Ontwikkeling van een HPLC-MS methode voor de bepaling van antioxidanten in natuurproducten

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van
de graad van Master in de Chemie door

Seppe De Smet

Academiejaar 2009-2010

Promotor: Prof. Dr. P. Sandra
Copromotor: Dr. F. Lynen
Begeleider: B. Miserez

Dankwoord

Ik zou van dit moment gebruik willen maken om de personen te bedanken die mij dit jaar en de voorbije jaren gesteund hebben.

Ik zou graag mijn speciale dank betuigen aan mijn promotor Prof. Dr. P. Sandra omdat hij me de kans gaf deze thesis uit te voeren onder zijn begeleiding. Daarnaast wil ik ook Dr. F. Lynen zeker bedanken voor zijn begeleiding bij het experimenteel werk, het verbeteren van mijn verslag en het verlenen van zijn expertise op het gebied van wijn. In die context wil ik ook Dr. A. de Villiers, senior lector aan de Stellenbosch University, Zuid-Afrika, bedanken voor zijn feedback en advies over de experimenten. Uiteraard wil ik mijn dank ook betuigen aan mijn begeleider Bram Miserez, voor de continue bijstand, zijn engelengeduld en het aanbrengen van een luchtigere noot tijdens het thesiswerk.

Ook het Research Institute for Chromatography (RIC, Kortrijk) en in het bijzonder Dr. Alberto dos Santos Pereira verdient een plaats in dit dankwoord voor het kosteloos beschikbaar stellen van instrumentatie en bijstand gedurende enkele dagen.

Mijn medestudenten, Peejay en Barbara, wil ik graag een literaire knuffel geven omdat zij zorgden voor een zeer aangename sfeer gedurende het thesisjaar. In deze context wil ik ook Júlia en alle andere personen van het PARC bedanken voor de sfeer, raad, steun en collegialiteit. Yannick, Bart, Job, Xander, Dries, Stijn, Jonas... en alle vrienden en familieleden die ik vergeten ben op te sommen, wil ik bedanken voor de mooie tijden in Gent, de nodige ontspanning, de steun, de levendige discussies en laat-avondgesprekken.

Als allerlaatste zou ik mijn ouders speciaal willen bedanken voor alle liefde en steun die ze mij de afgelopen tweeëntwintig jaar gaven. Zij waren en zijn mijn steunpilaren waar ik nog steeds terecht kan voor raad, ontspanning en een goed gesprek.

Sarah, voor jou zijn er geen woorden nodig...

Inhoudstabel

I.	Inleiding en doelstelling	1
II.	Vloeistofchromatografie	3
1.	Ontstaan en geschiedenis van de hoge performantie vloeistofchromatografie (HPLC)	3
2.	Theoretische achtergrond van de chromatografie	6
2.1	De verdelingscoëfficiënt	6
2.2	Het chromatogram	6
2.3	Selectiviteit, efficiëntie en resolutie	7
2.4	De van Deemter curve	10
3.	Scheidingsmodes in HPLC	12
4.	Monstervoorbereiding	13
5.	Instrumentele aspecten	15
5.1	De UV(-VIS)-detector	17
5.2	De charged aerosol detector	18
5.3	Massaspectrometrie	20
5.3.1	De ionisatiebron	20
5.3.2	De massa-analysatoren en detectoren	22
5.3.3	Tandem massaspectrometrie	25
III.	Antioxidantonderzoek in wijn	26
1.	Inleiding	26
2.	Gezondheidsaspecten van wijn	28
2.1	ROS en antioxidanten	29
2.2	Polyfenolen, de antioxidanten in wijn	31
3.	De ABTS-test: een detectiemethode voor antioxidanten	34
3.1	De DPPH-methode	34

3.2	De ABTS-methode	35
4.	De detectie van antioxidanten	37
4.1	De of-lijn methode.....	37
4.2	De in-lijn methode	38
IV.	Ontwikkeling van de antioxidant-test en screening van wijnen	40
1	Algemene instrumentele aspecten en chemicaliën.....	40
2	Bepalen van de optimale loopsnelheid voor polyfenolanalyses	41
2.1	Experimentele condities.....	41
2.2	Resultaten en bespreking	42
3	Optimalisatie van de ABTS-test	44
3.1	Chemicaliën.....	44
3.2	Experimentele condities.....	44
3.3	Optimalisatie van de ABTS-test condities	45
3.3.1	Studie van de invloed van het debiet.....	45
3.3.2	Studie van de invloed van de ABTS-concentratie op het signaal.....	47
3.3.3	Studie van de reactordimensies.....	49
3.3.4	Controle van de optimalisatie	51
3.4	De detectielimiet.....	52
3.5	Resultaten van de optimalisatie	54
4	Bepaling van de antioxidant-activiteit van een aantal componenten	55
4.1	Experimentele condities.....	55
4.2	Bepaling van de concentratie met de charged aerosol detector.....	57
4.2.1	Detectie met de CAD zonder debietcompensatie	57
4.2.2	Detectie met de CAD met toepassing van debietcompensatie	58
5	Detectie van polyfenolen in wijn	60
5.1	Experimentele condities.....	60
5.2	Monstervoorbereiding.....	60
5.2.1	Verdunning van wijn	61

5.2.2	Vloeistof-vloeistofextractie	62
5.2.3	Vaste-fase-extractie van wijn.....	64
5.3	Hoog-efficiëntie analyse van antioxidanten in wijn	66
5.3.1	De thermostabiliteit van polyfenolen	66
5.3.2	De hoog-efficiëntie analyse van polyfenolen in wijn.....	68
6	Identificatie van de polyfenolen	70
V.	Conclusie	74
VI.	Lijst met afkortingen	76
VII.	Bibliografie	77

I. Inleiding en doelstelling

Hartfalen is een van de meest voorkomende doodsoorzaken bij zwaarlijvige en oudere mensen. Dikwijls kan de ontwikkeling van hartziektes vermeden worden door een aangepast dieet en/of het beoefenen van sport. Hoewel de meeste hartziektes behandeld kunnen worden indien men ze op tijd vaststelt, is preventie toch beter dan genezing. De voorhanden medicijnen tasten immers de lever en de nieren aan, en operaties zijn invasief voor het lichaam.

In het lichaam ontstaan er vrije radicalen ($O_2^{\bullet-}$ en $OH^{\bullet}$) tijdens de aerobe ademhaling. Deze vrije radicalen spelen een rol als signaalmoleculen bij verschillende biologische processen en worden gebruikt in het afweersysteem van het menselijk lichaam. Deze vrije radicalen, ook wel reactieve oxiderende species (ROS) genoemd, zijn zeer reactief wegens hun energetisch ongunstige configuratietoestand. De vrije radicalen reageren zeer snel met andere moleculen, waarbij er een nieuw radicaal gevormd wordt. Een te hoge concentratie aan radicalen is schadelijk en veroorzaakt oxidatieve stress in de bloedbaan. Verschillende hart-en vaatziektes kunnen veroorzaakt worden door een te hoge concentratie aan radicalen. Radicalen spelen ook een rol in het verouderingsproces, bij de ontwikkeling van tumoren en bij Alzheimer (Gardner, Raineri et al. 1995).

Het menselijk lichaam houdt de concentratie aan vrije radicalen onder controle doordat verschillende vitamines (vitamine E, C, B1) en enzymen een antioxidantieve werking hebben. Deze antioxidanten reageren met het vrij radicaal waarbij ze het vrij elektron zelf overnemen. De antioxidanten beschikken over een zodanige structuur dat het vrij elektron gedelokaliseerd kan worden en zodanig het nieuw gevormde radicalair antioxidant veel minder reactief is dan de ROS (Gutteridge en Halliwell 2010).

Aangezien ROS niet alleen ontstaan tijdens de aerobe, maar ook ontstaan als gevolg van X-stralen, vervuiling, alcoholconsumptie, zonlicht,... zijn de aanwezige antioxidantssystemen in het menselijk lichaam soms niet voldoende om de concentratie aan ROS onder controle te houden. Aangezien antioxidanten, en dan vooral de polyfenolen in hoge concentraties voorkomen in verschillende planten en vruchten, kan consumptie van deze de concentratie antioxidant in de bloedbaan verhogen en zo een positief effect hebben op de concentratie aan ROS.

In dit werk werd er een methode ontwikkeld om antioxidanten in natuurproducten te detecteren, te indentificeren en hun antioxidant-activiteit te bepalen. Het detecteren van antioxidanten gebeurde door een scheiding van een natuurlijk extract met HPLC, gevolgd door een post-kolom reactie die kan worden gevolgd met een UV-detector. De in-lijn test werd gekoppeld met hoog-efficiëntie HPLC. De complexiteit van een natuurlijk extract is immers zeer groot, zodat een techniek met een hoge piekcapaciteit aangewend moet worden. Deze methode werd toegepast op rode wijn, waarvoor ook een gepaste extractiemethode werd gezocht. Om de gedetecteerde componenten te identificeren werd het extract geanalyseerd met HPLC-TOF-MS.

Daarnaast werd er ook een methode ontwikkeld voor het kwantificeren van de antioxidant-activiteit. Hiervoor werd een universele detector, de charged aerosol detector, gebruikt.

II. Vloeistofchromatografie

1. Ontstaan en geschiedenis van de hoge performantie vloeistofchromatografie (HPLC)

Chromatografie is een verzamelnaam voor scheidingsmethoden waarbij componenten worden geïsoleerd uit een complexe oplossing van stoffen. De methode werd voor het eerst gebruikt in 1901 door de Rus Mikhail Semyonovich Tswett die plantpigmenten scheidde met behulp van glazen kolommen gevuld met calciumcarbonaat waarover petroleumether werd gespoeld (Tswett 1906). De pigmenten werden op de kolom gebracht en vervolgens werd petroleumether bovenaan de kolom toegevoegd. De verschillende pigmenten vertonen elk een verschillend verdelingsevenwicht tussen de mobiele fase en de stationaire fase waardoor de verschillende pigmenten een verschillende reistijd hadden door de kolom. Tswett kende de pigmenten toe aan de verschillende kleurbanden die zichtbaar waren in het calciumcarbonaat. Aangezien men kleuren scheidde, werd deze nieuwe techniek “chromatografie” genoemd wat schrijven met kleuren betekent (Engelhardt 2004).

Na deze toepassing was het even stil tot in de jaren '30 het werk van Tswett voortgezet werd en er geëxperimenteerd werd met verschillende stationaire fases. Een meer fundamentele basis van de huidige chromatografie werd echter door twee biochemisten, Martin en Synge, gelegd tijdens hun onderzoek naar het isoleren van aminozuren (Ettre 2002).

Zij gebruikten twee niet mengbare vloeistoffen als mobiele fase en stationaire fase. De stationaire fase mag uiteraard niet mengbaar of oplosbaar zijn met de mobiele fase en werd daarbij ondersteund door speciaal materiaal zoals silicagel of diatomee aarde, waarop de stationaire vloeistof een film vormt (Martin 1952). Deze aanpak werd vloeistof-vloeistof chromatografie (LLC) genoemd. Het grote voordeel van deze aanpak is dat het een continue, voorspelbare en herhaalbare verdeling van de analietmoleculen tussen de twee fases toelaat. Door verschillen in de evenwichtsconstanten van de componenten elueren ze op verschillende tijdstippen.

In tegenstelling tot de adsorptiechromatografie van Tswett is in LLC de retentietijd ook niet afhankelijk van de staalgrootte. Martin en Synge konden aan de hand van de veel betrouwbaardere LLC de theorie van de moderne chromatografie op een mathematische wijze beschrijven. Bovendien maakte men ook gebruik van een doorstroomkolom waardoor de kolommen voor het eerst herbruikt konden worden (Synge 1952).

Een nadeel van deze methode is echter dat de stationaire vloeistof toch langzaam oploste in de mobiele fase waardoor LLC niet robuust was. Hierdoor werd LLC nooit een populaire scheidingstechniek.

Tot in de jaren '60 lieten de verschillende vormen van vloeistofchromatografie (adsorptie en LLC) slechts een beperkt aantal applicaties toe en waren ze ook weinig reproduceerbaar. De doorbraak kwam er met de ontwikkeling van pompen die toelieten om de mobiele fases met zeer constante debieten en bij hoge drukken door stalen kolommen, gepakt met kleine silicadeeltjes, te laten stromen. Op deze manier werd het mogelijk om alsnog aanvaardbare reproduceerbare scheidingen te bekomen met adsorptiechromatografie. De techniek brak verder helemaal door met de introductie van silica als dragermateriaal. Op de silica werden zijketens, die de stationaire fase vormen, geïmmobiliseerd. Deze stationaire fase gedraagt zich dus als een vloeistof (met alle voordelen van LLC ten gevolg) en de kolom zelf heeft een lange levensduur. Deze techniek werd Hoge Performantie VloeistofChromatografie (HPLC) genoemd.

Sinds de introductie van HPLC is er een continue evolutie geweest naar het verhogen van de homogeniteit van de partikels, het verkleinen van de diameter en de ontwikkeling van steeds krachtigere pompen zodat de mobiele fase bij de optimale snelheid (zie theoretisch gedeelte) door de kolom kan bewogen worden. De scheiding van analietmoleculen verloopt beter indien de partikels een homogeen en uniforme deeltjesgrootte hebben en sferisch zijn.

HPLC is vandaag de meest gebruikte scheidingstechniek die het toelaat om zeer verschillende moleculen te analyseren. Dit varieert van laagmoleculaire componenten tot volledige proteïnen en van zeer polaire (ionaire) deeltjes tot zeer apolaire. Standaard gebruikt men pompen die tot 400 bar druk kunnen leveren. Maar aangezien er een groter scheidend vermogen kan worden bekomen met kleinere partikels, is er nood aan apparatuur die hogere drukken toelaat. Er is een kwadratisch, omgekeerd evenredig verband tussen de partikelgrootte en de druk die vereist is om de mobiele fase bij de optimale snelheid door de kolom te bewegen. De meest moderne toestellen kunnen drukken aan tot 1200 bar, wat het gebruik van deeltjes kleiner dan 2 μm toelaat (Swartz 2005).

Een andere recente ontwikkeling bij HPLC is het gebruik van een hogere temperatuur. Hierdoor daalt de viscositeit van de mobiele fase waardoor men gebruik kan maken van kleinere partikels, hogere debieten en/of langere kolommen. De temperatuur kan echter niet oneindig verhoogd worden, want de gebruikte stationaire fases zijn niet voldoende stabiel bij hogere temperaturen. Conventionele kolommen kunnen gebruikt worden tot maximum 80°C. Speciaal ontwikkelde HTLC kolommen kunnen echter gebruikt worden tot 200°C (McNeff, Yan et al. 2007). Deze vertonen echter dikwijls reproduceerbaarheidsproblemen.

Eerst wordt er overgegaan op de theoretische aspecten van de chromatografie vooraleer de praktische aspecten van HPLC aan bod komen.

2. Theoretische achtergrond van de chromatografie

2.1 De verdelingscoëfficiënt

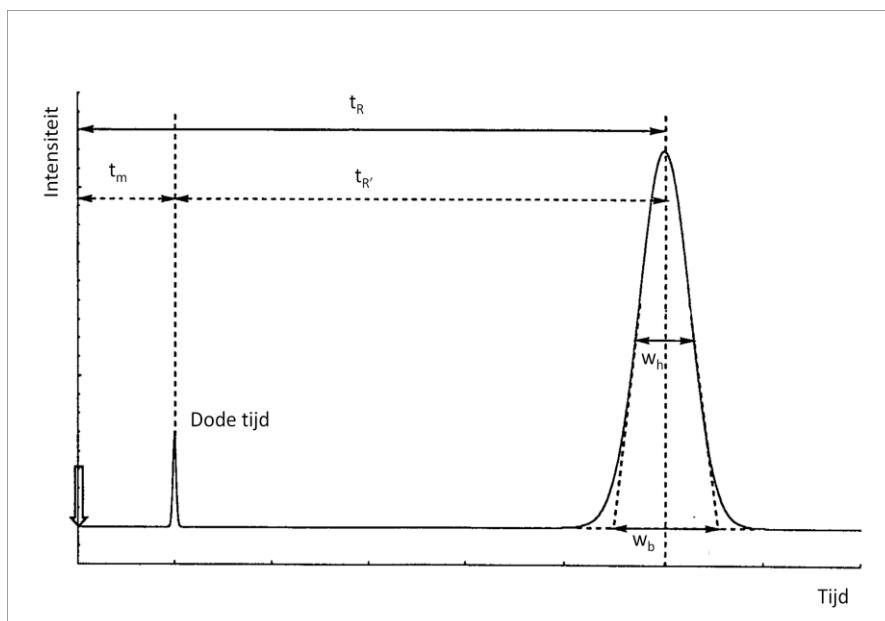
Bij chromatografische scheidingen vindt er een selectieve vertraging plaats van componenten door hun verdeling over de stationaire fase en de mobiele fase. Deze verdeling wordt bepaald door de evenwichtsconstante (distributiefactor K_d).

$$K_D = k\beta = \frac{m_S}{m_M} \times \frac{V_M}{V_S} \quad \text{Vgl. 1}$$

waarbij K_D de distributiefactor is, k de retentiefactor en β de faseverhouding voorstelt. V_S , m_S en V_M , m_M stellen respectievelijk het volume en het aantal moleculen van de component in de stationaire fase en de mobiele fase voor. K_d is uiteraard specifiek voor een component in een bepaalde stationaire en mobiele fase bij een vaste temperatuur. Verschillen in K_d leiden dus tot verschillende elutietijden uit de kolom.

2.2 Het chromatogram

Een chromatogram is een grafische voorstelling van de intensiteit van de gemeten signalen in functie van de tijd. Een voorbeeld van een gemeten signaal wordt weergegeven in Figuur II.1



Figuur II.1: Schematische voorstelling van het chromatogram.

In het chromatogram zijn twee pieken zichtbaar: een niet-weerhouden kleine piek en een piek die retentie vertoont.

De **dode tijd** t_M is de tijd die de mobiele fase nodig heeft om doorheen de kolom te lopen en de detector te bereiken. Dit wil zeggen dat elke component, die geen retentie vertoont, een tijd t_M na de injectie elueert en gedecteerd wordt. De dode tijd is enkel afhankelijk van de snelheid van de mobiele fase en de kolom (lengte, diameter, pakingsdichtheid, porositeit van het materiaal). Een component met retentie vertoont een piek na **retentietijd** t_R . De effectieve retentietijd t'_R verkrijgen we door van t_R de dode tijd af te trekken

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Vgl. 2}$$

2.3 Selectiviteit, efficiëntie en resolutie

De **retentiefactor** k wordt beschreven door de verhouding van de effectieve retentietijd over de dode tijd.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Vgl. 3}$$

De **selectiviteitsfactor** α geeft een maat voor de kwaliteit van de scheiding tussen twee pieken en komt overeen met de verhouding van de twee retentiefactoren.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Vgl. 4}$$

Om α te optimaliseren en zodanig de scheiding tussen twee componenten te verbeteren, kan men de gebruikte methode veranderen (samenstelling van mobiele fase, temperatuur, pH van de mobiele fase) of een andere stationaire fase gebruiken.

Een eluerende component zal niet exact op één tijdstip elueren maar gedurende een korte tijdspanne. De overeenkomstige piek in het chromatogram vertoont dan ook een Gaussiaanse vorm zodanig dat een piek altijd een bepaalde basislijnbreedte heeft. De capaciteit van een kolom om nauwe pieken te produceren wordt kolomefficiëntie genoemd en wordt weergegeven door het **schotelgetal** N . N kan gemakkelijk uit een chromatogram gemeten worden aan de hand van vergelijking 5.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad \text{Vgl. 5}$$

Hierbij staat w_b voor de breedte van de piek aan de basis en w_h voor de breedte van de piek op halve hoogte (zie ook fig II.1).

Dit laat nu toe om de theoretische plaathoogte H (Height Equivalent of a Theoretical plate, HETP) te berekenen. Dit is een voorstelling van de kortste lengte die nodig is om een volledige evenwichtsinstelling tussen de twee fases te verkrijgen.

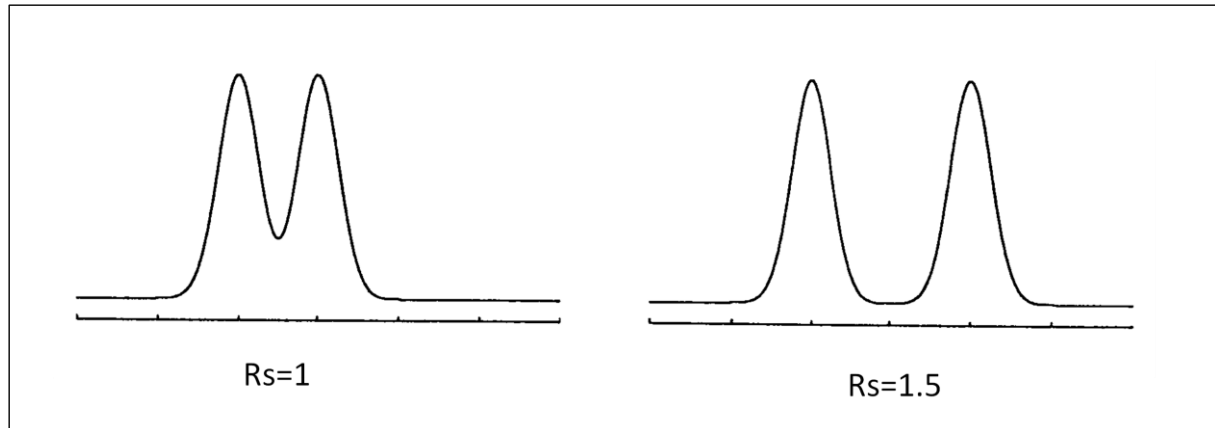
$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Vgl. 6}$$

Bij een goed gepakte kolom kan aangetoond worden dat H recht evenredig is met de partikeldiameter d_p ($H \approx 2 d_p$). Bijgevolg kan het aantal platen die een kolom zal leveren, voorspeld worden met vergelijking 7.

$$N = \frac{L}{2d_p} \quad \text{Vgl. 7}$$

Hogerop werd α voorgesteld als de bepalende parameter voor de kwaliteit van scheiding tussen twee pieken. Dit is echter niet geheel correct. De beste beschrijving voor de maat van scheiding wordt bekomen door de resolutie, daar er hierbij rekening wordt gehouden met zowel de piekbreedte, de kolomperformantie en de retentietijd.

De resolutie beschrijft de mate van scheiding van twee opeenvolgende signalen ten opzichte van elkaar. Bij een resolutie van 0 zullen de twee pieken elkaar volledig overlappen terwijl bij een resolutie van 1 de pieken elkaar nog gedeeltelijk overlappen. Bij een resolutie van 1.5 zijn de pieken volledig gescheiden, met een dal tot op de basislijn ertussen (Figuur II.2).



Figuur II.2: Verhogen van de resolutie van 1 naar 1.5 levert een basislijn gescheiden piek.

Het scheidend vermogen kan berekend worden aan de hand van het verschil in retentietijd tussen de 2 signalen en de basislijnbreedte.

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_{b1} + w_{b2})} \quad \text{Vgl. 8}$$

De resolutie wordt dus bepaald door de drie belangrijkste parameters van de chromatografische scheiding (N , α , k) zoals blijkt uit vergelijking 9.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right) \quad \text{Vgl. 9}$$

Deze vergelijking wordt beschouwd als de belangrijkste formule in de chromatografie. Wanneer twee of meerdere componenten niet gescheiden kunnen worden, kan aan de hand van de formule berekend worden in welk opzicht de methode moet veranderen om een betere scheiding te bekomen.

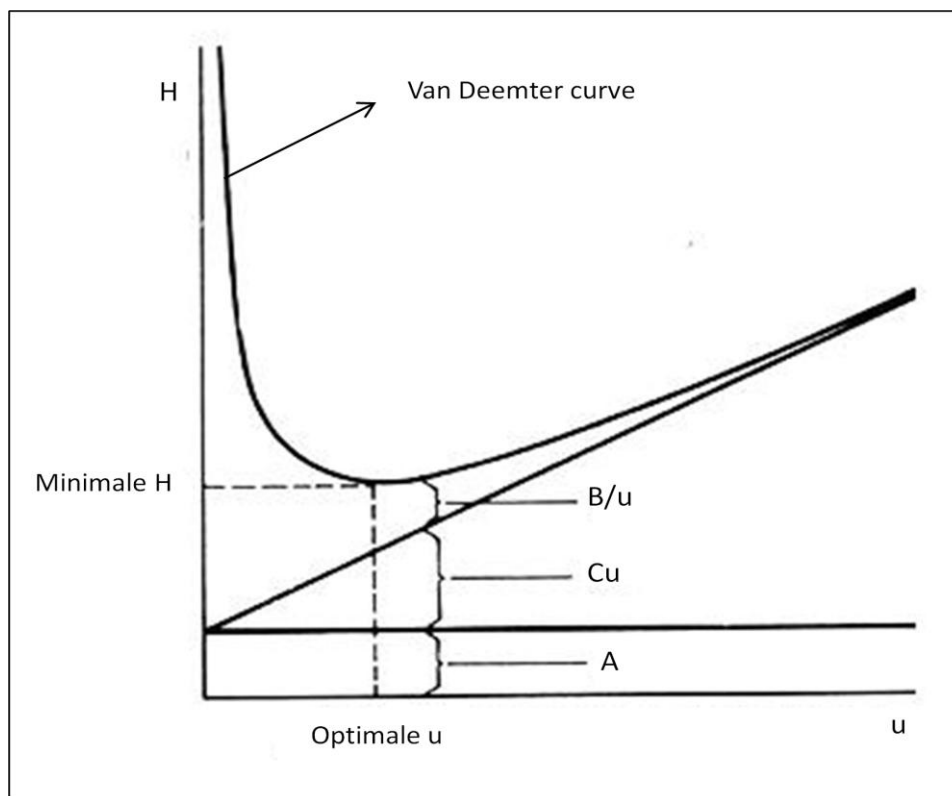
2.4 De van Deemter curve

De resolutie zal het hoogst zijn als de signalen het meest efficiënt (scherp) zijn. Piekverbreding moet dus zoveel mogelijk vermeden worden. Deze verbreding wordt zowel door de kolom als door dode volumes buiten de kolom veroorzaakt. Sluitingen (fittings) en de verbindingen (tubing) tussen injectiesysteem, kolom en detector veroorzaken soms dode volumes. Daarom wordt de interne diameter van deze verbindingstukken zo klein mogelijk gehouden. Het monstervolume en detectorvolume dragen ook bij tot piekverbreding.

De kolom zelf draagt bij tot piekverbreding en moet onder optimale omstandigheden gebruikt worden om deze verbreding te minimaliseren. De van Deemter vergelijking, getoond in vergelijking 10, beschrijft bij welk debiet de verbreding het kleinst is (John H. Knox 1983).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{Vgl. 10}$$

A staat daarbij voor de Eddy-diffusie, B voor de longitudinale diffusie, C voor de massatransfer en u voor de loopsnelheid van de mobiele fase. Het belang van deze drie parameters wordt weergegeven in Figuur II.3.



Figuur II.3: De van Deemter curve en bijdragen van de verschillende componenten.

De Eddy-diffusie komt alleen voor bij gepakte kolommen en is onafhankelijk van het debiet van de mobiele fase. De verschillende moleculen van eenzelfde component zullen in de gepakte kolom niet dezelfde weglengte afleggen en dus niet eenzelfde tijd in de kolom doorbrengen. De snelheid waarmee ze bewegen door de kolom zal nagenoeg gelijk zijn maar de afstand niet. Deze vertraging van bepaalde moleculen van dezelfde component zorgt voor een verbreding van de piek. De Eddy-diffusie kan berekend worden door vergelijking 11.

$$A = 2\lambda d_p \quad \text{Vgl. 11}$$

waarbij λ de stapelingsfactor is en d_p de partikeldiameter voorstelt (Gritti en Guiochon 2006).

De **longitudinale diffusie B** houdt rekening met het feit dat er diffusie optreedt vanuit zones met hoge concentratie aan componenten naar zones met lage concentratie. Het monster wordt geïnjecteerd als een nauwe geconcentreerde band op de kolom en zal spontaan diffunderen. Men kan de waarde van B berekenen aan de hand van de diffusiecoëfficiënt D_m van de mobiele fase en de obstructiefactor γ . Dit wordt weergegeven door vergelijking 12 (vandeemter, Zuiderweg et al. 1956). Enkel de diffusie volgens de as van de kolom (longitudinale diffusie) is hierbij van belang.

$$B = 2\gamma D_m \quad \text{Vgl. 12}$$

In de van Deemter vergelijking wordt er rekening mee gehouden dat de longitudinale diffusie een omgekeerde evenredige verhouding vertoont met de snelheid van de mobiele fase. Hoe groter de snelheid van de mobiele fase, hoe minder diffusie er kan optreden.

De massatransfer C is de som van de massatransfer uit de mobiele fase C_M en de massatransfer uit de stationaire fase C_S . De scheiding van componenten in de chromatografie vindt plaats door een evenwichtsverdeling van de componenten tussen de stationaire fase en de mobiele fase. Deze verdeling neemt een zekere tijd in beslag maar componenten in de mobiele fase worden ondertussen meegevoerd door de stroom, terwijl componenten in de stationaire fase zich niet zullen verplaatsen. Aangezien de massatransfer bij de mobiele fase en de stationaire fase bestaat uit verschillende processen worden ze allebei in rekening gebracht. De piekverbreding door massatransfer C vergroot bij snellere loopsnelheden door de kolom (vandeemter, Zuiderweg et al. 1956).

3. Scheidingsmodes in HPLC

De stationaire fase in een kolom bepaalt meestal de retentiemethode. In de vloeistofchromatografie wordt gebruik gemaakt van **normaal-fase chromatografie (NPC)**, **omkeer-fase chromatografie (RPC)**, **ionenuitwisselingschromatografie (IEC)**, **ionenpaar chromatografie (IPC)**, **chirale chromatografie**, **size exclusion chromatografie (SEC)** en **hydrofiele interactie chromatografie (HILIC)**.

Bij NPC worden de componenten van een mengsel gescheiden op basis van hun polariteit. De stationaire fase is in deze mode polair, terwijl de mobiele fase apolair is. De component die als eerste elueert zal dusdanig het meest apolair zijn. Typische mobiele fases zijn hexaan en methylene chloride. De stationaire fase kan bestaan uit silicagel of uit gebonden polaire fases die nu vooral gebruikt worden. De gebonden fases (amino, cyano en diol) vertonen sommige problemen niet (reproduceerbaarheid, kolomequilibratietijd) die zuivere silicakolommen wel hebben. Isomeren worden beter gescheiden met NPC dan met RPC.

RPC bestaat uit een combinatie van een apolaire stationaire fase en een polaire mobiele fase. De mobiele fase bestaat meestal uit een mengsel van water en een organisch solvent (ACN of MeOH). De stationaire fase bestaat uit silicapartikels waar functionele groepen op gebonden zijn (C18, C-8 C-4, C-3, CN en fenyl). De scheiding van componenten gebeurt in deze mode op basis van hydrofobiciteit.

Bij HILIC wordt acetonitril als sterkst eluerende mobiele fase gebruikt. De organische mobiele fase bezit een 5-40% procent water. Dit water zal zich als een laag afzetten op de stationaire fase en zo mee stationair worden. Polaire componenten zullen zich verdelen tussen de waterlaag en de organisch mobiele fase. Hierdoor kunnen polaire componenten met slechte retentie op RPC kolommen wel gescheiden worden met HILIC.

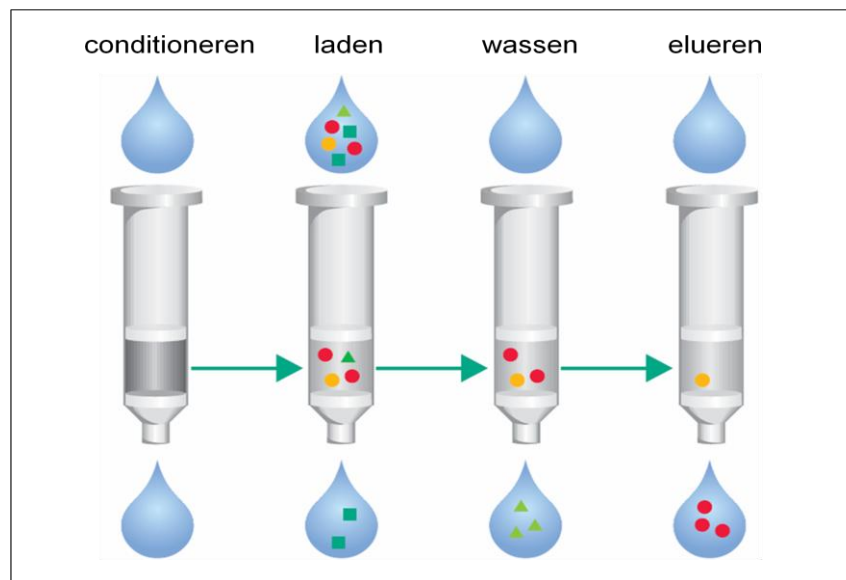
IPC is een speciale vorm van RPC waar er gebruik wordt gemaakt van ionen die worden toegevoegd bij de mobiele fase om een ionenpaar te vormen met mogelijke geïoniseerde zuren en basen in het monster.

4. Monstervoorbereiding

In de chromatografie is monstervoorbereiding een belangrijke stap van de analyse. Het monster moet immers soms opgeconcentreerd, opgezuiverd, geëxtraheerd of gederivatiseerd worden. Vaste-fase-extractie (Solid Phase Extraction, SPE) werd in 1970 geïntroduceerd als alternatief voor vloeistof-vloeistof extractie. SPE wordt voornamelijk gebruikt om op een reproduceerbare manier de monsteranalieten op te zuiveren en op te concentreren. SPE sluit eigenlijk nauw aan bij de retentiemethodes toegepast bij HPLC kolommen. De analieten van interesse worden geretenteerd op een vaste fase. Ondertussen worden interfererende componenten van de vaste fase gespoeld. Uiteindelijk worden de analieten van de vaste fase gespoeld door een sterk solvent, ingedampt en heropgelost. De vaste fases zijn verkrijgbaar in speciale kunststofbuisjes, cartridges genaamd. De vloeibare fases worden over de cartridges gestuurd onder invloed van perslucht, zwaartekracht of met behulp van vacuüm (Poole, Gunatilleka et al. 2000).

De SPE procedure bestaat meestal uit de volgende stappen (Figuur II.4):

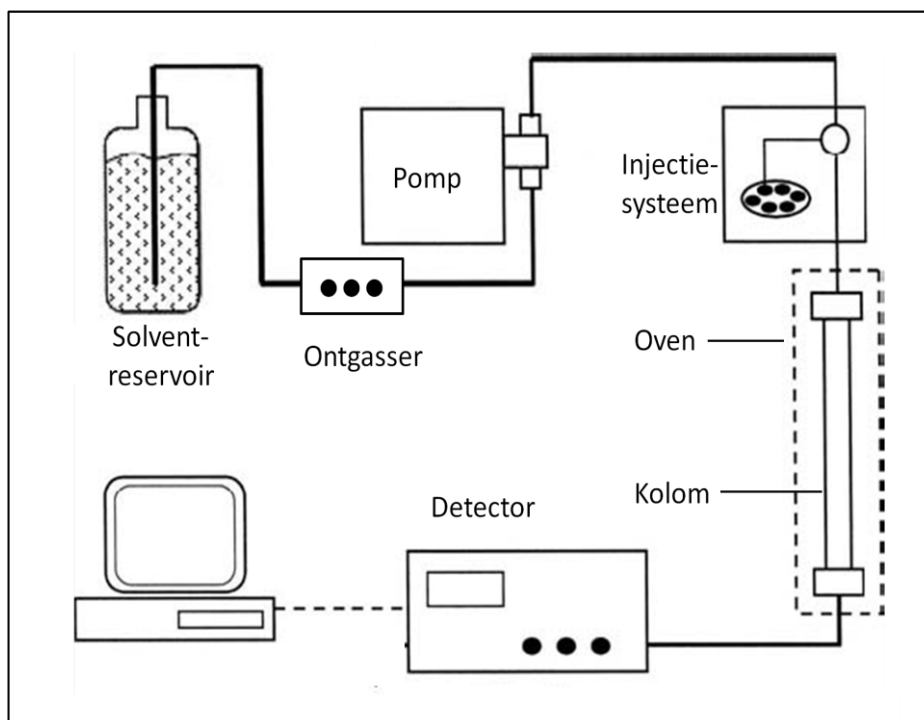
1. Het sorbens wordt geconditioneerd met een gepast solvent om de reproduceerbaarheid van de analietretentie te waarborgen. Ook wordt zo de elutie van sorbensonzuiverheden bij de elutiestage van de analieten verminderd.
2. Het conditioneringssolvent wordt vervolgens verwisseld met een solvent, qua samenstelling lijkend op de monstrematrix.
3. Het monster wordt op de cartridge geladen. De analieten worden geretenteerd door het sorbens.
4. Het sorbens wordt gewassen met een zwak solvent dat interfererende componenten elueert maar niet de elutie veroorzaakt van de analietmoleculen.
5. Elutie van de analieten door een sterk solvent.



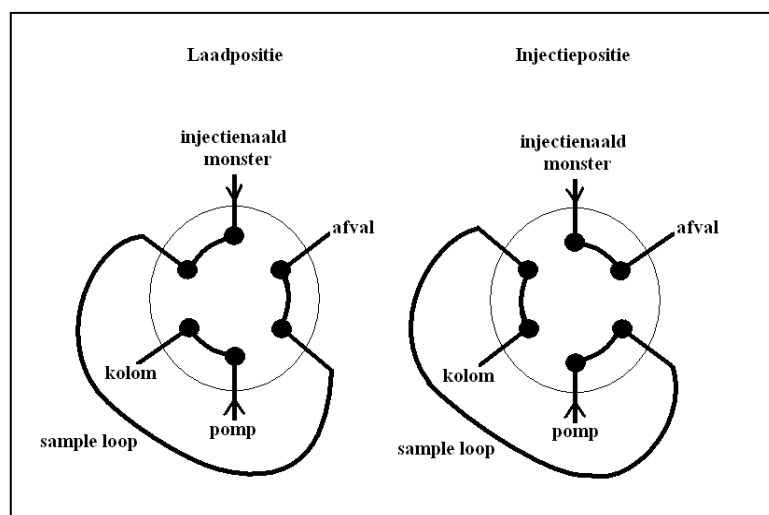
Figuur II.4: De SPE-procedure.

5. Instrumentele aspecten

Een HPLC-systeem wordt schematisch weergegeven in Figuur II.5. De mobiele fase, bestaande uit water, waterige buffers, organische solventen of mengsels hiervan, wordt met behulp van een pomp doorheen de kolom gepercoleerd. Een aanzuigslang wordt op de filter geplaatst, omdat kleine stofdeeltjes de pomp kunnen blokkeren. Mogelijke luchtbellen in de solventen worden verwijderd met behulp van een ontgasser, omdat deze bellen het constant pompen van vloeistoffen bemoeilijken en tot verstoorde detectorsignalen kunnen leiden. De pomp voert het solvent naar de mengkamer, waar de solventen in de vooraf gekozen verhouding gemengd worden. De verhouding tussen de solventen kan gedurende de gehele analyse constant blijven of kan gradueel veranderen. Deze modes worden respectievelijk de isocratische mode en gradiëntmode genoemd. De gradiëntmode laat toe om componenten met een groot verschil in affiniteit voor de stationaire fase te scheiden in een meer aanvaardbare tijd.



Figuur II.5: Schematische voorstelling van een HPLC-systeem.



Figuur II.6: De zeswegkraan.

In een HPLC-systeem wordt het monster geïnjecteerd gebruikmakend van een zeswegkraan zonder dat het solventdebiet onderbroken wordt. De zeswegkraan, getoond in Figuur II.6, heeft typisch een volume van enkele tot enkele tientallen μL . De monsterlus wordt gevuld in de laadpositie en wordt meer gevuld dan het lusvolume zodanig dat er geen luchtbelletjes in het monster zitten. De overschot aan monster loopt naar het afvalvat. De kolom blijft verbonden met de mobiele fase. In de injectiepositie wordt de mobiele fase door de lus gepompt zodanig dat het monster op de kolom terecht komt. Het laden van het monster moet heel precies gebeuren om de herhaalbaarheid van de analyse te waarborgen. De kraan moet hoge drukken aankunnen en tegelijk zo gebouwd zijn dat dode volumes beperkt blijven. Vele LC-systemen beschikken over geautomatiseerde injectiesystemen, waardoor men voorafgeplande sequenties kan uitvoeren en vele analyses per dag kan uitvoeren op een geautomatiseerde wijze.

Na injectie wordt het monster door de mobiele fase naar de kolom gevoerd, waar de samenstellende componenten gescheiden worden. De kolom bestaat uit roestvrij staal en de lengte varieert traditioneel tussen 5 en 25 cm. Voor de kolom wordt vaak een extra filter, gepakt met een kleine hoeveelheid stationaire fase, gebruikt. Deze pré-kolom houdt de niet-opgeloste monsterdeeltjes en moleculen die irriversibel aan de kolom zouden binden tegen, waardoor de levensduur van de kolom lang is. Dode volumes worden ook hier zo veel mogelijk vermeden zodat er geen piekverbreding optreedt. De kolom is gevuld met een stationaire fase en de eigenschappen van deze fase bepaalt op welke manier de componenten gescheiden worden.

Nadat de componenten van de kolom elueren worden deze naar de detector gevoerd. Er kunnen vandaag heel wat detectoren gebruikt worden in combinatie met HPLC zoals UV-

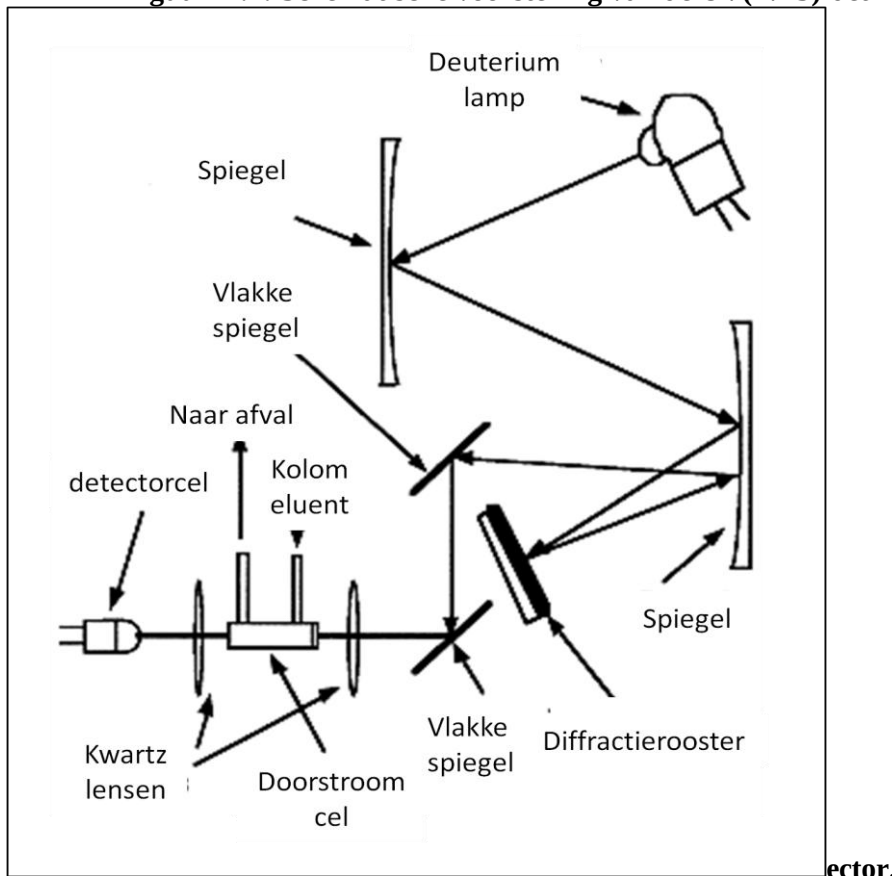
absorptantie, fluorescentie, electrochemische, lichtverstrooiingsdetectoren en massaspectrometrie.

De datacollectie wordt vandaag bijna exclusief gedaan via digitalisering van het signaal waarna het op een harde schijf opgeslaan wordt voor verdere bewerking.

5.1 De UV(-VIS)-detector

In dit werk werd o.a. gebruik gemaakt van een UV-absorptiedetector (Figuur II.7). Hierbij worden de componenten door een doorstroomcel gevoerd, waardoor licht uit een breedspectrumlamp (vb. deuteriumlamp) bij een bepaalde golflengte wordt gestuurd. De golflengte wordt dan geselecteerd met behulp van filters, een prisma of een diffractierooster.

Figuur II.7: Schematische voorstelling van de UV(-VIS)-det



Vele analietmoleculen bezitten chromofore groepen en zullen UV-licht absorberen waardoor een afname in intensiteit wordt gemeten. De wet van Lambert-Beer geeft een relatie weer tussen de absorptantie en de concentratie van het absorberend monster.

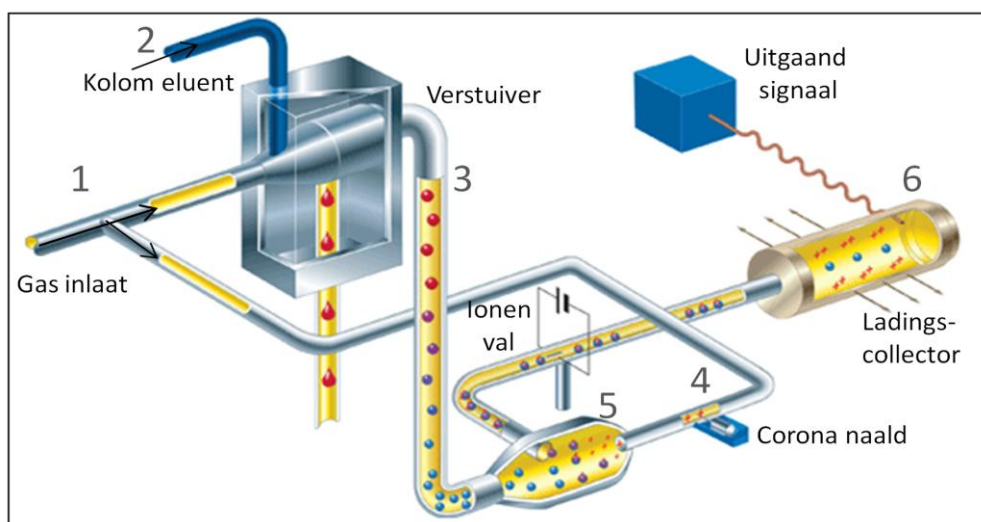
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon bc \quad \text{Vgl. 13}$$

Waar A staat voor absorptantie, I_0 voor initiële intensiteit, I voor de doorgelaten (niet geabsorbeerde intensiteit), ε voor de absorptanticoëfficiënt, b voor de optische weglengte en c voor de concentratie.

5.2 De charged aerosol detector

Veel gebruikte detectoren in combinatie met HPLC zijn UV-VIS, absorptantiedetectoren, fluorescentie-emissiedetector en massaspectrometrie. De respons van deze detectoren is echter sterk afhankelijk van de molecuulstructuur. Een **universele detector** laat daarentegen wel toe om een zeer grote variëteit aan componenten te detecteren waarbij een consistente relatie tussen de intensiteit van het signaal en de hoeveelheid geïnjecteerd materiaal verkregen wordt. Brekingsindex-detectie is de oudste vorm van universele detectie. Deze detectoren zijn echter bijzonder ongevoelig en daarom niet breed toepasbaar. Detectoren die gebruikmaken van aerosols, de “Charged Aerosol Detector” (CAD) en de “Evaporative Light Scattering Detector” (ELSD), zijn universele detectoren in zoverre dat de analietmoleculen weinig vluchtig zijn (kookpunt $>200^\circ\text{C}$) en een aerosol kunnen vormen (Charlesworth 1978). In dit werk werd gebruikmaakt van een CAD en daarom zal enkel de werking van deze detector uiteengezet worden.

Een schematische voorstelling van de CAD wordt in Figuur II.8 gegeven. Doorheen de detector stroomt er stikstofgas. Het gas wordt gesplitst (1) en een deel van het gas zal het inkomende kolomeluent vernevelen (2). De vluchtige solventen verdampen door het stikstofgas en de vernevelde druppels drogen zodanig dat er alleen analietpartikels overblijven, die een aerosol vormen (3). De secundaire gasstroom passeert langs een hoogspannings-platina coronadraad en wordt zo positief geladen (4). De positieve gasstroom stroomt in tegengestelde richting over de analietpartikels. De geladen gasionen zetten zich af op de partikels op een uniforme wijze (5). Wanneer de geladen partikels nu passeren langs een ladingscollector, waar de ladingen worden omgezet in stroom (6), kan men aan de hand van het gemeten signaal de hoeveelheid analiet bepalen (Dixon en Peterson 2002).



Figuur II.8: Schematische voorstelling van een CAD (Figuur ESA Inc.).

De detector kan enkel gebruikt worden in combinatie met solventen die snel vervluchtigd kunnen worden. Fosfaatbuffers of andere solventen die zouten bevatten zijn dus niet geschikt. Het is een universele detector omdat de detectorrespons eenvoudig kan gecorreleerd worden met de concentratie van het analiet en bovendien wordt elke weinig-vluchtige component gedetecteerd.

Het aantal en de grootte van de verstufte druppels worden bepaald door de eigenschappen van de mobiele fase zoals de viscositeit, de oppervlaktespanning en de dichtheid. De grootte van de partikels die de detector bereiken, wordt dus ook bepaald door deze eigenschappen. De samenstelling van de mobiele fase verandert echter tijdens de meeste LC-analyses. Bij een grotere concentratie aan organisch solvent zal het gedetecteerde signaal stijgen en niet meer uniform zijn (Asmus en Landis 1984). Een kalibratiecurve kan opgesteld worden om dit probleem op te lossen. Er wordt een niet-geretenteerde component op verschillende tijdstippen tijdens de analyse geïnjecteerd en uit de gedetecteerde signalen kan men een kalibratie uitvoeren om zo een uniform signaal te krijgen (Mathews, Higginson et al. 2004).

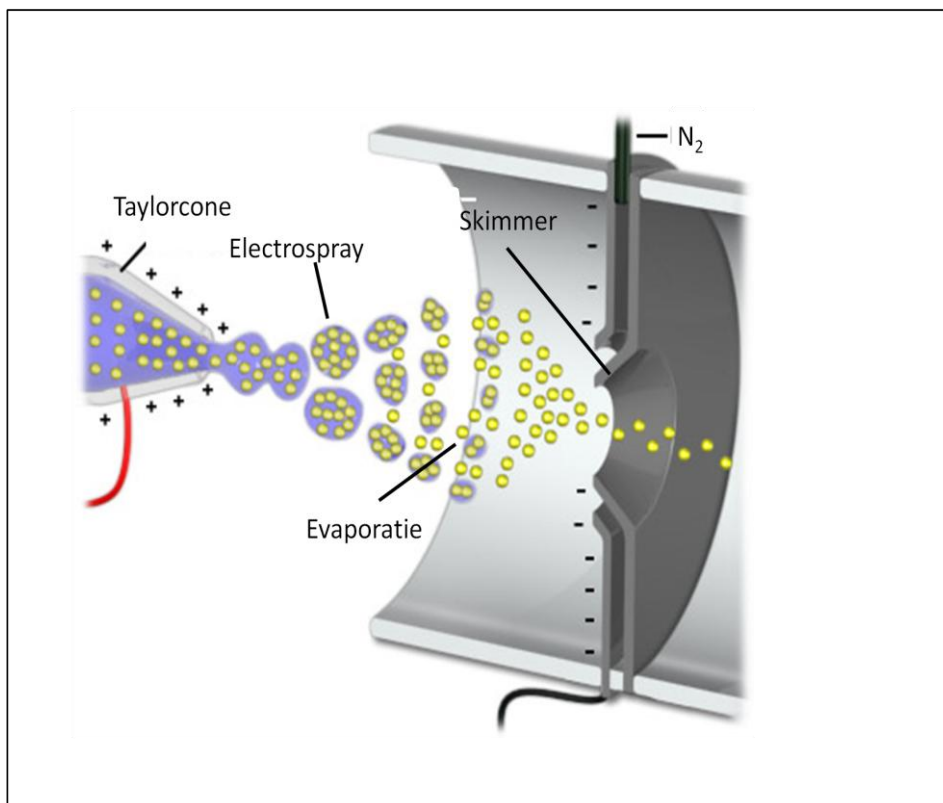
Een elegantere methode is mobiele-fase-compensatie. Een secundaire mobiele fasestroom, die juist de omgekeerde gradiënt volgt als de primaire stroom, wordt naar de CAD gevoerd door een tweede pomp. Hierdoor blijft gedurende de hele analyse de mobiele fase samenstelling constant en dient er geen kalibratie uitgevoerd te worden. Het grote voordeel bij deze methode is het feit dat men bij verandering van de gradiënt eenvoudig de secundaire gradiënt mee moet veranderen. Bij de kalibratiemethode moet bij elke nieuwe gradiënt een nieuwe kalibratie uitgevoerd worden (de Villiers, Gorecki et al. 2007). De strategie van debietcompensatie wordt later in dit werk ook gehanteerd voor wijnanalyses.

5.3 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie (MS) is een techniek die gevormde ionen in de gasfase scheidt op basis van hun verhouding van massa tot lading. De massaspectrometer kan niet alleen informatie geven over het moleculair gewicht maar ook over de structuur van de molecule. Een massaspectrometer bestaat fundamenteel uit een ionisatiebron, een massa-analysator en een detector. De ionisatiebron zet de analieten om naar gasvormige ionen waarna de ionen de analysator betreden. In de analysator worden de ionen met behulp van een magnetisch en/of elektrisch veld gescheiden op basis van hun massa over lading verhouding (m/z waarde). De ionenbundel wordt omgezet in een meetbaar signaal door de detector. De ionenbundel moet onder vacuüm gemeten worden en vacuümpompen helpen dit te verwezenlijken. Bij single ion monitoring (SIM) worden er één of enkele m/z waarden geselecteerd. Met de ion scanning mode wordt er een massagebied gedetecteerd die identificatie toelaat.

5.3.1 De ionisatiebron

Massaspectrometrie kon pas in de jaren '80 succesvol gekoppeld worden met vloeistofchromatografie dankzij de **Atmosferische Druk Chemische Ionisatie bron (APCI)**, en de **Electrospray Ionisatie bron (ESI)**. Omdat in dit werk enkel ESI werd gebruikt, wordt enkel de werking van deze ionisatiebron (Figuur II.9) beschreven.

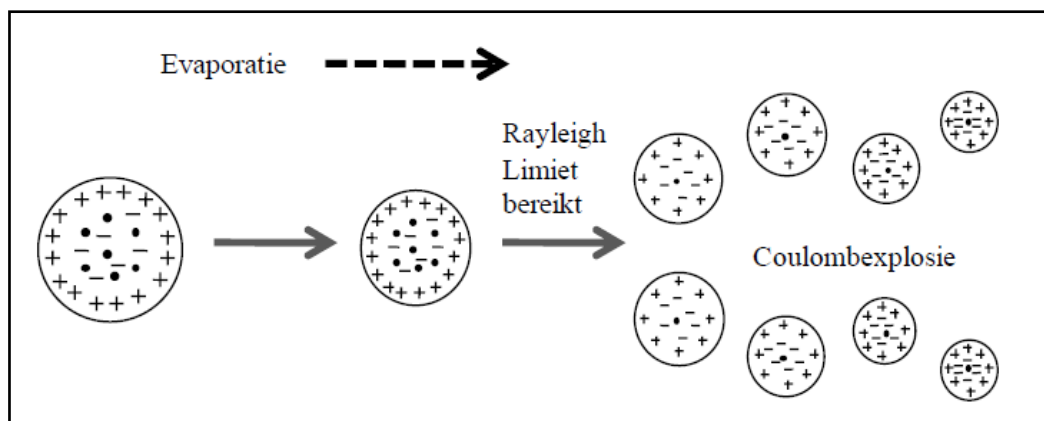


Figuur II.9 : Schematische voorstelling van de ESI bron.

Bij electrospray-ionisatie vinden er drie processen plaats: de verneveling (druppelvorming), het krimpen van de druppel en de uiteindelijke overgang van de ionen naar de gasfase. De vloeistofstroom wordt door een capillair met scherpe tip gestuurd. Dit capillair wordt op een positieve of negatieve spanning gebracht t.o.v. een tegenelektrode. Een scherpe metalen tip die op een voldoende hoge spanning staat, kan een elektron van een naburig atoom of molecule onttrekken. Hierdoor ontstaan er aan het tipuiteind, de “Taylor cone”, van het capillair een opeenstapeling van positieve of negatieve solventionen terwijl de elektronen worden opgenomen door de wanden van het capillair (Taylor 1964). De positieve ionen ontsnappen uit de “Taylor cone” in de vorm van geladen druppels.

De druppels bevatten een overmaat aan positief geladen ionen waardoor ze elkaar afstoten en zo een konische “electrospray” vormen. Deze electrospray wordt gevormd bij atmosferische druk. Bij vluchtige solventen zal een deel van de druppel verdampen, waardoor de oppervlakteladingen dichter bij elkaar komen. Het aanleggen van een stikstof-tegenstroom versnelt het verdampingsproces. Wanneer de elektrostatische repulsie groter wordt dan de oppervlaktespanning van de druppel, de Rayleighlimiet, zal de druppel uit elkaar spatten en worden er kleinere druppels gevormd. Hetzelfde proces zal zich herhalen bij deze kleinere druppels. Uiteindelijk vormen er zich minuscule geladen druppels die slechts nog enkele analietmoleculen bevatten (Fenn 2003).

Over de vorming van de uiteindelijke analietionen zijn er twee modellen vooropgesteld. Het “Charged Residue Model” (CRM) gaat er van uit dat uiteindelijk het solvent volledig zal verdampen en de analietmoleculen een deel van de druppelladingen, de protonen, gaan overnemen. Deze vormen zo analietionen in de gasfase. Het Ion Evaporatie Model (IEM), weergegeven in Figuur II.10, stelt dat het elektrisch veld van zeer kleine druppels intens genoeg is om een analietion te vormen en van het druppeloppervlak naar de gasfase te brengen (Iribarne en Thomson 1976). Beide modellen werden experimenteel bevestigd. Het CRM treedt op bij grotere moleculen terwijl het IEM vooral optreedt bij kleinere moleculen (Fenn 2003).



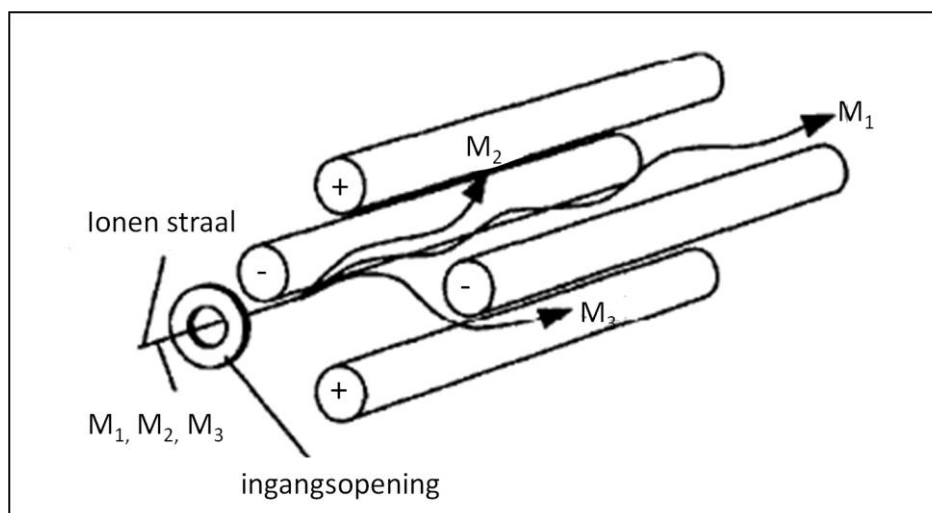
Figuur II.10: Het ESI ion evaporatie model.

5.3.2 De massa-analysatoren en detectoren

De gevormde ionen worden naar de analysator gevoerd waar ze gescheiden worden op basis van hun m/z verhouding. De ionen worden onderweg gefocuseerd door elektrostatische lenzen zodanig dat ze optimaal in de analysator terechtkomen. In elk type analysator is er hoogvacuüm zodanig dat de ionen geen botsingen meer kunnen ondergaan met overgebleven gasmoleculen. In dit werk werd er gebruik gemaakt van de “Time-of-Flight”. Daarnaast wordt ook de quadrupool besproken omdat deze robuuste analysator het meest gebruikt wordt.

De quadrupool

De quadrupoolanalysator (Figuur II.11) is de meest gebruikte analysator in massaspectrometrie. Dit heeft vooral te maken met zijn relatieve eenvoud en de daarmee gepaard gaande lage kostprijs. De quadrupool heeft echter een beperkt m/z bereik, massaresolutie en detectiegevoeligheid. Deze analysator bestaat uit vier evenwijdige geleidende staven. De recht tegenover elkaar staande staven zijn elektrisch verbonden. De zo twee gevormde elektrodeparen worden op een gelijke maar tegengestelde potentiaal gebracht. Deze potentiaal bestaat uit een gelijkspannings- en wisselspanningscomponent.



Figuur II.11: De quadrupool waarbij alleen M_1 een stabiel traject vertoont.

Geladen deeltjes, zoals ionen, ondergaan tijdens hun vlucht door een elektrisch of een magnetisch veld een kracht die hen doet afwijken van het oorspronkelijk traject. De wisselspanningscomponent zorgt ervoor dat de elektrodeparen tijdens een halve periode een positieve lading hebben en tijdens de andere periode negatief geladen zijn. De inkomende ionen worden tijdens de positieve halve periode naar het centrum gedrukt en dus gefocuseerd. Tijdens de negatieve periode worden de ionen naar de staven toe getrokken of gedefocuseerd. Indien het ion voldoende wordt gedefocuseerd, zal het verwijderd worden uit de ionenbundel. De grootte van de potentiaal, de frequentie van de wisselspanningscomponent en de m/z waarde van een ion zijn bepalend voor de mate van defocussing.

De gelijkspanningscomponent werkt eigenlijk als een massafilter. Voldoende zware ionen voelen enkel de gelijkspanningscomponent. Aangezien een elektrodenpaar een positieve gelijkspanning heeft zal deze de ionen focuseren naar het centrum. Alle ionen beneden een kritische waarde zullen echter wel het de wisselspanningscomponent voelen en uit de bundel verwijderd worden. Zo gedraagt de positief geladen elektrodenpaar zich als een massafilter en zullen alleen ionen met een m/z waarde boven een kritische waarde doorgelaten worden.

Het ander elektrodenpaar heeft een negatieve potentiaal en zware ionen zullen nu uit de bundel verwijderd worden. Ionen onder een kritische waarde zullen echter gerefocuseerd worden door de wisselspanningscomponent. Het elektrodenpaar met een negatieve potentiaal zal dus alleen ionen doorlaten met m/z waarden beneden een kritische waarde. Alleen ionen met m/z waarde binnen deze twee kritische waarden zullen een stabiel traject hebben doorheen de massaspectrometer en gedetecteerd worden (Encinar, Alonso et al. 2001).

De Time-of-Flight

Bij de *Time-of-Flight* (TOF) analysator worden de ionen gescheiden op basis van hun vluchttijd. De ionen worden net na de bron versneld door een elektrisch veld en vliegen door een veldvrije buis. De snelheid van het ion is afhankelijk van de m/z waarde. Het is noodzakelijk dat een korte puls van ionen uit de ionenbron wordt doorgelaten. Aangezien men bij een TOF de tijd meet, moeten de ionen immers op hetzelfde tijdstip versneld worden. De snelheid van het ion en dus ook de tijd dat het ion doorbrengt in de buis vooraleer gedetecteerd te worden, wordt weergegeven door de volgende formule.

$$v = \sqrt{(2 \cdot z \cdot e \cdot E)/m} \quad \text{Vgl. 14}$$

Hierbij staat z voor het aantal ladingen, e voor de lading van een elektron, E voor de grootte van het elektrisch veld in het versnellingselement en m voor de massa.

Wanneer de lengte van de TOF voorgesteld wordt door d , dan is een ion een tijd t onderweg.

$$t = \frac{d}{v} = \sqrt{\frac{m}{Z}} * a \text{ (constante)} \quad \text{Vgl. 15}$$

Op het einde van de veldvrije buis worden de inkomende ionen gedetecteerd. De tijd dat een ion nodig heeft voor zijn vlucht door de buis hangt af van de m/z waarde. Bij ionen met grotere massa's worden de tijdsverschillen kleiner en zal de resolutie slechter worden. Een langere vluchtbuis zal dus de vluchttijd en de resolutie verbeteren.

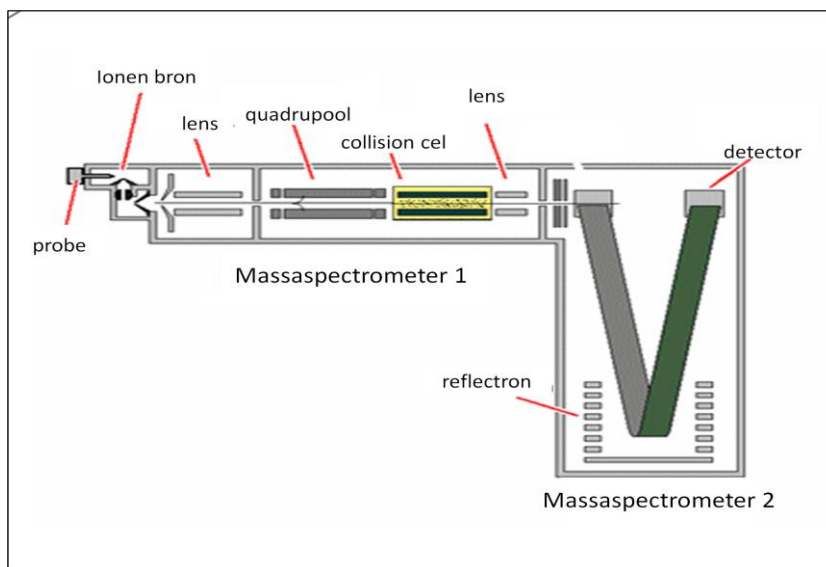
Verschillende ionen met dezelfde m/z waarde hebben echter niet dezelfde beginsnelheid. Een hogere resolutie vereist echter een gelijktijdige detectie van alle ionen met dezelfde m/z waarde. Het *reflectron*, een reflecterend elektrisch veld, compenseert deze verschillen in snelheid. De ionen vallen in op het reflectron en worden in een andere hoek weggekaatst. Ionen met een hogere snelheid zullen dieper doordringen en zo een langere weglengte hebben dan ionen met lagere snelheid. Tijdens de wegkaatsing naar de detector halen de snellere ionen de tragere weer in en vallen ze gelijktijdig in op de detector. Naast deze refocussing is de weglengte van de vluchtbuis nu ook (bijna) verdubbeld en neemt de resolutie nog eens toe (Mamyrin 2001).

De detectie van ionen in de meeste massaspectrometers gebeurt door middel van een *elektronvermenigvuldiger* die het signaal opvangt en versterkt.

5.3.3 Tandem massaspectrometrie

De electrospray ionisatie is een zachte vorm van ionisatie. De spectra zullen meestal alleen de geïoniseerde molecule (moleculair ion) tonen en weinig fragmentatie vertonen. Deze fragmentatie kan men verkrijgen door tandemmassaspectrometrie (MS-MS). Een tandemmassaspectrometer is weergegeven in Figuur II.12 en bestaat meestal uit een ionisatiebron en twee massa-analysatoren met ertussen een botsingscel. In deze cel zal stikstofgas botsen met de ionen en hun verdere fragmentatie veroorzaken. Deze fragmenten worden gedecteerd en zo kan structurele informatie over de analietmolecule bekomen worden. Dit kan dan gebruikt worden voor structuuranalyse, voor identificatie of voor meer selectieve detectie.

Enkele veel gebruikte combinaties zijn de triple quadrupool (QQQ), de quadrapool-Time-of-Flight (QTOF) en de Time-of-flight-Time-of-Flight (TOF-TOF). In dit werk werd gebruik gemaakt van de TOF-MS.



Figuur II.12: Schematische voorstelling van een Q-TOF.

III. Antioxidantonderzoek in wijn

1. Inleiding

Wijn is samen met bier een van de oudste alcoholische dranken. Ze worden gevormd door gisten, die suiker fermenteren tot ethanol en CO₂. De oudste geproduceerde wijn werd teruggevonden in Iran en dateert van 5.000 vChr (Berkowitz 1996). Wijn werd al snel één van de meest gedronken alcoholische dranken in de geschiedenis en is nog steeds populair bij een overgroot deel van de wereldbevolking.

Er zijn verschillende wijnvariëteiten nl. droge en zoete wijnen, witte, rosé en rode wijnen, porto en sherry. Bij een droge wijn is bijna al de suiker gefermenteerd, terwijl in de zoete wijnen een overschot aan suiker aanwezig is. Rosé wijn wordt gemaakt door de productie van rode wijn vroegtijdig te laten stoppen.

De productie van wijn start in principe al bij het selecteren van druiven, het hoofdbestandsdeel van wijn, en stopt wanneer de wijn op flessen wordt getrokken. De kwaliteit van de wijn hangt in de eerste plaats af van de kwaliteit van de gebruikte druif. De druifkwaliteit wordt op zijn beurt bepaald door de variëteit en de “terroir”. Dit is de combinatie van de teeltgrond, het klimaat, het groeiseizoen, de beschikbare mineralen in de grond en de oogsttijd. De druiven worden in Europa meestal geoogst tussen september en november. Het moment van oogsten wordt bepaald door het suikergehalte en de pH van de druif. Het oogsten kan zowel machinaal als handmatig gebeuren.

Na het oogsten worden de druiven geperst tot een “must” (pulp). Wanneer de sappen in contact blijven met de rode druiven (gedurende 3 weken), zullen de sappen de pigmenten en de tanines van de druivenschil overnemen en een rode kleur verkrijgen. Rosé wordt verkregen door het kortstondig in contact brengen van de sappen met de schillen en bij het maken van witte wijn worden de sappen niet in contact gebracht met de schillen of wordt een witte druivensoort gebruikt. Na het persen van de druiven vindt de eerste fermentatie plaats van de “must” in grote vaten. Op de schil van de geoogste druiven bevindt er zich een natuurlijke gist. Deze gist kan gebruikt worden voor de fermentatie, maar men maakt liever gebruik van een gecultiveerde giststam zodanig dat het gistproces op een gecontroleerde manier kan verlopen. Aan de wijn worden zwaveloxiden toegevoegd, waardoor natuurlijk voorkomende gisten en bacteriën afgedood worden. De toegevoegde giststam (bv. *Saccharomyces ellipsoideus*) is resistent tegen zwaveloxiden. Bij de fermentatie worden de

suikers omgezet in ethanol volgens een verhouding van 2/1. Om een typische alcoholpercentage van 12% te halen, moet het druivensap dus een suikerconcentratie van 24% hebben.

Na de eerste fermentatie wordt de must in vaten, traditioneel van hout, bewaard en wordt er gezorgd dat de bewaring gebeurt in afwezigheid van zuurstof. In de vaten gebeurt er een tweede, tragere fermentatie gedurende 3 tot 6 maanden. Hierna is de wijn klaar voor het op fles zetten (Cox 1999).

2. Gezondheidsaspecten van wijn

Wijn wordt reeds vele eeuwen geprezen voor z'n geneeskrachtige werkingen. Pas in de laatste eeuw werd er ook wetenschappelijk bewijs opgebouwd waaruit blijkt dat een gematigde consumptie van sommige alcoholhoudende dranken, en in het bijzonder rode wijn, gezond is. Zo heeft een glaasje rode wijn per dag een stijging van het "High Density Lipoprotein" (HDL, ook wel goede cholesterol genoemd) gehalte in het lichaam tot gevolg. Een overmatige consumptie van deze dranken zorgt echter voor veel gezondheidsproblemen.

Wijn bevat zoals elke alcoholische drank, een zeker gehalte aan ethanol. Het ethanol gehalte wordt vooral bepaald door de suikerconcentraties in de druiven en welk type gist er gebruikt werd voor de fermentatie. De meeste wijngisten zijn in staat om de fermentatie door te voeren tot 10% vooraleer ze afsterven. Een overmatige consumptie van ethanol veroorzaakt levercirrose en een vergrote kans op hart-en vaatziektes.

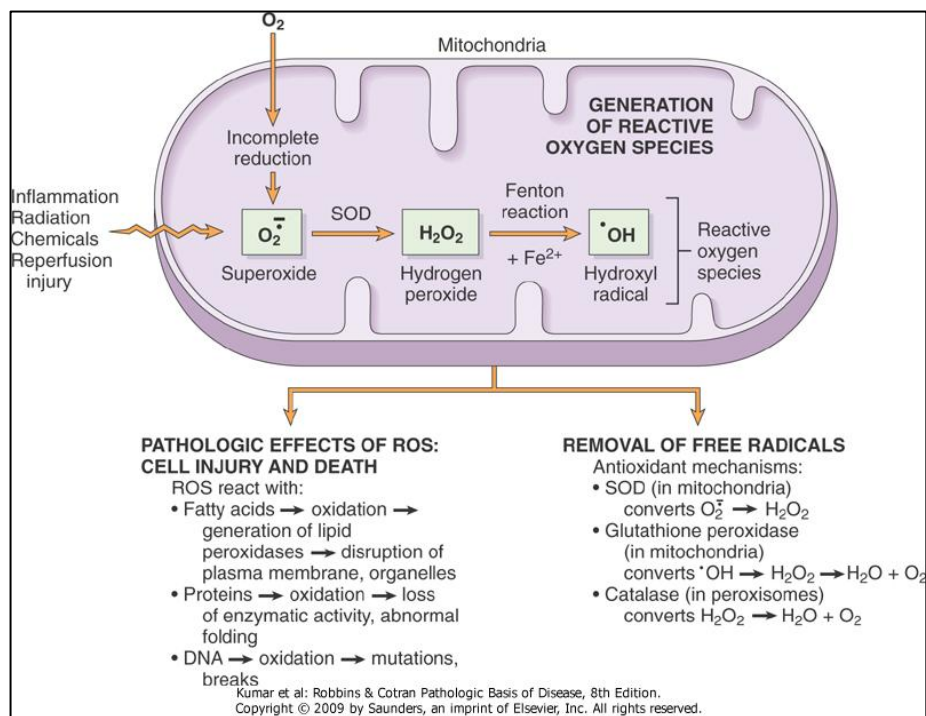
Zwavel dioxide (SO_2) en sulfietzouten worden als bewaarmiddelen gebruikt in de voedingsindustrie. De smaak, kleur en de stabiliteit van de wijn wordt ook bepaald door de aanwezigheid van sulfieten. Deze voorkomen immers de oxidatie van de wijn en onderdrukken slechte smaken in goedkope wijnen, afkomstig van het fermentatieproces (Gomes, Rocha et al. 1996). De hoeveelheid sulfiet, typisch zo een 100 $\mu\text{g/ml}$ moet echter beperkt zijn omdat sommige mensen, die allergisch zijn aan sulfiet, anders tijdelijke hinder of blijvende fysieke schade kunnen oplopen (Li en Zhao 2006). De recentste trend bij wijnmakers is dan ook het minimaliseren van het sulfietgehalte in de wijn, om zo te voldoen aan de wensen van de klant en de nieuwe reglementering van de Europese overheid (Bush, Taylor et al. 1986).

Naast suikers, ethanol, sulfieten zijn er in een natuurproduct als wijn nog tal van klassen van componenten aanwezig zoals organische zuren, aminozuren, proteïnen, terpenen, lactonen,... waar er niet dieper op ingegaan zal worden in dit werk. De nadruk van de verdere discussie ligt op molecules die in staat zijn om vrije radicalen te vangen.

Een matige consumptie van wijn (3-5 glazen per week) wordt door veel artsen aangeraden aan mensen met aanleg voor cardiovasculaire ziektes. Verscheidene studies hebben aangetoond dat wijndrinkers significant minder last hebben van hart- en vaatziektes ten opzichte van niet drinkers. Wijn bevat immers antioxidanten en deze stoffen neutraliseren de schadelijke werkingen van reactieve zuurstof species ("Reactive Oxygen Species", ROS) die vrijkomen tijdens het metabolisme (Xanthopoulou, Fragopoulou et al. 2010).

2.1 ROS en antioxidanten

ROS zijn reactieve chemische entiteiten (Reactive Oxidative Species, ROS) die men kan splitsen in twee categorieën: de vrije radicalen ($O_2^{\bullet-}$ en $OH^{\bullet}$) en de non-radicalaire derivaten (H_2O_2 en $HOCl$). De vrije radicalen worden onder andere geproduceerd bij de aerobe ademhaling ter hoogte van de mitochondriën (Figuur III.1) terwijl de non-radicalaire derivaten voorlopers zijn van de vrije radicalen. Buiten deze endogene bron worden vrije radicalen ook gevormd door zonlicht, X-stralen, vervuiling, roken en alcohol. ROS zijn meestal aanwezig in lage concentratie, doordat ze gedegradieerd en verwijderd worden door cellulaire defensiesystemen. Door die systemen behouden cellen een “steady state”, waarbij vrije radicalen transiënt aanwezig zijn in lage concentraties en geen schade veroorzaken (Cotran 2010). De vrije radicalen vervullen ook een rol als belangrijke signaalmoleculen in het metabolisme bv. $NO^{\bullet}$. Bovendien hebben ze ook een belangrijke functie in ons immuunsysteem, want macrofagen maken ROS aan om bacteriën te doden (Gerschman K 1954).



Figuur III.1: Vrije radicaalvorming in de mitochondriën en de gevolgen (Cotran 2010).

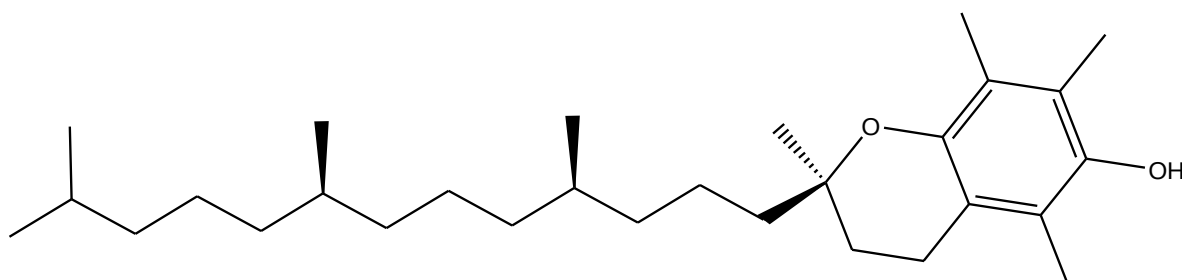
Wanneer de productie van ROS toeneemt of wanneer de defensiesystemen deficiënt zijn, dan resulteert het teveel aan radicalen in oxidatieve stress. Deze ROS leiden o.a. tot de oxidatie van “Low Density Lipoproteinen” (LDL, slechte cholesterol), wanneer deze zich

afzetten ter hoogte van de bloedvatwand. Geoxideerd LDL is de belangrijkste oorzaak van atherosclerose (McAteer, Akhtar et al. 2010).

Onderzoek heeft uitgewezen dat een hoge concentratie aan vrije radicalen de oorzaak kan zijn van verschillende hart- en vaatziekten zoals: hoge bloeddruk, diabetische cardiomyopathie, het acuut ischemisch syndroom, congestief hartfalen en adriamycin geïnduceerde cardiomyopathie (Gardner, Raineri et al. 1995). Bovendien spelen vrije radicalen ook een rol in kanker, veroudering en Alzheimer.

Een vrij radicaal is een al dan niet geladen molecule dat een ongepaard elektron bezit. Aangezien deze configuratie energetisch ongunstig is, zal een vrij radicaal snel reageren met andere aanwezige moleculen om naar een energetisch gunstigere gepaarde elektronconfiguratie over te gaan. In de meeste gevallen wordt het radicaal “overgedragen” naar een andere molecule. Dit kan een heuse kettingreactie veroorzaken. Het ene vrije radicaal reageert met een molecule, dat op zijn beurt een radicaal wordt. In het beste geval reageren twee radicalen met elkaar en wordt er zo een neutrale molecule gevormd. De kettingreactie die een vrij radicaal veroorzaakt, kan schade berokkenen aan DNA, lipiden en proteïnen (Cotran 2010).

Aangezien oxidanten aanzienlijke schade aan het lichaam kunnen veroorzaken, beschikt ons lichaam over een aantal antioxidantssystemen. Antioxidanten zijn in het lichaam voorkomende moleculen die de kettingreactie van de vrije radicalen kunnen voorkomen of kunnen onderbreken. Dit doen ze door te reageren met de vrije radicaal molecule, waardoor ze na de reactie zelf een vrij elektron bezitten (Zarban, Taheri et al. 2009). De antioxidant bezitten meestal een structuur die toelaat om het vrij elektron (het radicaal) te delokaliseren. Door deze delokalisatie zal het radicaal gestabiliseerd worden, waardoor de antioxidant minder reactief zal zijn dan een ander vrij radicaal. Behalve delokalisatie, kan de reactiviteit ook dalen door sterische hinder. De meest bekende antioxidant in het lichaam zijn de vitaminen E (Figuur III.2), B1, C en de enzymen catalase, superoxide dismutase en glutathion peroxidase (Gutteridge en Halliwell 2010).

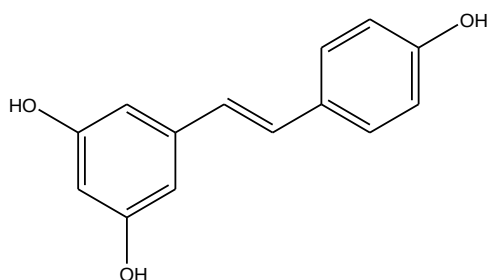


Figuur III.2: Vitamine E.

2.2 Polyfenolen, de antioxidanten in wijn

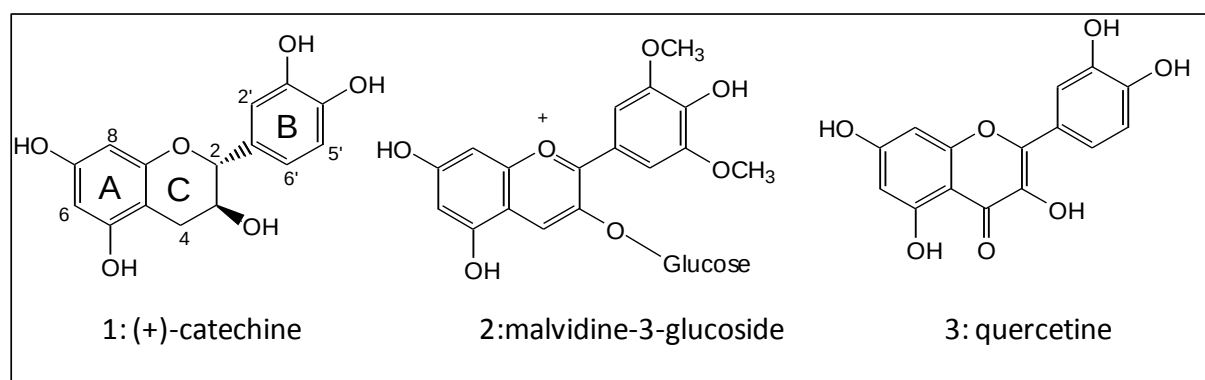
Polyfenolen in wijn spelen een belangrijke rol in de wijnkwaliteit van rode wijnen en in minder mate bij witte wijnen. Ze dragen immers bij tot smaak- en kleurontwikkeling bij het ouder worden van de wijn (Robichaud en Noble 1990). De fenolen in wijn zijn afkomstig van de druif en de pitten maar een belangrijk deel wordt tevens aangemaakt tijdens de fermentatie (Son, Hwang et al. 2009).

Polyfenolen in natuurproducten kunnen in twee grote klassen verdeeld worden: de flavonoïden en de niet-flavonoïden (Cheynier, Duenas-Paton et al. 2006). De niet-flavonoïden bestaan vooral uit fenolische zuren, zoals benzoëzuren, cinnaminezuurderivaten en stilbeenderivaten. *Resveratrol* (Figuur III.3) is een bekend stilbeen derivaat dat zich vooral in de schil van druiven bevindt en zo ook voorkomt in wijn. Resveratrol zou de kans op borstkanker en prostaatkanker verlagen (Stewart, Artime et al. 2003).



Figuur III.3 Trans-resveratrol.

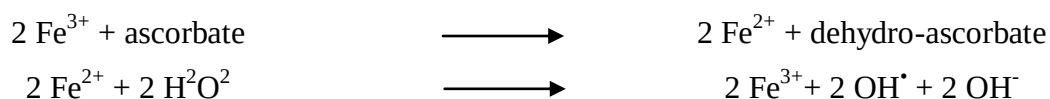
De flavonoïden hebben een difenylpropaan skelet ($C_6C_3C_6$) en kunnen onderverdeeld worden in drie groepen gebaseerd op een toenemende oxidatietoestand van ring C (Figuur III.4): flavanols, anthocyanidins en flavonols. Flavonoïden komen niet alleen voor in druiven, maar ook in vele planten, bloesems en vruchten (Williams, Spencer et al. 2004).



Figuur III.4: Representatieve componenten van de drie klassen van de flavonoïden voorkomend in wijn: flavanols (1), anthocyanines (2) en flavonols (3).

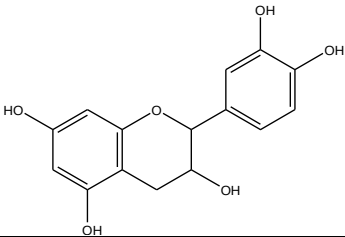
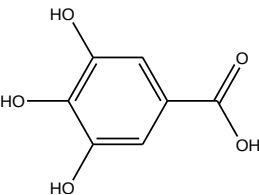
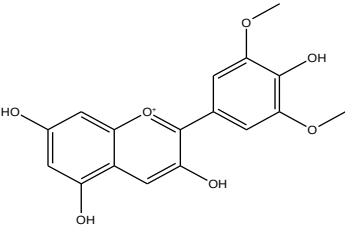
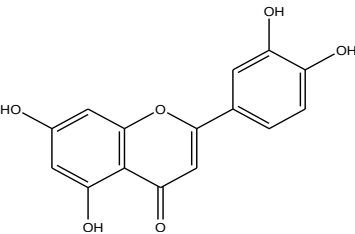
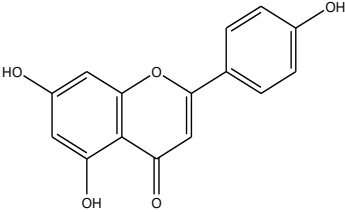
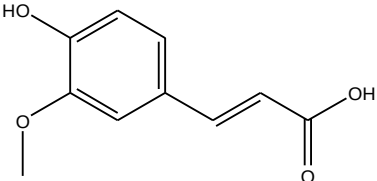
De diversiteit in flavonoiden wordt nu bekomen door de verschillende substituties op ring B en/of C. De meeste van deze polyfenolen vertonen een antioxiderende werking. Ze beschikken immers over een hydroxylfunctie gekoppeld aan een aromatische ring. Het radicaal zal hierdoor kunnen stabiliseren door delokalisatie. De verschillen in antioxidant-activiteit tussen de polyfenolen wordt veroorzaakt door de verschillende substituenten op ring B en C.

Antioxidanten die reducerende componenten zijn, vertonen ook een pro-oxidantwerking op bepaalde tijdstippen. Zo zal vitamine C (ascorbate) oxiderende species zoals waterstofperoxide reduceren maar kan het eveneens ijzerionen reduceren en deze genereren vrije radicalen door middel van de Fenton reactie:



Vitamine C heeft een overwegende antioxidant werking in het menselijk lichaam maar van polyfenolen is nog niet geweten in welke mate zij een pro-oxidant werking vertonen.

Tabel III.1 geeft een aantal wijdverspreide polyfenolen en hun voorkomen in planten en vruchten weer.

Naam	Structuur	Voorkomen
(-)-epicatechine		Wijn, kersen, druiven, appel, groene thee
galluszuur		Wijn, mango, chocolade
malvidine		Wijn, rode kool, aardbei
luteoline		Capsicum peper, selderij, tijm
apigenine		appels, druiven, peterselie
ferulazuur		bruine rijst, sinaasappel, koffie

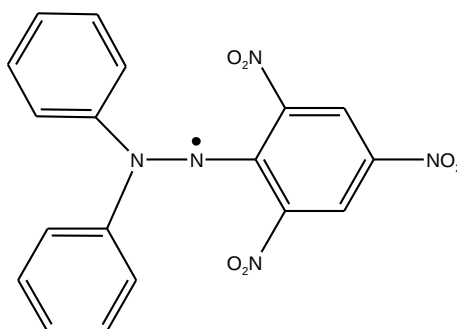
Tabel III-1: Polyfenolen, structuur en voorkomen.

3. De ABTS-test: een detectiemethode voor antioxidanten

De aanwezigheid en activiteit van antioxidanten in complexe biologische mengsels kan aangetoond worden door de reactie met een ander (dikwijls in situ gegenereerd) vrij radicaal. De meeste gebruikte vrije radicalen zijn 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonzuur) (ABTS) en 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Oplossingen van deze componenten krijgen de voorkeur op echte ROS oplossingen, omdat ze gemakkelijker te hanteren zijn. Ze zijn gemakkelijker te bereiden en blijven langer stabiel (Koleva, Niederlander et al. 2001).

3.1 De DPPH methode

De molecule 2,2'-difenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Figuur III.5) bestaat onder de vorm van een stabiel vrij radicaal. In tegenstelling tot de meeste vrije radicalen, die dimeren vormen, zal DPPH onder deze vormen blijven bestaan doordat het vrij elektron gedelocaliseerd kan worden over de gehele molecule. DPPH kan gereduceerd worden wanneer een molecule beschikbaar is die een waterstofatoom kan doneren, zoals vele antioxidanten. Dit vrij radicaal heeft een absorptiemaximum rond 515 nm en reactie tussen antioxidant en DPPH wordt meestal gemeten met behulp van een spectrofotometer.

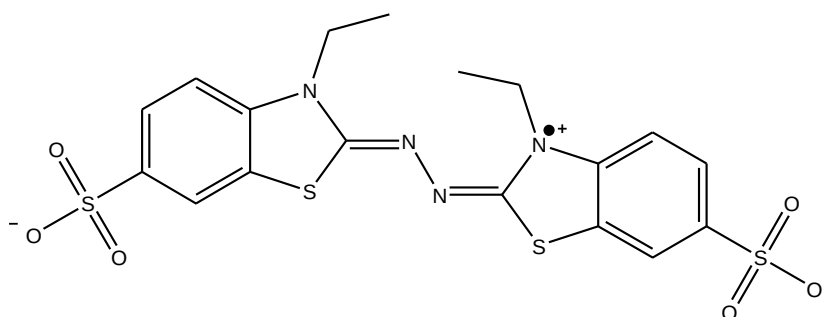


Figuur III.5: Het DPPH stabiel vrij radicaal.

DPPH wordt voornamelijk gebruikt als een of-lijn methode om de totale antioxidant-activiteit te meten van een biologisch mengsel of de activiteit van standaarden. De activiteit wordt uitgedrukt in “efficient concentration” (EC_{50}). Dit wordt gedefinieerd als de substraatconcentratie die zorgt voor 50% afname van de oorspronkelijke DPPH absorptantie.

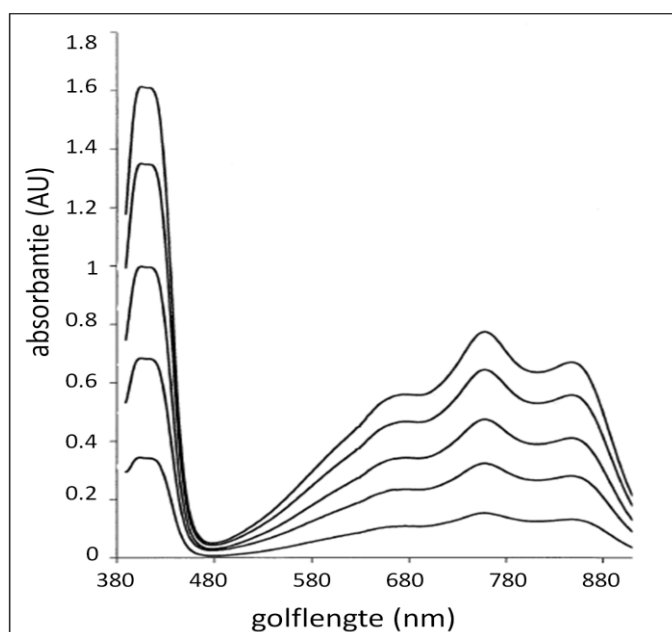
3.2 De ABTS-methode

Het ABTS radicaal kation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) wordt gevormd door een oxidatie in een fosfaatbuffer (Phosphate buffered Saline, PBS). PBS is een waterachtige buffer bestaande uit natriumdifosfaat, natriumchloride, kaliumchloride en kaliummonofosfaat en heeft een typische pH van 7,4. Deze niet-toxische buffer wordt veel gebruikt in biologische en biomedische toepassingen. Het omzetten van ABTS naar $\text{ABTS}^{\bullet+}$ kan teweeg gebracht worden door meerdere oxiderende species zoals MnO_2 , peroxodisulfaat, peroxidase/waterstof peroxidase en kalium persulfaat (Henriquez, Aliaga et al. 2002). De reactie met MnO_2 wordt weergegeven in Figuur III.6.



Figuur III.6: Het gevormde ABTS radicaal na de reactie met MnO_2 (Jack Cazes 2004).

De gevormde radicaaloplossing heeft een groen-blauwe kleur en typische absorptiemaxima bij 414 nm, 645 nm, 734 nm en 815 nm zichtbaar op Figuur III.7 (Miller, Rice-Evans et al. 1993). Deze absorbantiemaxima worden gebruikt als detectiegolflengte voor de testen. Uit deze waarden wordt meestal 414 nm gebruikt omdat deze golflengte gevoeliger is voor een antioxidanttest en omdat het ook binnen het bereik ligt van een conventionele deuteriumlamp van een UV-detector.



Figuur III.7: De absorbantie van ABTS^{•+} bij verschillende concentraties (Re, Pellegrini et al. 1999).

De stabiliteit van de test hangt af van van verschillende parameters zoals tijd, temperatuur, pH, concentratie, aanwezigheid van licht en samenstelling van het oplosmiddel. De *reactietijd* voor het vormen van een ABTS^{•+} oplossing varieert van de gebruikte methode. Deze kan zowel 10 minuten duren als een hele nacht (Re, Pellegrini et al. 1999). De *pH* van de test kan variëren tussen de 3 en de 7,4 maar moet gedurende de gehele analyse constant blijven. De antioxidanten vertonen immers een verschillende activiteit bij verschillende pH's. Daarom wordt de test meestal gemaakt in een PBS buffer omdat deze zorgt voor een fysiologische pH.

De DPPH methode kreeg in vroegere studies de voorkeur omdat de radicaalvorming van ABTS ingewikkelder en minder gecontroleerd is. Echter blijkt dat bij in-lijn detectie de ABTS-test meerdere voordelen heeft. De wateroplosbaarheid van het ABTS radicaal is hoger en deze molecule is zo geschikter voor de detectie van wateroplosbare antioxidanten. De ABTS-test is ook gevoeliger dan de DPPH-test (Niederländer H 2008).

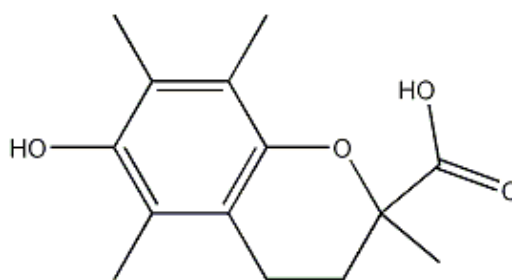
4. De detectie van antioxidanten

Na toevoeging van antioxidanten bij een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing zal het radicaal deels of volledig wegreageren met terugvorming van de ABTS molecule. Tijdens het wegreageren verandert de kleur van de oplossing. De reactie tussen radicaal en antioxidant kan zo visueel gevolgd worden. De reactie kan ook gevolgd worden door de absorbantie te meten van de oplossing. Aangezien een antioxidant het $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radicaal weer omzet naar ABTS zal de absorbantie evenredig afnemen met de concentratieverandering van het radicaal. Men kan totale antioxidant-activiteit van een monster meten in een of-lijn methode maar men kan het mengsel vooraf scheiden en de activiteit van de individuele componenten met een in-lijn antioxidantdetectiesysteem volgen (Henriquez, Aliaga et al. 2002).

4.1 De of-lijn methode

Bij een of-lijn methode is men alleen geïnteresseerd in de totale antioxidant-activiteit van een monster. De absorbantie van een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing wordt gemeten met behulp van een spectrofotometer. Vervolgens wordt een monster bij dezelfde $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing toegevoegd en wordt na een bepaalde tijd de absorbantie opnieuw gemeten. De tijd vooraleer er gemeten wordt heeft een grootteorde van één tot enkele minuten (Villano, Fernandez-Pachon et al. 2004). Doordat de reactietijd tussen antioxidant en radicaal verschilt van antioxidant tot antioxidant, is het noodzakelijk om alle mogelijke reacties volledig te laten doorgaan. De reactie in de tijd kan gevolgd worden door de absorbanties op verschillende tijdstippen te meten. De of-lijn methode wordt meestal gebruikt om de totale antioxidant-activiteit van verschillende monsters te vergelijken of om de kinetiek van een bepaald antioxidantreactie te bestuderen.

De antioxidant-activiteit van complexe mengsels of componenten van deze mengsels worden altijd bepaald aan de hand van standaarden. De TROLOX-methode is de meest gebruikte kalibratiemethode hiervoor. TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxyl zuur) is een derivaat van vitamine E en heeft antioxidant werking (Figuur III.8). Bij deze methode moet er een TROLOX kalibratiecurve opgesteld worden en wordt de antioxidant-activiteit uitgedrukt in TROLOX equivalenten.

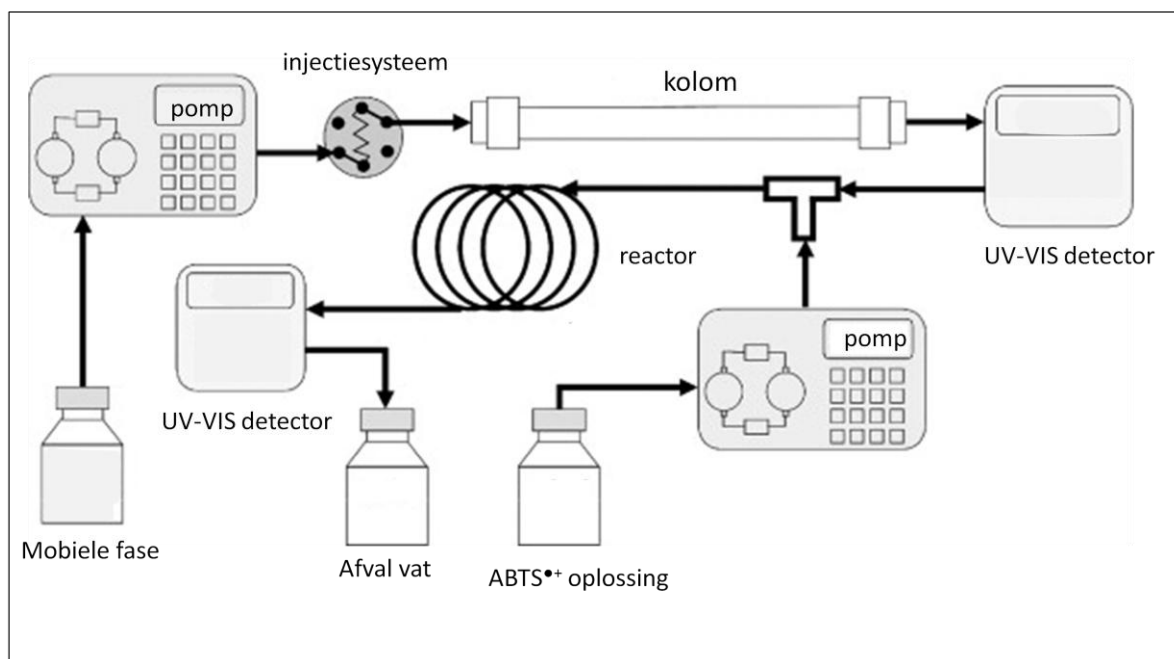


Figuur III.8: TROLOX.

Naast de TROLOX kalibratiemethode bestaan er nog verschillende andere populaire kalibratiemethodes zoals de Zuurstof Radicale Absorbantie Capaciteit (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) en de Ijzer Reducerende Capaciteit van Plasma (Ferric Reducing Ability of Plasma, FRAP). De antioxidant-activiteit van een component kan dus beschreven worden met verschillende relatieve waarden afhankelijk van de gebruikte test. Er is aangetoond dat deze relatieve waarden onderling geen enkele correlatie hebben. De gemeten antioxidant-activiteit van een component zal dus veranderen bij verschillende tests (Wang, Chu et al. 2004).

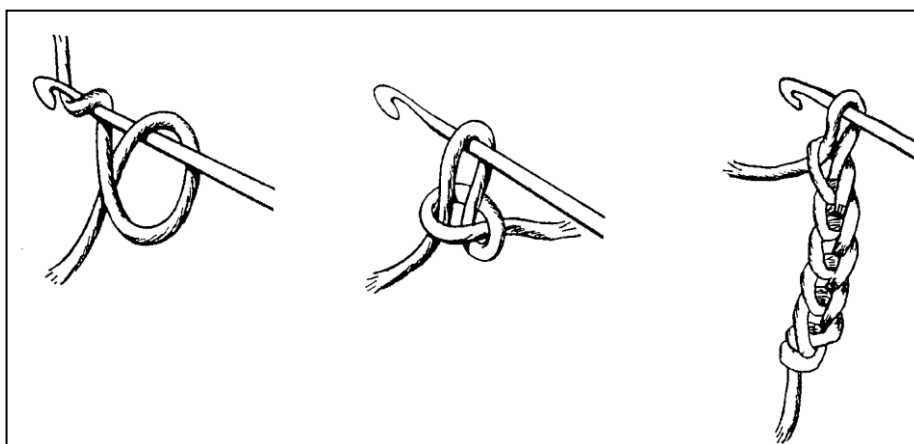
4.2 De in-lijn methode

Bij de in-lijn methode worden de antioxidanten eerst gescheiden en gedetecteerd met behulp van een LC-UV systeem (Figuur III.9). Na de scheiding vindt er een post-kolom reactie plaats (Bartasiute, Westerink et al. 2007). De eluens wordt van de eerste UV-detector door de reactor gestuurd. Samen met het eluens wordt er een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing naar de reactor gepompt met behulp van een T-stuk, waar de reactie tussen de radicaaloplossing en de gescheiden antioxidanten doorgaat. Na de reactor wordt het mengsel naar een tweede UV-detector gevoerd, die de absorbantie van de radicaal oplossing meet. Bij doorgang van een antioxidant zal de detector een vermindering van de absorbantie meten en dus een negatieve piek weergeven (Koleva, Niederlander et al. 2000).



Figuur III.9: Een in-lijn antioxidantdetectiesysteem.

De uit teflon (polytetrafluoretheen, PTFE) bestaande reactor vertoont een zeker volume dat voldoende tijd toelaat, door de gepaste keuze van de mobiele fase en reagenssnelheid, om de reactie te laten doorgaan. Verschillende antioxidanten vertonen immers verschillende reactiesnelheden. Indien men een langere reactietijd wilt, kan men de “flow” verlagen of de reactoreigenschappen veranderen. De reactortubing wordt verknoopt (Figuur III.10) zodanig dat de doorgestuurde stroom een groot aantal bochten moet maken. Hierdoor wordt maximale menging bekomen en de stroomsnelheidsgradiënt beperkt met minimale bandverbreding (Kuhlmann en Krauss 1997).



Figuur III.10 Het maken van een reactor ((Kuhlmann en Krauss 1997).

IV. Ontwikkeling van de antioxidant-test en screening van wijnen

1 Algemene instrumentele aspecten en chemicaliën

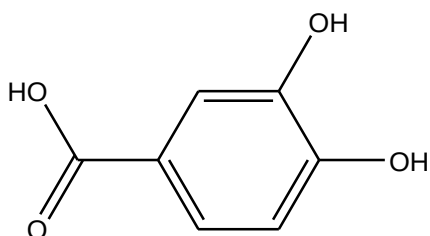
In dit werk werden alle chromatografische analyses uitgevoerd op een modulair Shimadzu HPLC 10A systeem. Er werd automatisch geïnjecteerd met een series 1050 injectiesysteem (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). De mobiele fase werd ontgast met 7600 solvent degasser (Jones Chromatography, Cardiff, UK). Detectie vond plaats met een 10A VP UV detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) en een CAD detector (ESA Biosciences, Chelmsford, USA). Er werd een bijkomende vloeistof gepompt met een 420 HPLC pump (Kontron Instruments, Watford, UK). Dataverwerking van de UV en CAD chromatogrammen gebeurde aan de hand van de programma's Labsolution (Shimadzu, Kyoto, Japan) en Chemstation.

Identificatie van de componenten gebeurde met een LC-UV-TOF-MS systeem waarbij een Agilent 1200 LC systeem gekoppeld is met een Agilent LC/MSD TOF G1969A massaspectrometer (Agilent, Waldbronn, Duitsland). De gebruikte oven was een Polaratherm I (SandraSelerity Technologies, Kortrijk, België).

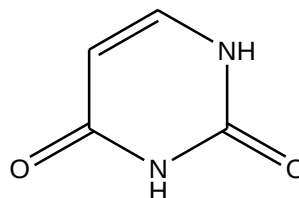
Het solvent MeOH (LC-kwaliteit) was afkomstig van Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Bornem, België). Water werd verkregen door een MilliQ water zuiveringssysteem (Millipore, Bedford, MA, USA).

2 Bepalen van de optimale loopsnelheid voor polyfenolanalyses

Zoals uiteengezet in het theoretisch gedeelte, is het belangrijk om analyses uit te voeren bij de optimale loopsnelheid. Bij de kolomdimensies gebruikt in dit werk (4,6 mm kolommen) wordt er doorgaans aangenomen dat het minimum in de van Deemter curve rond de 1 ml/min (≈ 1.5 mm/s) ligt. Het blijkt echter steeds meer dat dit een grove vereenvoudiging is en dat er daarom zeer dikwijls bij niet-optimale omstandigheden gewerkt wordt (De Villiers, Lynen et al. 2008). Om deze reden werd deze studie aangevangen met het meten van de optimale snelheid voor een polyfenol. Hiervoor werden de componenten uracil (Figuur IV.1) en 3,4-dihydroxybenzoëzuur (Figuur IV.2) gebruikt. Uracil is een merker van de dodetijd en 3,4-dihydroxybenzoëzuur is een bekend polyfenol dat antioxidant-activiteit vertoont.



Figuur IV.1: 3,4-dihydroxybenzoëzuur.



Figuur IV.2: Uracil.

3,4-dihydroxybenzoëzuur werd gescheiden bij verschillende loopsnelheden van de mobiele fase met een isocratische methode. Vervolgens wordt H berekend zoals uiteengezet in het theoretisch gedeelte op basis van de breedte van de piek op halve hoogte (Vgl 5-6). In dit geval werd H softwarematig berekend met de data-analysesoftware van het Shimadzu systeem. De H wordt uitgezet t.o.v u , de mobiele fasesnelheid. Het minimum van deze curve geeft de optimale loopsnelheid weer (optimale u). De loopsnelheid u van de mobiele fase wordt berekend aan de hand van de lengte L van de kolom en de elutietijd t_M van de dodetijsmerker.

$$u = \frac{L}{t_M} \quad \text{Vgl. 16}$$

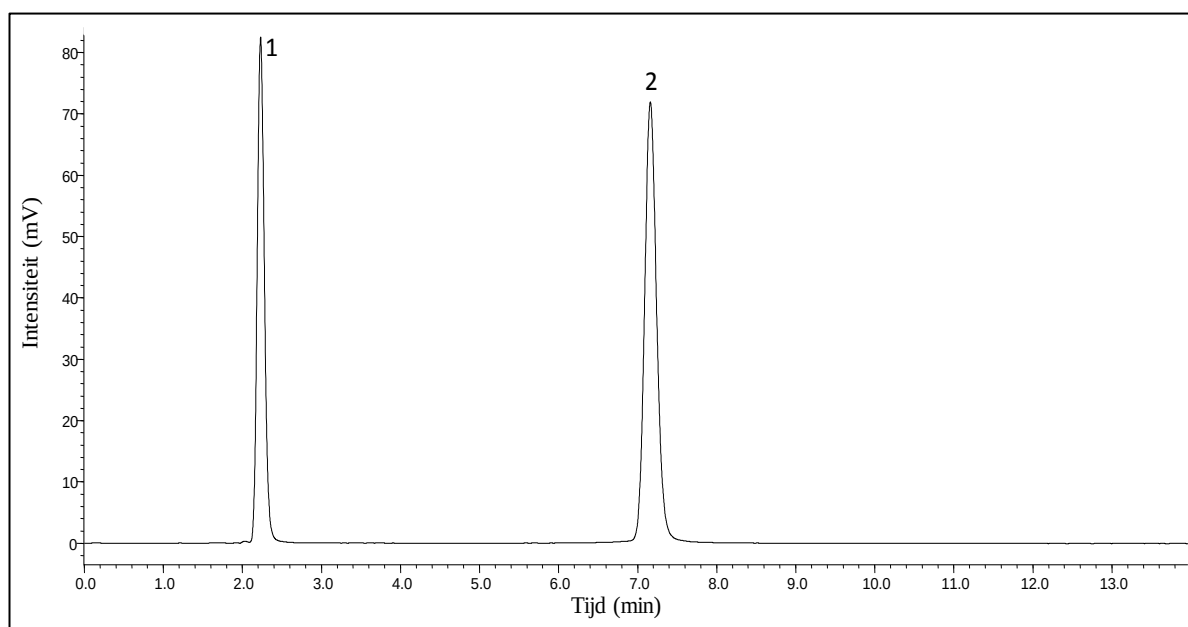
2.1 Experimentele condities

Een 1 mg/ml stockoplossing van zowel uracil als 3,4-dihydroxybenzoëzuur werd gemaakt in MeOH. Hieruit werd een monster aangelengd in 20/80 methanol/water met een

concentratie van 15 µg/ml van beide componenten. Voor de analyse werd er gebruik gemaakt van een Luna C₁₈ kolom (250 mm; i.d. 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex, Torrance, USA). De analyse werd isocratisch uitgevoerd met een mobiele fase samenstelling van 20/80 methanol/water (+0,1% mierenzuur). Het injectievolume bedroeg 20 µl.

2.2 Resultaten en bespreking

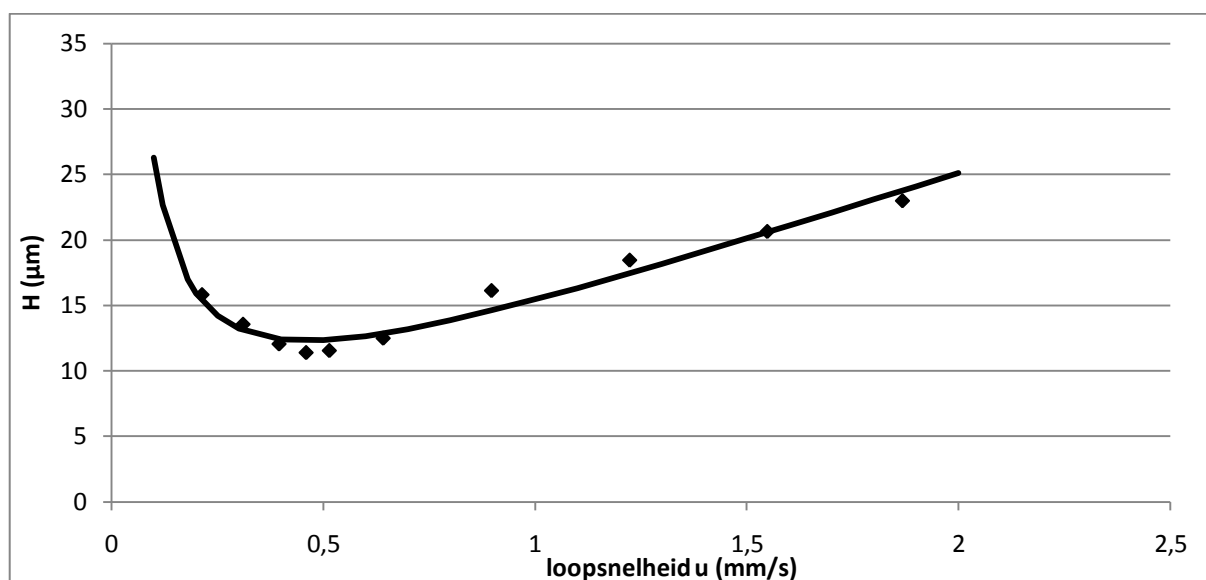
Het chromatogram in Figuur IV.3 toont een representatief chromatogram van deze analyse bekomen bij 1,5 ml/min.



Figuur IV.3: Chromatogram met uracil (1) en 3,4-dihydroxybenzoëzuur (2) bij een debiet van 1,5 ml /min.

Figuur IV.4 toont de uiteindelijke van Deemter curve die berekend werd met behulp van het programma LabFit. De van Deemter coëfficiënten werden berekend en de vergelijking kan geschreven worden als:

$$H = 2,248 + \frac{2,28}{u} + 10,8 \times u$$



Figuur IV.4: De van Deemter curve bepaald voor de analyse van 3,4-dihydroxybenzoëzuur met een Luna C18 kolom.

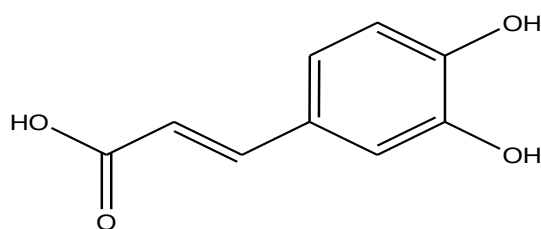
Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat de meest efficiënte analyse zal plaatsvinden bij 0,46 mm/s wat overeenkomt met een debiet van 0,5 ml/min. Merk op dat er verondersteld wordt dat het gedetecteerde minimum van 3,4-dihydroxybenzoëzuur ook van toepassing is op de andere polyfenolen. Dit is niet noodzakelijk correct maar de diffusiecoëfficiënten van 3,4-dihydroxybenzoëzuur zal veel meer analoog zijn aan de andere polyfenolen in vergelijking met de gewone testcomponenten zoals benzeen en toluen.

3 Optimalisatie van de ABTS-test

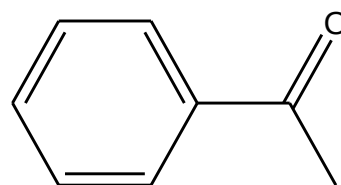
De identificatie en bepaling van de activiteit van antioxidanten werd gedaan met behulp van de ABTS-test. De $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing werd op de volgende manier aangemaakt.

3.1 Chemicaliën

Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl, NaCl, MnO_2 , en ABTS werden net zoals de polyfenolen caffeïnezuur (Figuur IV.5), catechine en 3,4-dihydroxybenzoëzuur en acetofenon (Figuur IV.6) aangekocht bij Sigma-Aldrich (Bornem, België).



Figuur IV.5: Caffeïnezuur.



Figuur IV.6: Acetofenon.

3.2 Experimentele condities

De $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing werd aangemaakt in een fosfaat gebufferde zoutoplossing (Phosphate Buffered Saline, PBS). Deze buffer werd aangemaakt door 8 g (137 mmol) NaCl; 1,4 g (9,85 mmol) Na_2HPO_4 ; 0,15g (2 mmol) KCl en 0,27g (1.99 mmol) KH_2PO_4 op te lossen in 1 L MilliQ water. Deze buffer heeft een pH van 7,4 en wordt gebruikt als oplosmiddel. ABTS wordt opgelost in de buffer. Vervolgens werd er een overmaat MnO_2 (ongeveer 2 g, 23 mmol) toegevoegd aan deze oplossing die na 10 minuten roeren werd gefilterd. Er blijft dan een blauw-groene $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -oplossing over. De oplossing werd dagelijks aangemaakt en werd altijd afgeschermd van licht en bewaard bij 4°C.

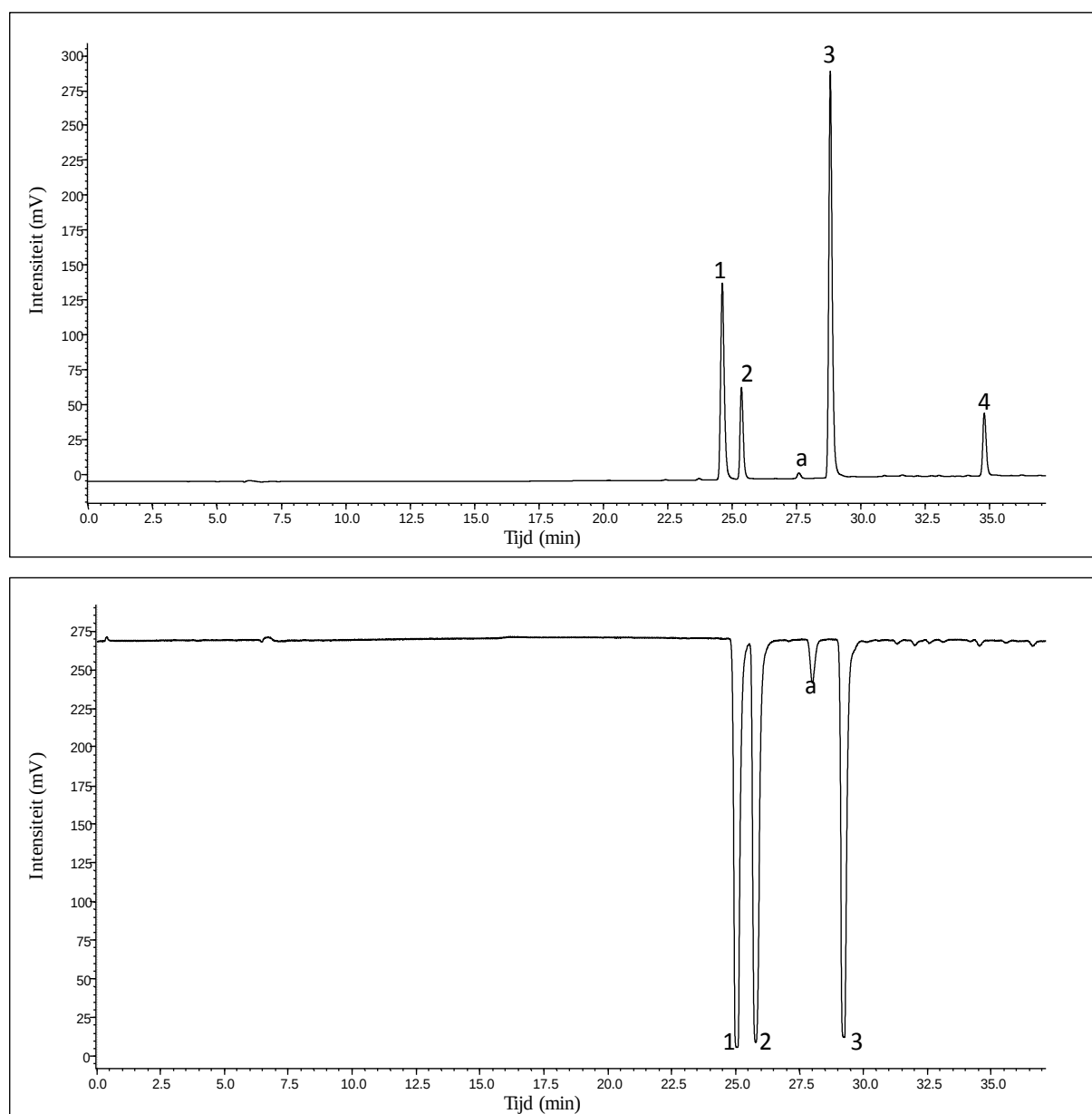
Van elk polyfenol en van acetofenon werd er een geconcentreerde oplossing gemaakt van 1 mg/ml in MeOH. Hieruit werd een monsteroplossing gemaakt van 20 µg/ml van elke standaard in 40/60 methanol.

Voor de analyses werd gebruik gemaakt van een Luna C₁₈ kolom (250 mm; i.d. 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex, Torrance, USA). Elke analyse werd uitgevoerd onder dezelfde omstandigheden. Aan de mobiele fase was er altijd een 0,1% mierenzuur toegevoegd. Er werd een gradiëntanalyse uitgevoerd met initiële condities 4% methanol en 96% water. Dit werd aangehouden voor 8 minuten. Vervolgens werd er over 32 minuten naar een samenstelling gegaan van 90% methanol en 10% water. Hierna werd er weer naar de initiële condities gegaan en werd de kolom geëquilibreerd voor de volgende analyse. Het debiet was altijd 0,5 ml/min en het injectievolume 20 µl. De polyfenolen werden na de scheiding gedetecteerd door een UV-detector bij 280 nm. Na deze detector werd de ABTS^{•+}-oplossing toegevoegd via een T-stuk en samen met de polyfenolen door de reactor gestuurd. Het debiet van de ABTS^{•+} oplossing werd gevarieerd (zie §3.3.1). De absorptie van de ABTS^{•+} oplossing werd gedetecteerd door een UV-detector bij 414 nm om zo de antioxidant-activiteit op te pikken.

3.3 Optimalisatie van de ABTS-testcondities

3.3.1 Studie van de invloed van het debiet

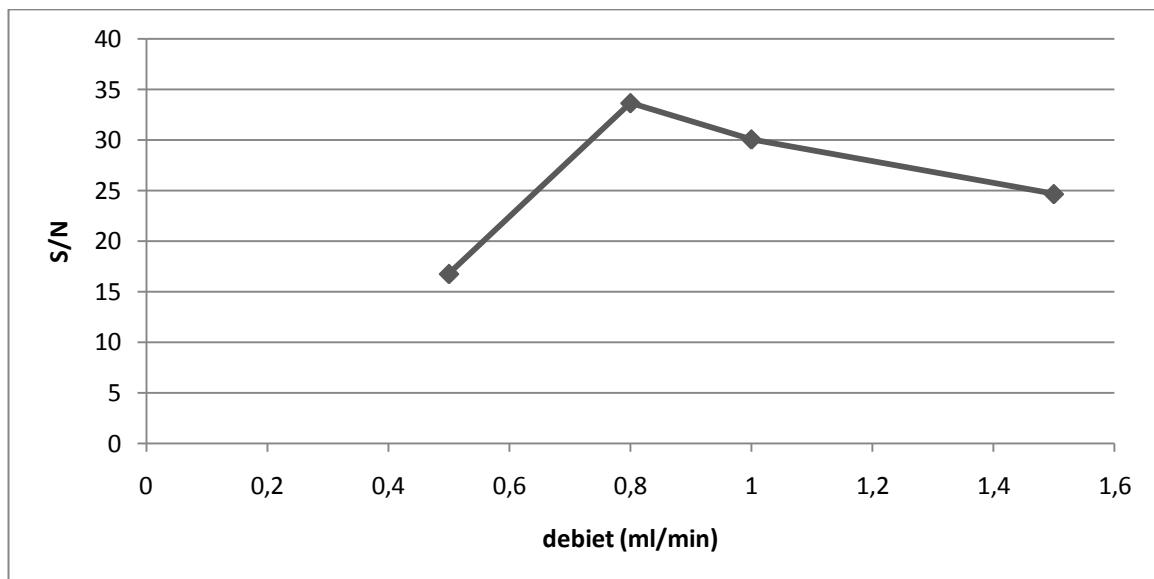
Bij de keuze van het ABTS^{•+} debiet moet er rekening gehouden worden met verschillende zaken zoals de tegendruk, de ruishoogte en het signaal. Uit eerste experimenten werden er resultaten bekomen met een ABTS^{•+} oplossing van 0.0066 g/L (13 µM). Met deze concentratie werd er dan ook vertrokken om de invloed van de verschillende debieten te testen. Er werden 4 verschillende ABTS^{•+} debieten getest namelijk 1,5 ml/min, 1 ml/min, 0,8 ml/min en 0,5 ml/min. Bij gebruik van 2 ml/min ABTS^{•+} oplossing werd een te hoge tegendruk gegenereerd met het ontstaan van lekken als gevolg. Een typisch bekomen chromatogram wordt getoond in Figuur IV.7.



Figuur IV.7: Analyse van 3,4-dihydroxybenzoëzuur (1), catechine (2), cafeïnezuur (3) en acetofenon (4). (a) is een contaminatiepiek afkomstig van één van de standaarden. Het bovenste chromatogram toont het UV signaal van de gedetecteerde polyfenolen. Het onderste chromatogram toont het overeenkomstig ABTS^{•+} signaal waarbij de ABTS concentratie 13 μ M was en het debiet 1 ml/min.

Het bovenste chromatogram van Figuur IV.7 geeft de scheiding weer van de 4 componenten, gedetecteerd door de eerste UV-detector. Het onderste chromatogram geeft het ABTS^{•+} signaal weer. Elke negatieve piek in het onderste chromatogram correspondeert met een antioxidant die een korte tijd ervoor in het bovenste chromatogram werd gedetecteerd. Deze tijd t_{ao} correspondeert met de tijd die het ABTS^{•+} en polyfenol mengsel nodig heeft om door te reageren te lopen en gedetecteerd te worden door de tweede UV-detector. In het bovenste chromatogram is er een degradatieproduct (piek a) zichtbaar dat afkomstig is van 3,4-dihydroxybenzoëzuur en ook antioxidant-activiteit vertoont.

Figuur IV.8 toont de invloed van het debiet op de S/N van cafeïnezuur. Elke analyse werd in triplicaat uitgevoerd.

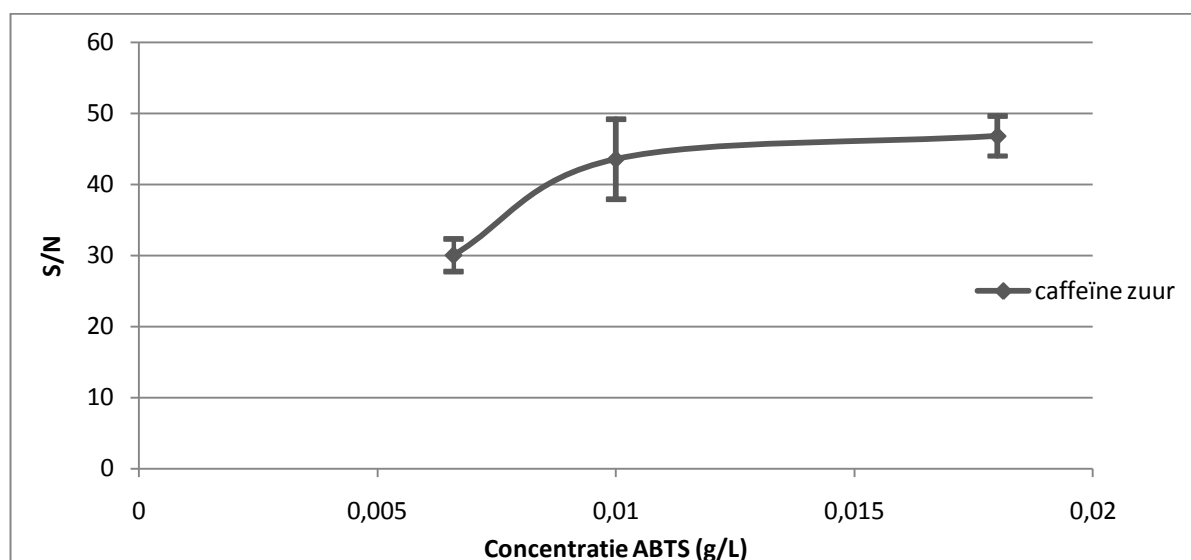


Figuur IV.8: Debietoptimalisatie voor cafeïnezuur.

De andere twee antioxidanten vertoonden vergelijkbare resultaten. Uit dit deel van de optimalisatie kan besloten worden dat bij een debiet van 0,8 ml/min ABTS^{•+} oplossing, de beste resultaten bekomen worden. Merk op dat deze optimalisatie enkel geldt voor een kolomdebiet van 0,5 ml/min.

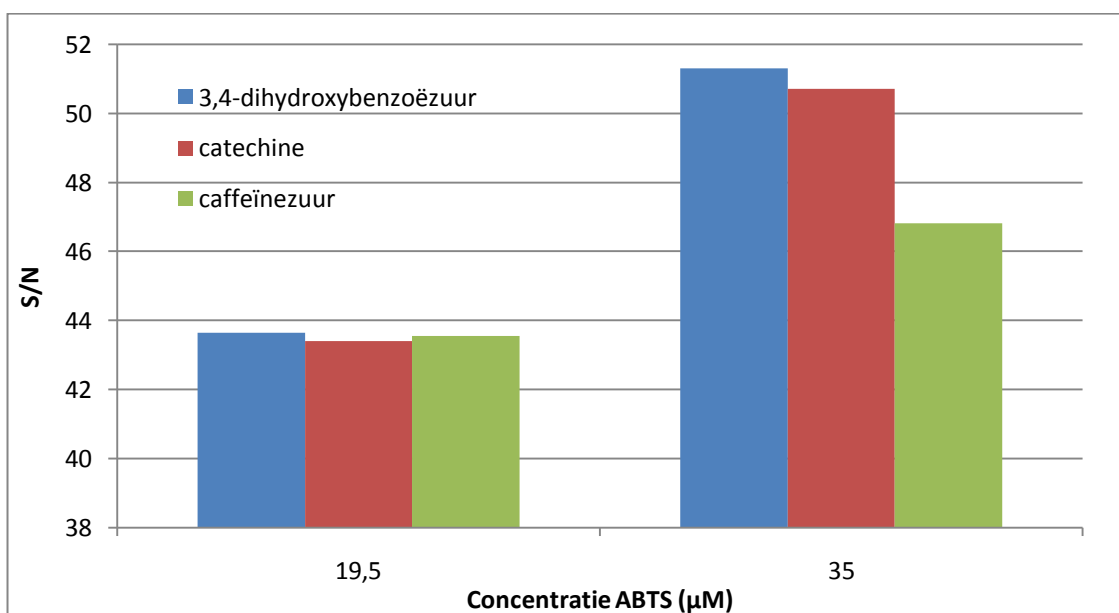
3.3.2 Studie van de invloed van de ABTS-concentratie op het signaal

De absorptie van ABTS^{•+} door een UV detector hangt af van de concentratie aan dit radicaal in de oplossing. De concentratie aan radicaal heeft echter ook een invloed op het ruisniveau en dus ook op de detectielimiet (zie §3.7). De verschillende initieel toegevoegde ABTS concentraties bedroegen 0,0066 g/L; 0,01 g/L en 0,018 g/L, dat is respectievelijk 13 µM, 19.5 µM en 35 µM. De verschillende concentraties werden getest bij een ABTS^{•+} debiet van 1 ml/min.



Figuur IV.9: De S/N waarde van cafeïnezuur uitgezet t.o.v de verschillende concentraties aan initieel ABTS.

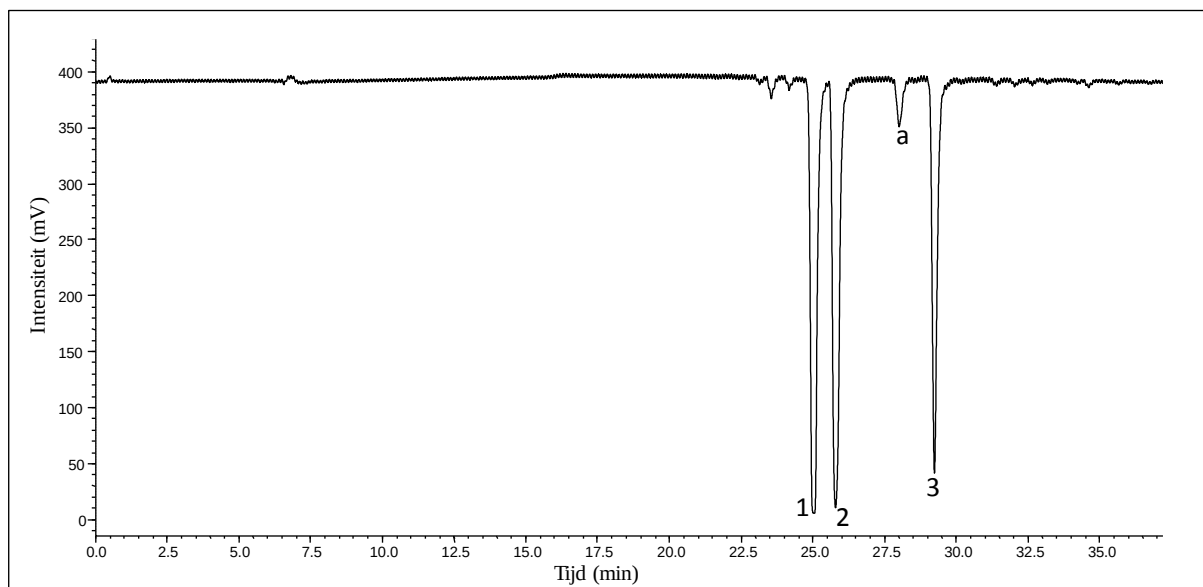
Figuur IV.9 geeft de invloed weer van de concentratie op de S/N van het polyfenol cafeïnezuur. Elke analyse werd in triplicaat uitgevoerd wat toeliet om de foutenvlaggen uit te zetten. Een vergelijkbaar verloop werd gevonden voor de andere twee polyfenolen. Er kan besloten worden dat de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing met initiële concentratie $35 \mu\text{M}$ het beste resultaat geeft. Bovendien blijkt uit Figuur IV.10 dat er bij een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ concentratie van $19,5 \mu\text{M}$ er dezelfde signaal tot ruis verhouding bekomen wordt voor de drie polyfenolen. Bij het uitvoeren van de analyse met $35 \mu\text{M}$ ABTS oplossing bleek er echter wel een verschil in activiteit te zijn tussen de 3 polyfenolen.



Figuur IV.10: De S/N waarden worden uitgezet voor elke polyfenol bij een bepaalde initiële concentratie aan ABTS.

Dit kan verklaard worden door het chromatogram van een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ signaal van $19,5 \mu\text{M}$ (Figuur IV.7) te vergelijken met het chromatogram van een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ signaal van $35 \mu\text{M}$ (Figuur IV.11). Het blijkt dat bij gebruik van lage concentraties ABTS, er gemakkelijk saturatie van het negatieve signaal optreedt. Dit kan gerelateerd worden aan het volledig wegreageren van het beschikbare vrije radicaal. Bij gebruik van een hoge concentratie ABTS is de detector meer in staat om de antioxidant-activiteit van verschillende moleculen te differentieren.

Bovendien is de S/N verhouding bij $35 \mu\text{M}$ ABTS voor elke getest polyfenol hoger dan bij $19,5 \mu\text{M}$. De radicaaloplossing wordt daarom het best gemaakt met 0.018 g/l ABTS aangezien deze test de beste S/N verhoudingen geeft en een groter verschil in activiteit weergeeft tussen de geteste antioxidanten.



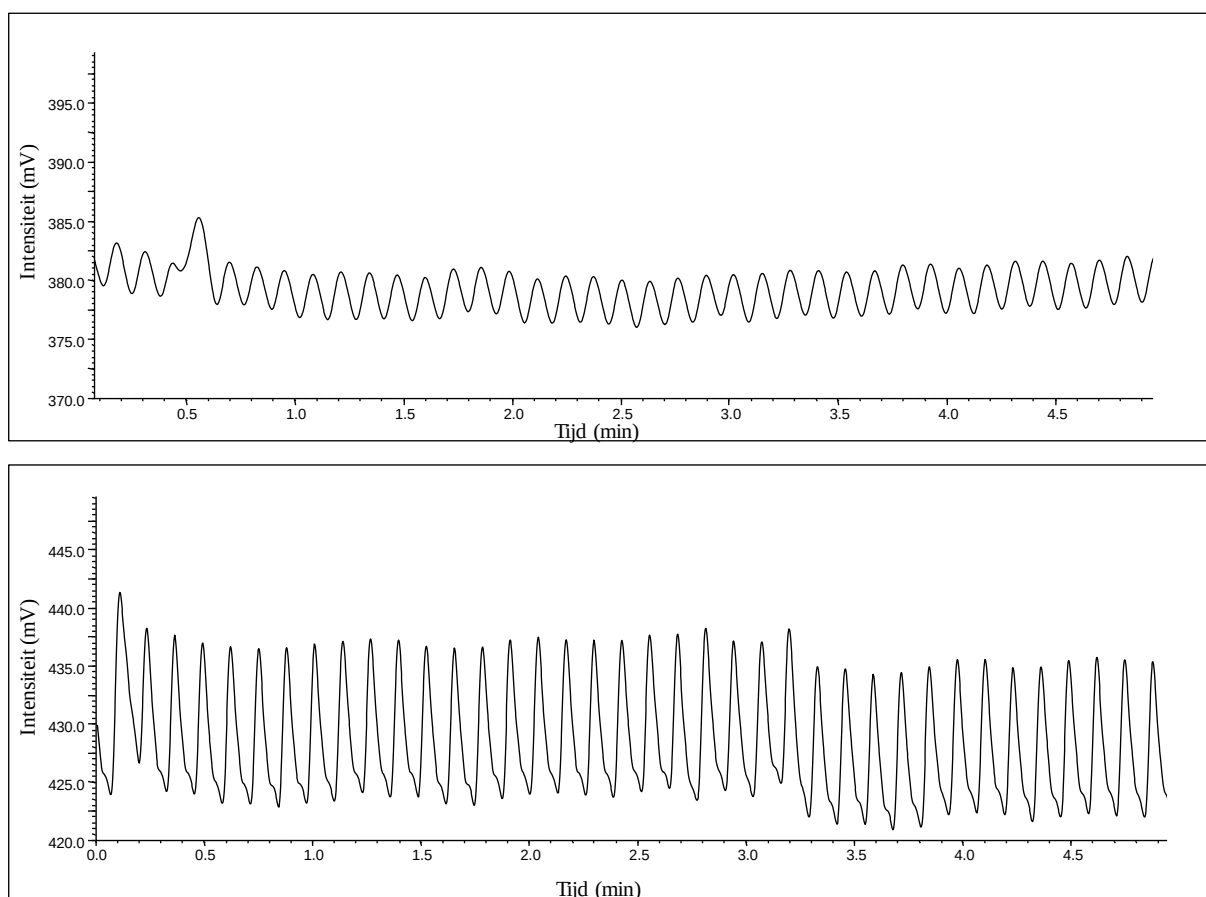
Figuur IV.11: Het $\text{ABTS}^{\bullet+}$ signaal van 3,4-dihydroxybenzoëzuur (1), catechine (2) en cafeïnezuur (3). Er is duidelijk een verschil zichtbaar in signaalsterkte van de drie pieken.

3.3.3 Studie van de reactordimensies

Er wordt nagegaan of de reactordimensies ook een invloed hebben op de gevoeligheid van dit systeem om antioxidantactiviteit op te pikken. Dit werd wederom geïnterpreteerd als de invloed op de grootte van de S/N verhouding van de reactor. De lengte en de inwendige diameter bepalen o.a. de looptijd door de reactor van het reactiemensel ($\text{ABTS}^{\bullet+}$ en polyfenolen). Bij eenzelfde debiet zal een kleinere inwendige diameter immers een kortere looptijd veroorzaken als de lengte van de reactor niet wordt aangepast. De looptijd moet

steeds lang genoeg zijn zodat de volledige reactie tussen de antioxidanten en de radicaaloplossing volledig kan plaatsvinden.

De reactor waarbij de optimalisatie tot op dit stadium heeft plaatsgevonden, had een inwendige diameter van 0,25 mm en was 2,8 m lang. Er werd gepoogd om een nieuwe reactor te maken van dezelfde lengte maar met een kleinere inwendige diameter namelijk 0,17 mm. Deze leidde echter tot een te hoge tegendruk waardoor de lengte gelimiteerd werd tot 1,4 m. De ruis die bekomen werd met deze aangepaste reactordimensies was echter veel hoger zoals te zien is in Figuur IV.12. Het is niet geheel duidelijk wat hier de oorzaak van is. Het kan te wijten zijn aan een overgang van een lineair naar een turbulent stroomprofiel of de pomp heeft problemen bij hogere tegendrukken of door het moeilijk mengen van de twee debieten (kolomdebiet en ABTS^{•+} debiet) onder deze omstandigheden.

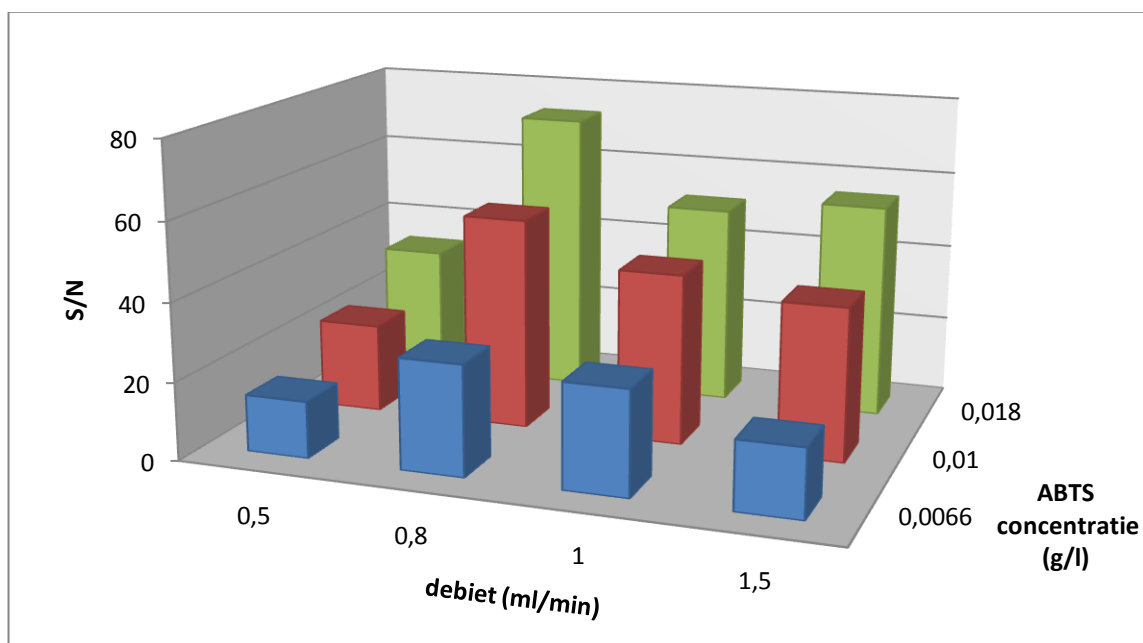


Figuur IV.12: De ruis van de twee geteste reactoren. Het bovenste chromatogram werd gevormd met een reactor van 2,8 m met interne diameter 0,25 mm. Het onderste chromatogram geeft de ruis weer gevormd door de reactor van 1,4 m met een interne diameter van 0,17 mm.

Door de nefaste impact op de resulterende S/N verhouding werd er verkozen om de initiële reactor te behouden.

3.3.4 Controle van de optimalisatie

Na optimalisatie van de individuele factoren werd er ook gecontroleerd of de gecombineerde omstandigheden inderdaad het beste resultaat geven. Hiervoor werden de vier verschillende debieten van de radicaaloplossing gelopen bij de drie verschillende ABTS concentraties. De resulterende gevoeligheid van de detector onder de verschillende omstandigheden werd uitgezet in Figuur IV.13.



Figuur IV.13: De S/N van 3,4-dihydroxybenzoëzuur uitgezet t.o.v. de verschillende debieten en de verschillende concentraties aan initieel ABTS.

Hieruit blijkt dat de ideale ABTS-test voor 3,4-dihydroxybenzoëzuur bestaat uit een ABTS concentratie van 35 μ M bij een debiet van 0,8 ml/min bij gebruik van een reactor met dimensies van 0,25 mm interne diameter en 2,4 meter lengte.

3.4 De detectielimiet

Er kan verwacht worden dat biologische mengsels heel wat antioxidanten in lage concentratie bevatten. Daarom is het belangrijk om ook de detectielimiet (Limit of Detection, LOD) van het geoptimaliseerd ABTS^{•+} systeem te bepalen. De detectielimiet wordt gedefinieerd als de concentratie die overeenkomt met een drievoud van de standaardafwijking op het signaal. Bij een meting waarbij het signaal boven de LOD ligt, is er een 95% kans dat dit signaal beduidend is.

Er werden drie verschillende monsters gemaakt met elk een andere hoeveelheid standaard erin. Uiteindelijk werd er gevonden dat het monster dat 1 µg/ml van 3,4-dihydroxybenzoëzuur en catechine en 500 ng/ml van cafeïnezuur bevatte, overeenkwam met signalen met een grootte van ongeveer drie maal de ruis. Zeven monsters werden geanalyseerd en het gemiddelde en de standaarddeviatie werd bepaald. Met behulp van een ezelsbruggetje kan de standaarddeviatie omgezet worden in concentratie.

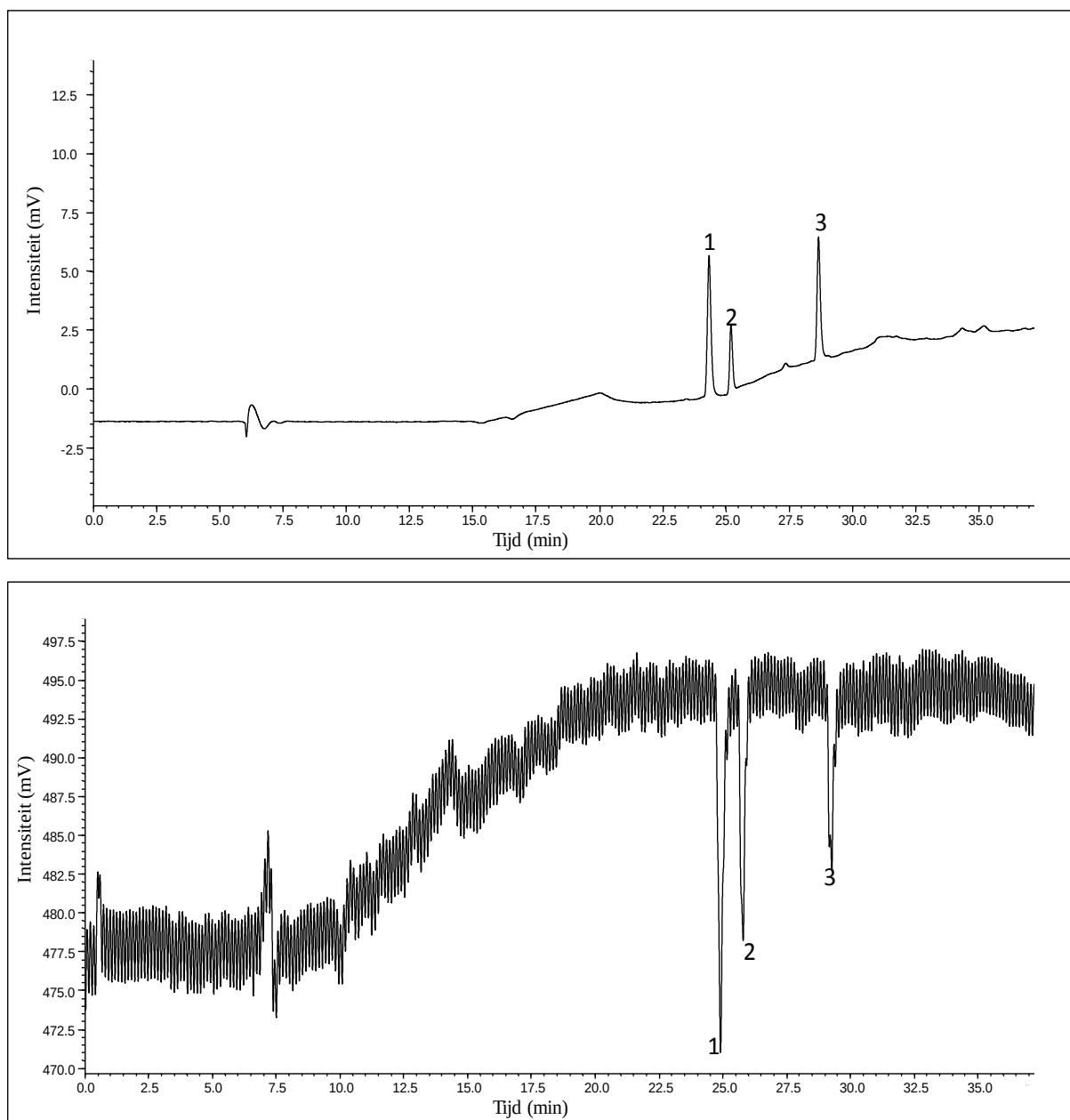
Voor het bepalen van de detectielimiet werd er een licht aangepaste analyse uitgevoerd. Er werd een gradiëntanalyse gelopen met een initiële samenstelling van 4% methanol en 96% water dat werd aangehouden voor 8 minuten. Vervolgens veranderde de samenstelling lineair over 29 minuten (i.p.v.32) naar een samenstelling van 90% methanol en 10% water. Een voorbeeld van een bekomen chromatogram wordt weergegeven in Figuur IV.14.

Er werd berekend (Tabel IV-1) dat de detectielimiet van 3,4-dihydroxybenzoëzuur 249 ng/ml bedroeg. Voor catechine en cafeïnezuur werd er uiteindelijk een detectielimiet gevonden van respectievelijk 278 ng/ml en 389 ng/ml.

Naam	Concentratie (ng/ml)	gemiddelde intensiteit (mV)	<u>Concentratie intensiteit</u>	3*σ	LOD (ng/ml)
3,4 dihydroxybenzoëzuur	1000	19,75	50,63	4,92	249,12
catechine	1000	14,74	67,84	4,10	278,32
cafeïnezuur	500	12,78	39,12	9,96	389,46

Tabel IV-1: Berekening van de detectielimieten voor drie polyfenolen.

Merk op dat zowel de detectielimiet bepaald werd voor een flavonoïde (catechine) en voor niet-flavononoïden (cafeïnezuur en 3,4 dihydroxybenzoëzuur). Hoewel deze drie polyfenolen niet representatief zijn voor de talrijke andere polyfenolen geven ze toch een duiding aan van een algemene detectielimiet.



Figuur IV.14 De bepaling van de detectielimiet. Het bovenste chromatogram toont de detectie van de polyfenolen bij 280 nm. Het onderste chromatogram, waarbij de detectielimiet bepaald werd, toont het overeenkomstig ABTS signaal. 3,4-dihydroxybenzoëzuur (1), catechine (2) en cafeïnezuur (3).

3.5 Resultaten van de optimalisatie

Na de optimalisatie van hoger beschreven parameters werd voor het vervolg van het werk volgende ABTS-testcondities gebruikt. Bij de PBS-buffer werd er 35 μM ABTS toegevoegd dat werd omgezet door 23 mM MnO_2 in een $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing. Na 10 minuten werd MnO_2 verwijderd door filtering. Bij de post-kolom reactie werd de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ oplossing met een debiet van 0,8 ml/min toegevoegd aan de eluerende LC flow (0,5 ml)/min. Dit gecombineerd debiet werd zo door een reactor met een lengte van 2,8 m en 0,25 mm interne diameter gestuurd. Het $\text{ABTS}^{\bullet+}$ signaal werd gedetecteerd door een UV-detector bij 414 nm. Het toepassen van deze test leverde de beste resultaten voor de detectie van antioxidanten.

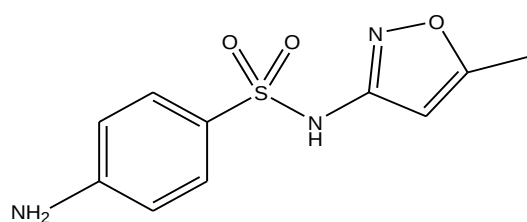
4 Bepaling van de antioxidant-activiteit van een aantal componenten

In dit werk werd er naast het gebruik van TROLOX of van de FRAP test zoals beschreven in het theoretisch gedeelte, naar een alternatieve en meer universele methode gezocht om antioxidant-activiteit van een component te bepalen. Dit zou inhouden dat er geen kalibratiecurves meer moeten opgesteld worden en dat de activiteit van de verschillende moleculen als het ware direct kan afgelezen worden uit het chromatogram. Met behulp van de universele “Charged Aerosol Detector” (CAD) kan in principe met behulp van debietcompensatie nagegaan worden wat de concentratie van een molecule is zonder dat er daarvoor een standaard voor handen moet zijn. Het negatief signaal van de antioxidantreactor geeft een indicatie van de antioxidant-activiteit. De verhouding van die twee signalen (het CAD signaal en de ABTS signaal) zou dus een onafhankelijke antioxidantschaal moeten opleveren.

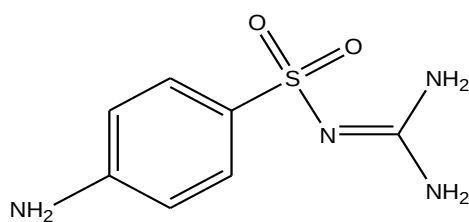
4.1 Experimentele condities

De solventen methanol en water (beide LC-MS kwaliteit) waren afkomstig van Biosolve (Valkenswaard, Nederland). Sulfoguanidine, sulfomethoxazole, sulfamerazine en de polyfenolen catechine, epicatechine en luteoline waren afkomstig van Sigma (Sigma-Aldrich, Bornem, België). Enkele structuren worden weergegeven in Figuren IV.15-18

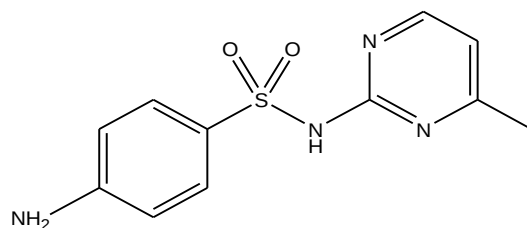
Van elk van deze zes componenten werd een geconcentreerde oplossing gemaakt van 1 mg/ml.



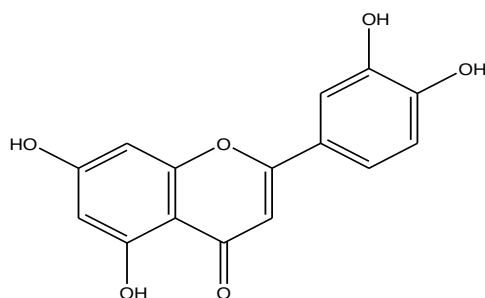
Figuur IV.15 : Sulfamethoxazole.



Figuur IV.16: Sulfoguanidine.



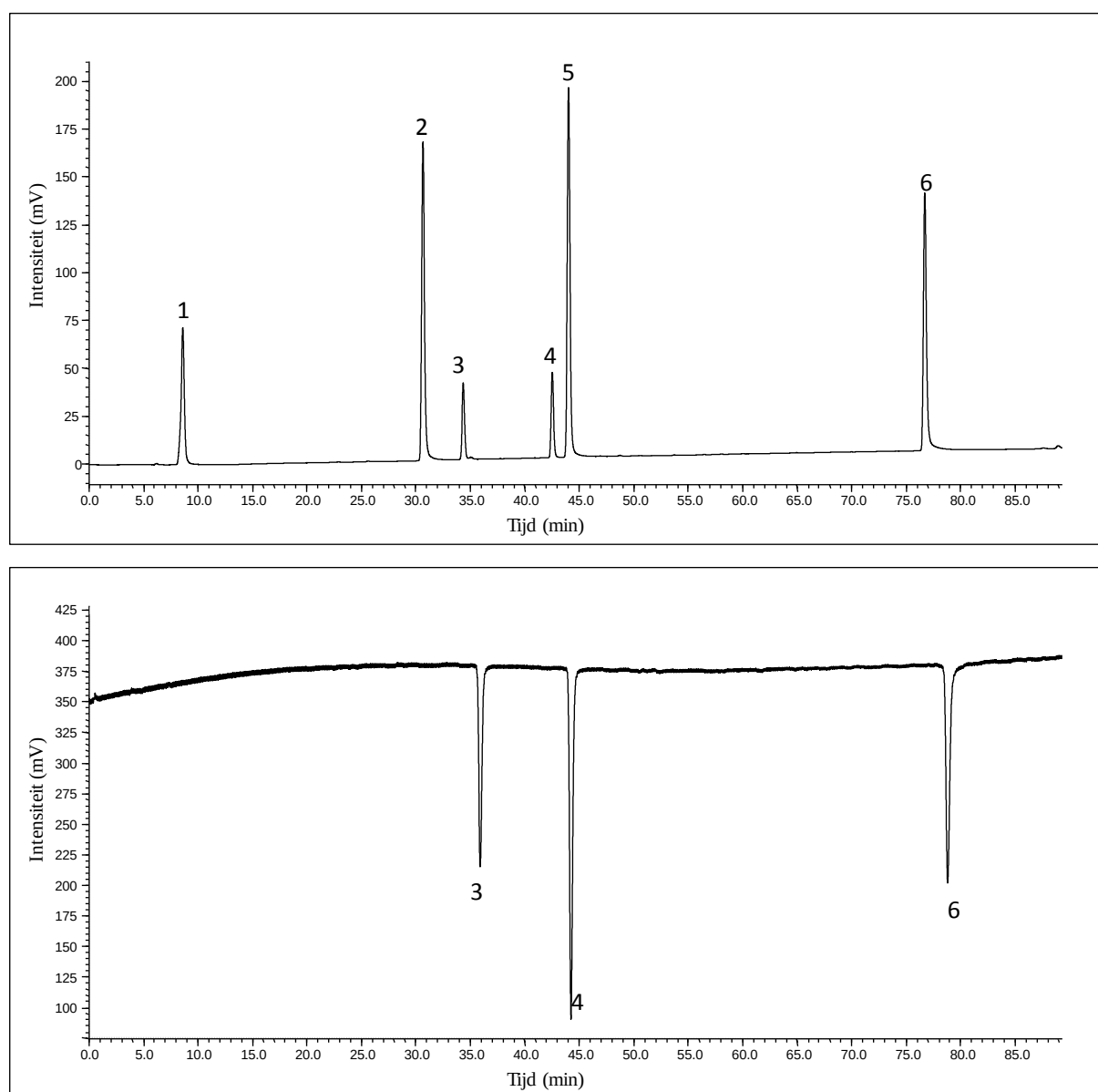
Figuur IV.17 :Sulfamerazine.



Figuur IV.18: Luteoline.

Uit de zes stockoplossingen werd er een monsteroplossing bereid bestaande uit 40/60 methanol/water die 50 µg/ml van elke standaard bevat. De analyse werd gelopen op een Luna C₁₈ kolom (250 mm, i.d. 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, USA). Er werd een gradiënt analyse uitgevoerd met initiële condities 10% methanol en 90% water. Dit werd aangehouden voor 5 minuten. Vervolgens werd er over 85 minuten naar een samenstelling gegaan van 80% methanol en 20% water. Het injectievolume bestond uit 10 µl.

De scheiding van de zes componenten en het bijhorend ABTS^{•+} signaal wordt weergegeven in Figuur IV.19.



Figuur IV.19: De scheiding van 3 polyfenolen en 3 sulfonamides. Het bovenste chromatogram heeft de detectie van de 6 standaarden weer. Het onderste chromatogram toont het overeenkomstig ABTS^{•+} signaal. De zes standaarden waren sulfoguanidine (1), sulfamerazine (2), catechine (3), epicatechine (4), sulfomethoxazole (5) en luteoline (6).

De drie polyfenolen, pieken 3-4-6 op Figuur IV.19, geven zoals verwacht een negatief signaal. De drie sulfonamidees geven geen negatief signaal in de tweede UV-detector wat aantoont dat de ABTS-test selectief antioxidanten detecteert. Hoewel het monster alle zes de standaarden in dezelfde hoeveelheid bevatte (50 µg/ml), waren de signalen in het eerste UV chromatogram niet even groot.

Dit kan verklaard worden door de wet van Lambert-Beer (vgl 13). Aangezien de extinctiecoëfficiënt voor bijna elke component verschillend is bij een bepaalde golflengte wordt een verschillende respons bekomen van de verschillende componenten bij dezelfde concentratie.

4.2 Bepaling van de concentratie met de charged aerosol detector

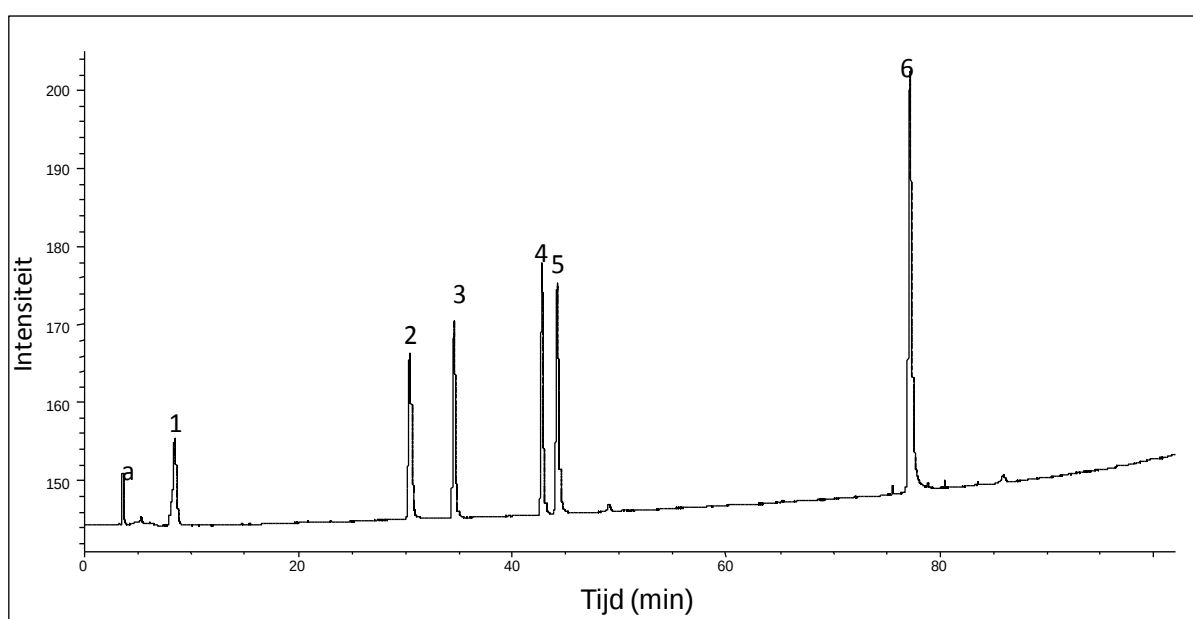
De concentratie kan eenduidig gedetecteerd worden met een universele detector. Deze detector is in staat om bijna elke component te meten. De CAD heeft als bijkomend voordeel dat componenten met dezelfde concentratie gedetecteerd worden als pieken met dezelfde oppervlakte (area) indien de mobiele fase samenstelling constant is. Na detectie van antioxidanten met de CAD en dus ook de bepaling van hun concentratie, kan deze concentratie gecorreleerd worden aan de antioxidant-activiteit als hetzelfde monster wordt gelopen onder dezelfde omstandigheden met de ABTS-test. In Figuur IV.20 wordt de analyse van de zes standaarden getoond met een CAD detector. De UV-detector en de CAD waren in serie gekoppeld waardoor de detectie van dezelfde piek in het CAD chromatogram enkele seconden later begon. Hieruit blijkt dat de CAD een veel meer homogene respons heeft in vergelijking met UV-detectie maar ook dat de respons toch sterk afhankelijk is van de mobiele fase samenstelling m.a.w. hoe hoger de organische solventconcentratie, hoe hoger het signaal.

4.2.1 Detectie met de CAD zonder debietcompensatie

Bij detectie van de zes standaarden zonder debietcompensatie, werden de resultaten van Tabel IV-2 bekomen. Zowel de oppervlakte van elk signaal als de genormaliseerde oppervlakte worden hierbij gegeven. Een stijging van de waarden in functie van de mobiele fase samenstelling is hierbij apparent (Figuur IV.20).

Component	Oppervlakte	% van totaal oppervlakte
sulfoguanidine	263.1	7.62
sulfamerazine	413.3	11.97
catechine	441.8	12.80
epicatechine	562.1	16.28
sulfomethoxazole	573.1	16.610
luteolinee	1197.2	34.696

Tabel IV-2: De totale en de relatieve oppervlaktes van de componenten gedetecteerd door een CAD.



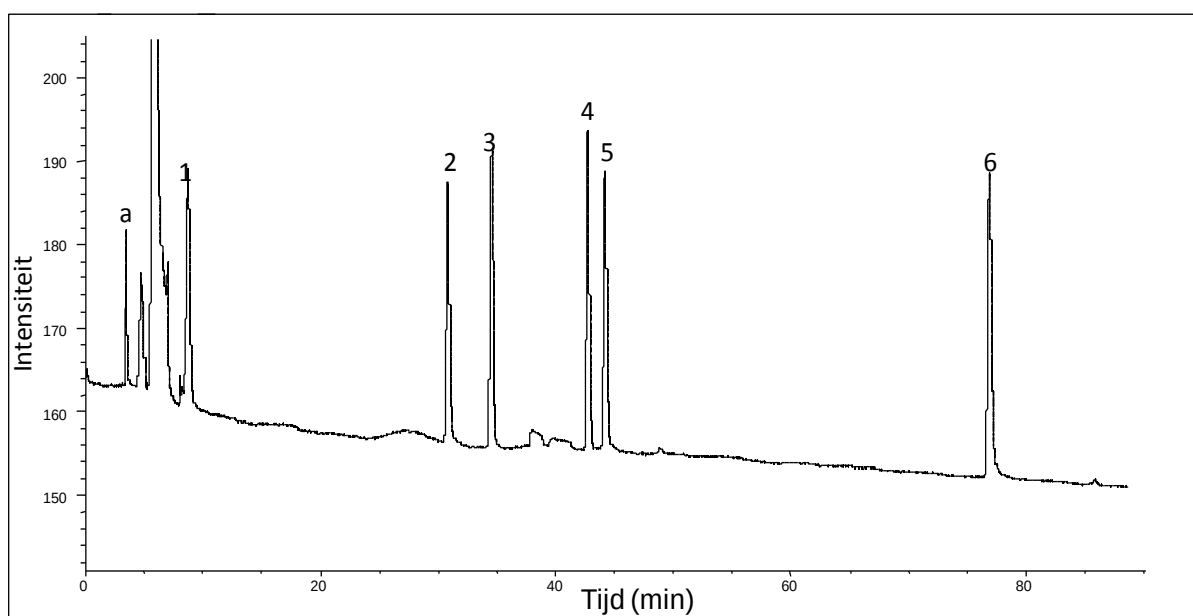
Figuur IV.20.: CAD chromatogram van de scheiding van sulfoguanidine (1), sulfamerazine (2), catechine (3), epicatechine (4), sulfomethoxazole (5) en luteoline (6).

4.2.2 Detectie met de CAD met toepassing van debietcompensatie

Indien er achter de scheidingskolom en voor de CAD een mobiele fase toegevoegd wordt die een volledig geïnverteerde gradiënt ondergaat, wordt er debietcompensatie bekomen. Figuur IV.21 geeft de analyse weer van de zes componenten onder deze condities met CAD-detectie. Tabel IV-3 toont de resulterende oppervlakte van de pieken.

Component	Oppervlakte	% van totaal oppervlakte
sulfoguanidine	640.3	15.07
sulfamerazine	631.9	14.87
catechine	641.8	15.10
epicatechine	690.5	16.25
sulfomethoxazole	694.6	16.34
luteolinee	710.12	17.10

Table IV-3: De totale en relatieve oppervlaktes van de componenten gedetecteerd door een CAD.



Figuur IV.21: CAD detectie van de zes componenten met debietcompensatie: sulfoguanidine (1), sulfamerazine (2), catechine (3), epicatechine (4), sulfomethoxazole (5) en luteoline (6).

Het is duidelijk dat de waarden veel meer bij elkaar aansluiten en dat er dus een universele respons bekomen wordt. Bemerkt echter wel dat de basislijn een dalende trend vertoont en dat er een verstoring in het begin van de analyse optreedt (piek a).

Dit kan te wijten zijn aan de kwaliteit van de gebruikte solventen of een klein verschil in debiet van beide pompen. Noteer echter dat er gevoelig gemeten werd (circa 30 mAU).

5 Detectie van polyfenolen in wijn

In dit werk was het de bedoeling om de verschillende polyfenolen in natuurproducten te scheiden, te detecteren en te identificeren. De keuze werd gemaakt om de antioxidanten in wijn te analyseren omwille van de beschikbaarheid, expertise in het laboratorium en de uitgebreide literatuur over wijn. De geoptimaliseerde parameters werden gebruikt voor deze analyse. Het analytisch protocol bestaat uit volgende delen: een monstervoorbereidingsstap, detectie van de belangrijkste antioxidanten met hoge efficiëntie HPLC en identificatie van de belangrijkste antioxidanten door koppeling met hoge-resolutie-massaspectrometrie.

5.1 Experimentele condities

De polyfenolen rutin, quercetine en hesperidine waren afkomstig van Sigma-Aldrich (Bornem, België). De analyse werd uitgevoerd volgens een gradiënt elutie met initiële samenstelling van 4% methanol en 96% water. Dit werd aangehouden gedurende 12 minuten. Vervolgens werd de samenstelling lineair veranderd over 88 minuten naar 96% methanol en 4% water. Dit werd aangehouden gedurende 20 minuten. De analyse werd uitgevoerd op een Luna C18 kolom (250 mm, i.d. 4,6 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, USA)

De vergelijkende studie tussen de verschillende monstervoorbereidingen werd uitgevoerd met een Bourgueil wijn (Cabernet franx, Loirevallei, 2008)

De hoge efficiëntie analyses werden uitgevoerd met monsters van een Chateau l'Estelle wijn (Cabernet sauvignon Malbec Merlot, Bordeaux, 2008).

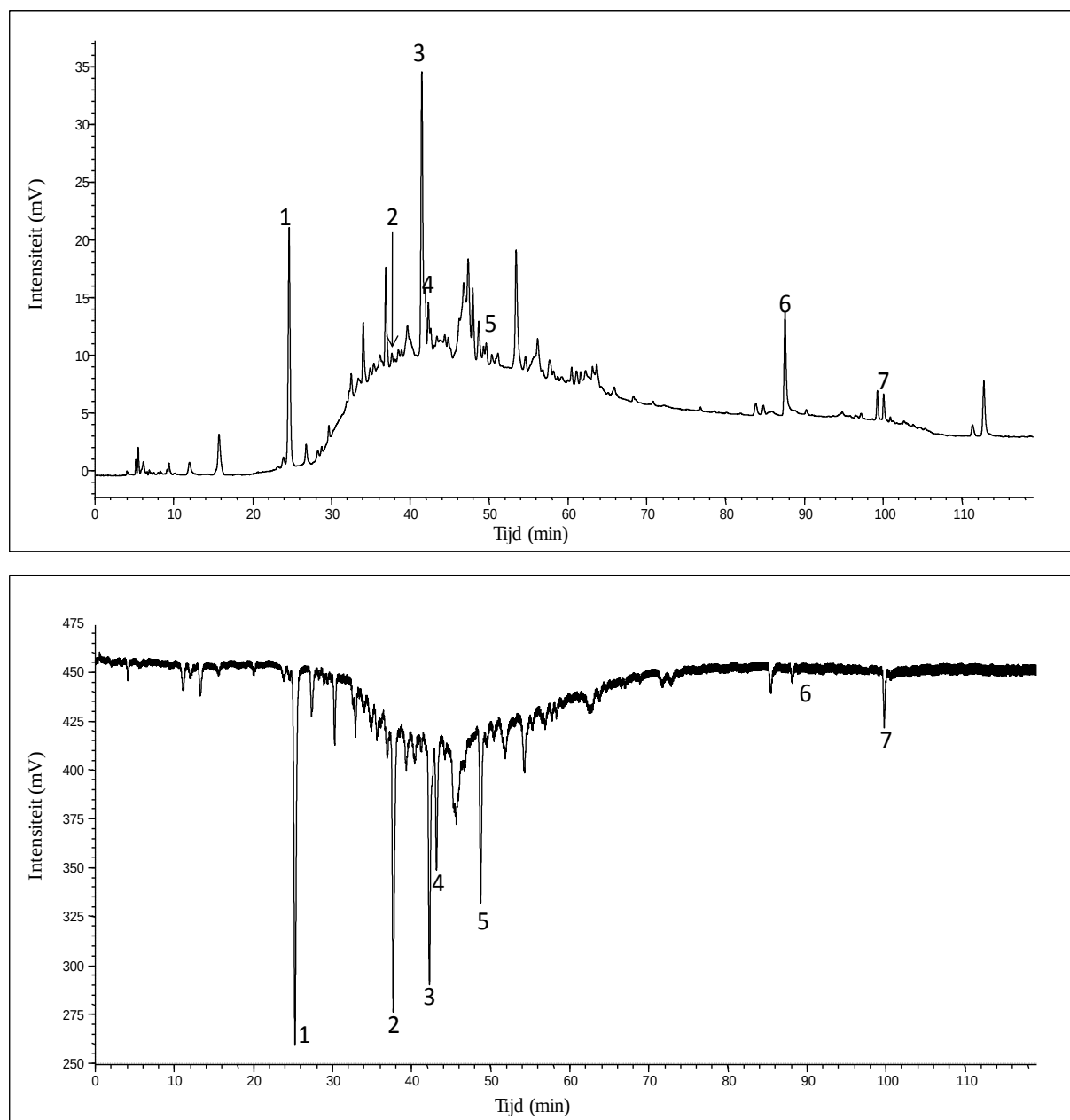
5.2 Monstervoorbereiding

Wijn is een complex mengsel met een 2000-tal componenten (Son, Hwang et al. 2009). Deze 2000 componenten, waarvan de meeste ontstaan tijdens het gistingsproces, komen meestal voor in lage concentraties behalve ethanol, water, suikers en de organische zuren. Om de polyfenolfraction aan te rijken werden er drie verschillende monstervoorbereidingen uitgetest.

5.2.1 Verdunning van wijn

Een eerste monstervoorbereiding bestond uit het verdunnen van de wijn prior injectie. 100 µl wijn werd aangelengd tot 1 ml met water. Vervolgens werd er 20 µl geïnjecteerd.

Figuur IV.22 toont het chromatogram bekomen bij 280 nm en het bijhorend chromatogram van het ABTS^{•+} signaal. Er werd bij 280 nm gedetecteerd omdat bekend is dat heel wat polyfenolen bij deze golflengte zichtbaar zijn.



Figuur IV.22: De detectie van polyfenolen in verdunde wijn. Het bovenste chromatogram toont de UV-detectie bij 280 nm. Het onderste chromatogram toont het overeenkomstig ABTS^{•+} signaal gedetecteerd bij 414 nm (wijn: Bourgueil).

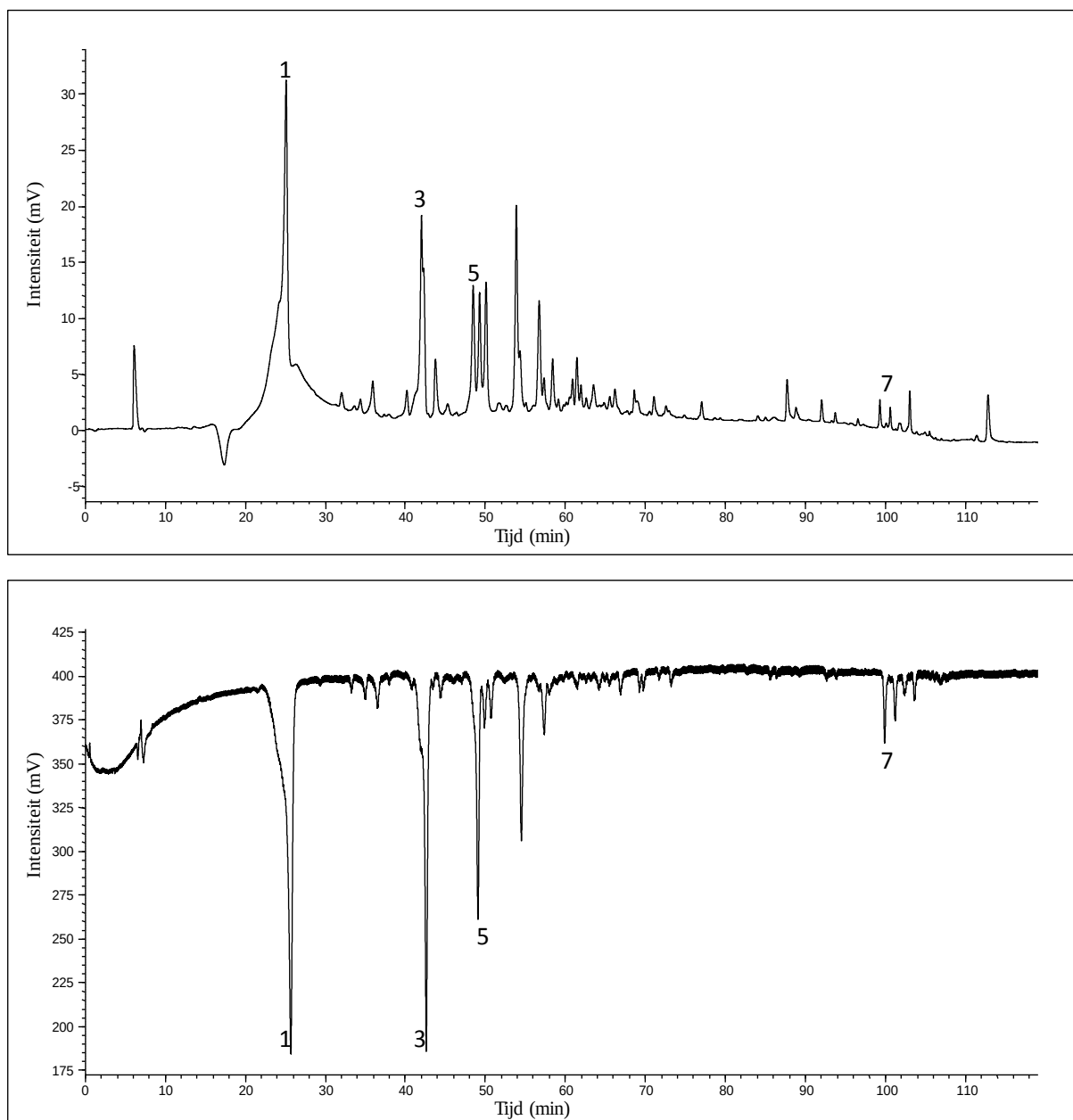
Figuur IV.22 toont enkele interessante resultaten. Zo vertonen piek 1 en piek 3 een grote intensiteit in het UV-chromatogram en ook een hoge intensiteit in het ABTS^{•+} signaal. De pieken 2, 4, 5 en 7 vertonen een kleine, bijna niet zichtbare intensiteit in het UV-chromatogram maar zijn wel duidelijk zichtbaar in het overeenkomstig ABTS^{•+} chromatogram. Deze componenten zijn dus mogelijks interessant in termen van antioxidant-activiteit. Piek 6 daarentegen wordt wel goed gedetecteerd in het 280 nm chromatogram maar vertoont bijna geen antioxidant-activiteit in het onderste chromatogram. Na de verdunning van wijn zien we dus duidelijk een scheiding van antioxidanten en toont het ABTS^{•+} chromatogram voor sommige antioxidanten een betere gevoeligheid dan het normaal UV-chromatogram.

In het bovenste chromatogram wordt echter de resolutie van de wijnanalyse verstoord door een langwerpige bult. De hoogste piek heeft immers een intensiteit van 35 mV en de langwerpige bult een intensiteit van 10 mV. Het is bekend uit literatuur dat deze bult een zeer complex mengsel van biopolymeren is. Deze polymeren danken hun ontstaan aan trage processen die plaatsvinden eenmaal de wijn gebotteld is. Ze worden verantwoordelijk geacht voor de zachtere smaak van oudere wijnen. Het valt op dat de volledige polymeerbult antioxidant-activiteit vertoont. Dit is niet echt verwonderlijk daar deze biopolymeren vooral bestaan uit polyfenoleenheden. In het kader van deze studie werd ervoor geopteerd om het onderzoek te richten naar de kleinere moleculen en werd dit polymeer verwijderd via extractie. Er werd dus gezocht naar een methode die ook de biopolymeren zoveel mogelijk verwijdt.

5.2.2 Vloeistof-vloeistofextractie

Vloeistof-vloeistofextractie (liquid-liquid extraction, LLE) werd gebruikt om de polyfenolen samen met de andere organische componenten te extraheren en te concentreren. Bij 3 ml wijn werd er 3 ml diethylether toegevoegd in een scheidtrechter. De organische fase werd gescheiden van de waterige fase. Bij de waterige fase werd opnieuw 3 ml diethylether toegevoegd en de organische fase werd weer gescheiden van de waterige fase. Deze procedure werd uiteindelijk vijf maal herhaald. De verzamelde organische fases werden met behulp van een rotavapor ingedampt en heropgelost in 1 ml methanol/water (50/50).

Figuur IV.23 toont een representatief chromatogram van de scheiding van polyfenolen na extractie. Dit chromatogram vertoont geen bult maar een beduidend aantal minder pieken in zowel het UV-sigitaal als in het ABTS^{•+} signaal.



Figuur IV.23: De scheiding van polyfenolen in wijn gedetecteerd in het bovenste chromatogram met UV-detector bij 280 nm en met de ABTS-test in het onderste chromatogram bij 414 nm. Het monster werd voorbereid met LLE (wijn: Bourgueil).

Zo zijn, vergeleken met Figuur IV.22, pieken 1, 3 en 7 ook zichtbaar in het UV-chromatogram en in het ABTS^{•+} chromatogram, maar zijn pieken 2,4 en 6 niet te zien.

Piek 5 daarentegen is dan wel weer duidelijker te zien in het UV-chromatogram met de LLE-methode. Aangezien deze pieken wel antioxidantwerking vertoonden in Figuur IV.22, is de gebruikte LLE niet de geschikte methode om zoveel mogelijk antioxidanten te extraheren uit wijn.

5.2.3 *Vaste-fase-extractie van wijn*

Voor de aanrijking van polyfenolen in wijn werd een styreendivinybenzeen cartridge (STRATA SDB-L) gebruikt. Het volgende gepubliceerd protocol werd uitgevoerd (De Villiers, Lynen et al. 2004):

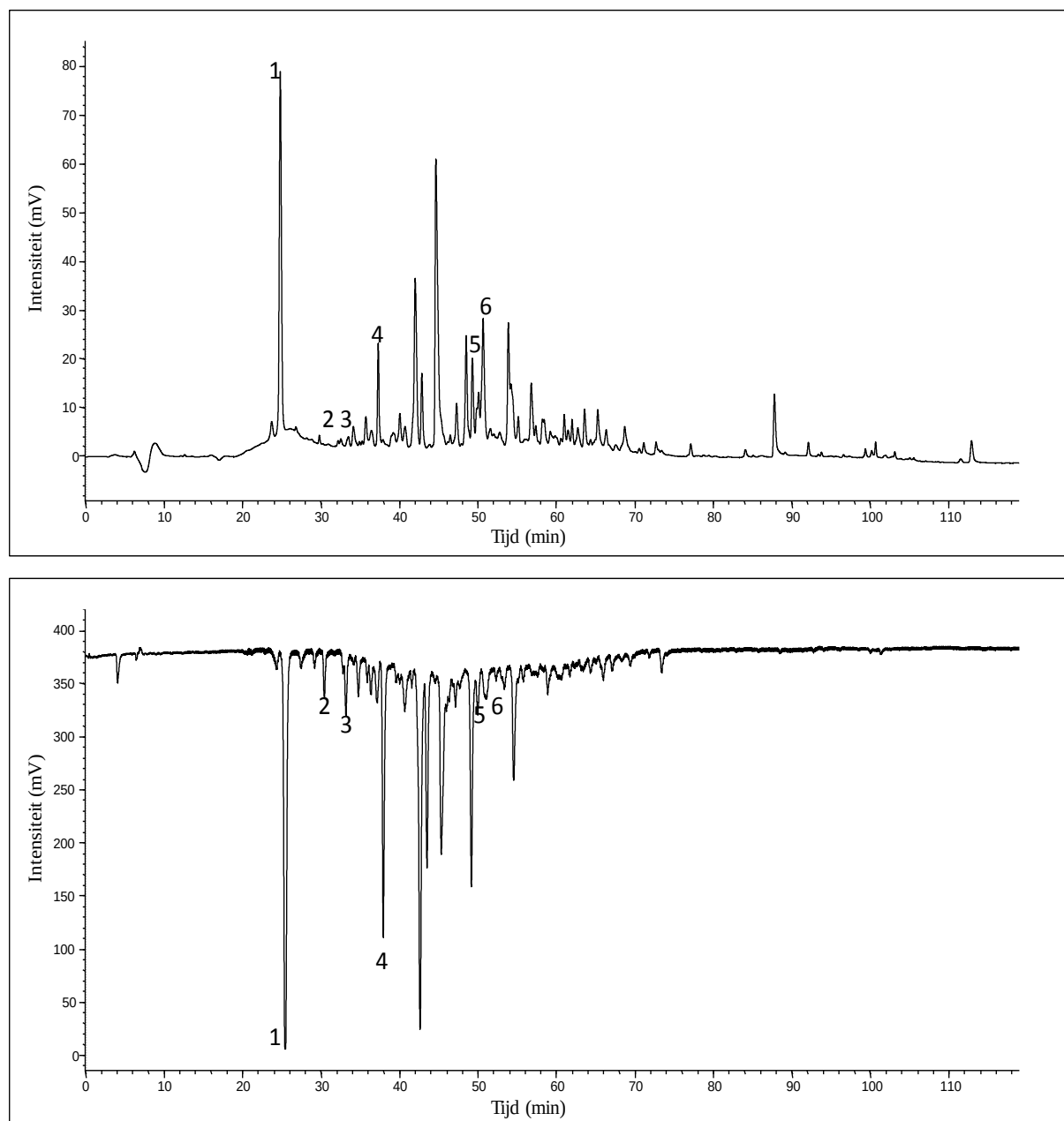
1. Conditioneren met 3 mL ethylacetaat en 3 mL methanol.
2. Equilibreren met 3 ml water (pH 2,5, aangepast met 1 M HCl).
3. Laden met wijn (pH 2,5, aangepast met 6 M HCl). Het laden gebeurde met 0,5-4 ml wijn, afhankelijk van de analyse.
4. Wassen met 4 x 1 mL 20 mM zwavelzuur om de suikers en organische zuren te verwijderen.
5. Elutie van de polyfenolen met 5 x 2 ml ethylacetaat.

Het eluaat van 10 mL werd ingedampt met behulp van een stikstofstroom en heropgelost in 1 mL methanol/water (50/50). Het laden van wijn werd getest met verschillende hoeveelheden.

Figuur IV.24 geeft een chromatogram weer van het zo behandelde wijnmonster opgenomen bij 280 nm. Hierbij werd er maar 0,5 ml wijn geladen. Het is echter duidelijk dat de SPE methode meer intense signalen oplevert in zowel het UV-chromatogram als in het ABTS^{•+} chromatogram vergeleken met de voorgaande methodes.

Ook hier kan er gezegd worden dat sommige pieken die amper zichtbaar zijn in het bovenste UV-chromatogram, een veel intenser signaal geven in het ABTS^{•+} chromatogram (pieken 2-3-4). Pieken met intense signalen in het bovenste UV-chromatogram vertonen zowel intense signalen in het onderste ABTS^{•+} chromatogram (piek 1) als geen signaal (pieken 5-6). Dit wijst er op dat de ABTS-test wel degelijk een onderscheid kan maken tussen de activiteit van antioxidanten en ook kan bepalen welk component al dan niet antioxidant is. De studie van deze competitieve aspecten van de verschillende componenten in de ABTS^{•+} reactor dringt zich daarom erg op. Binnen het tijdsbestek van deze thesis kon er hier echter niet dieper op ingegaan worden.

De bult van het biopolymeer in wijn was niet meer zichtbaar bij SPE als het geladen wijnvolume onder 1,5 ml blijft. Bij een hoger laadvolume brak de wijn door (breakthrough volume) en was de prefractionering niet succesvol.



Figuur IV.24: De scheiding van polyfenolen in wijn gedetecteerd in het bovenste chromatogram met UV-detector bij 280 nm en met de ABTS-test in het onderste chromatogram bij 414 nm. Het monster werd voorbereid met SPE (wijn: Bourgueil).

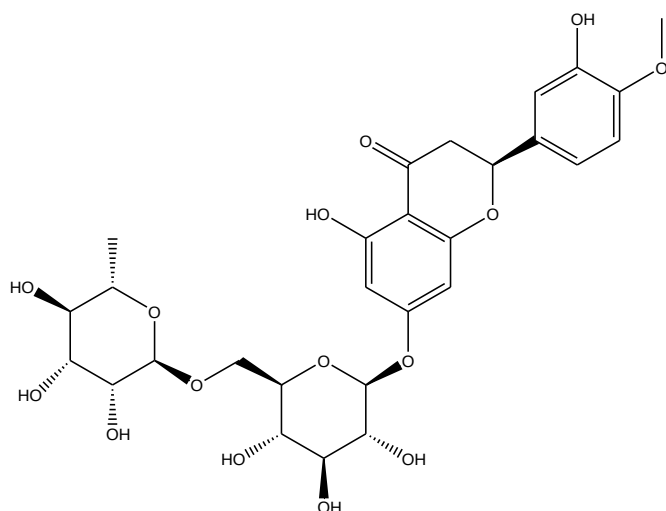
5.3 Hoog-efficiëntie analyse van antioxidanten in wijn

Om de resolutie van het wijnchromatogram te verbeteren werden er meerdere kolommen aan elkaar gekoppeld om zo de resolutie van de scheiding te verhogen.

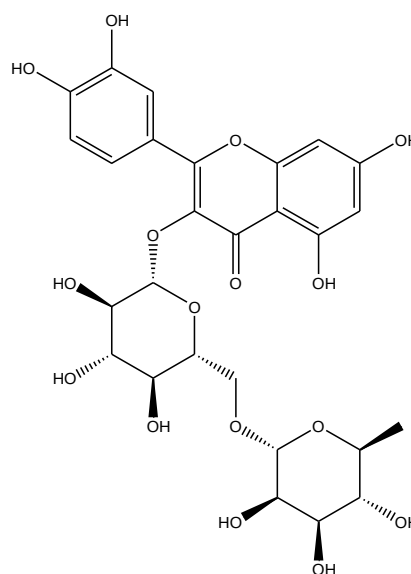
Om de resolutie (Vgl 9) te verdubbelen moet het aantal platen verviervoudigen als de andere parameters niet veranderen. Om het aantal platen te verviervoudigen moeten er vier kolommen gekoppeld worden aan elkaar. Een verlenging van de kolom levert echter ook meer tegendruk op. Om de tegendruk te verlagen, kan de temperatuur van de mobiele fase en de kolom verhoogd worden. Hierdoor zal de viscositeit van de mobiele fase en dus de tegendruk verlagen.

5.3.1 De thermostabiliteit van polyfenolen

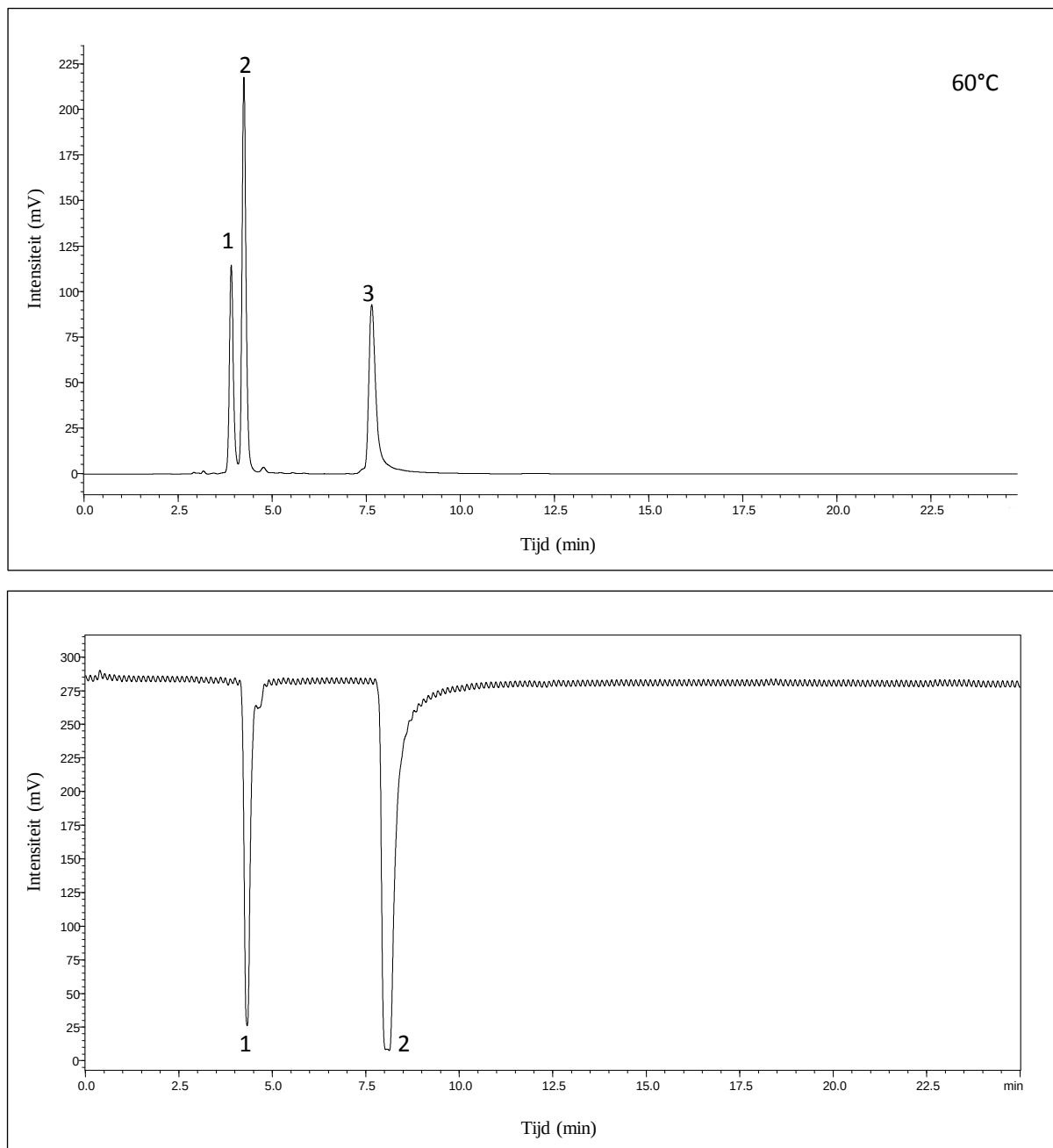
Een verhoogde temperatuur tijdens de polyfenolanalyse kan een invloed hebben op de reactie die plaatsgrijpt in de ABTS-reactor. Dit werd nagegaan door de analyse van de drie polyfenolen namelijk hesperidine, rutine en quercetine bij kamertemperatuur en bij een temperatuur van 60°C. De structuren van hesperidine en rutine worden weergegeven in figuren IV.25 en 26. Daarvoor werd er een analyse gelopen op een Luna C18 kolom (250 mm, i.d. 4,6 mm, 5µm; Phenomenex, Torrance, USA). Er werd een gradiëntanalyse uitgevoerd waarbij de mobiele fase een initiële samenstelling had van 45% methanol en 55% water. Dit werd aangehouden voor drie minuten waarna er lineair werd overgegaan naar een samenstelling van 58% methanol en 42% water over een periode van 25 minuten. De bekomen resultaten worden weergegeven voor 60°C in Figuur IV.27 en voor 25°C in Figuur IV.28.



Figuur IV.25: Hesperidine.

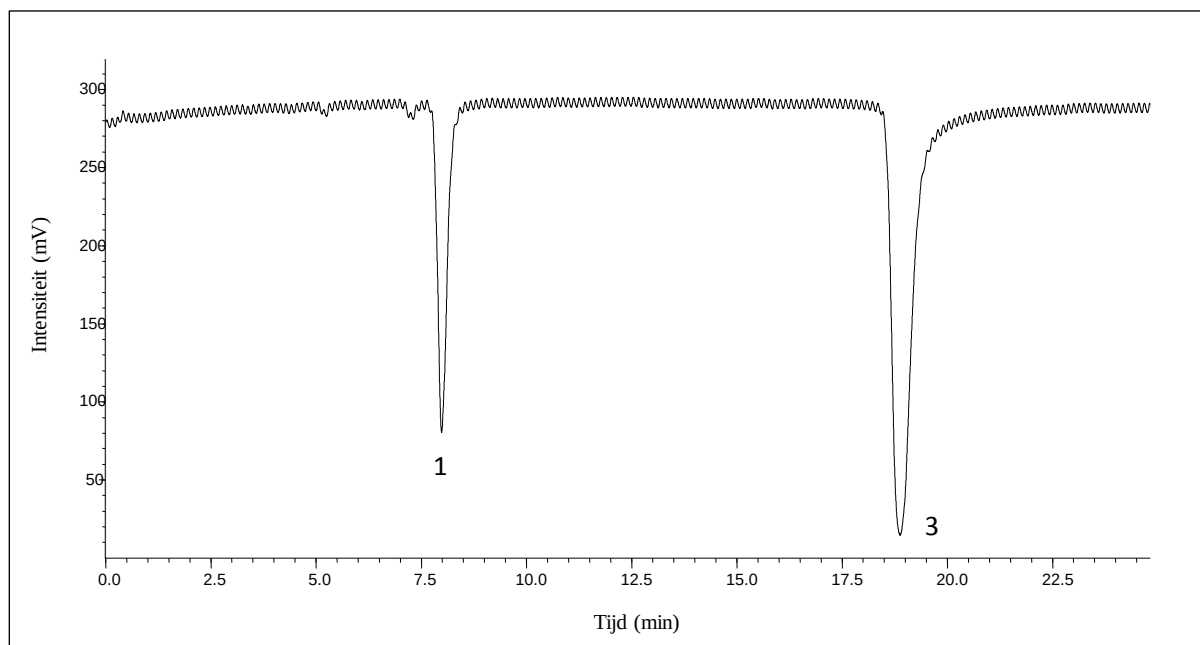


Figuur IV.26: Rutine.



Figuur IV.27: De thermostabiliteit van de polyfenolen en de ABTS^{•+} reactie. Identificatie: quercetine (1), rutine (2) en hesperidine (3).

De drie geteste polyfenolen toonden geen degradatie bij analyses bij hogere temperatuur. Uit ervaring is wel gebleken dat niet elke polyfenol stabiel is bij hogere temperaturen. Degradatie van een polyfenol veroorzaakt een minder intens signaal in het UV-chromatogram en kan bijkomende signalen genereren in het ABTS^{•+} chromatogram afkomstig van de degradatieproducten. Hierdoor wordt de antioxidant-activiteit van het polyfenol onderschat en worden er producten gedetecteerd en geïdentificeerd die oorspronkelijk niet in het natuurproduct aanwezig waren.



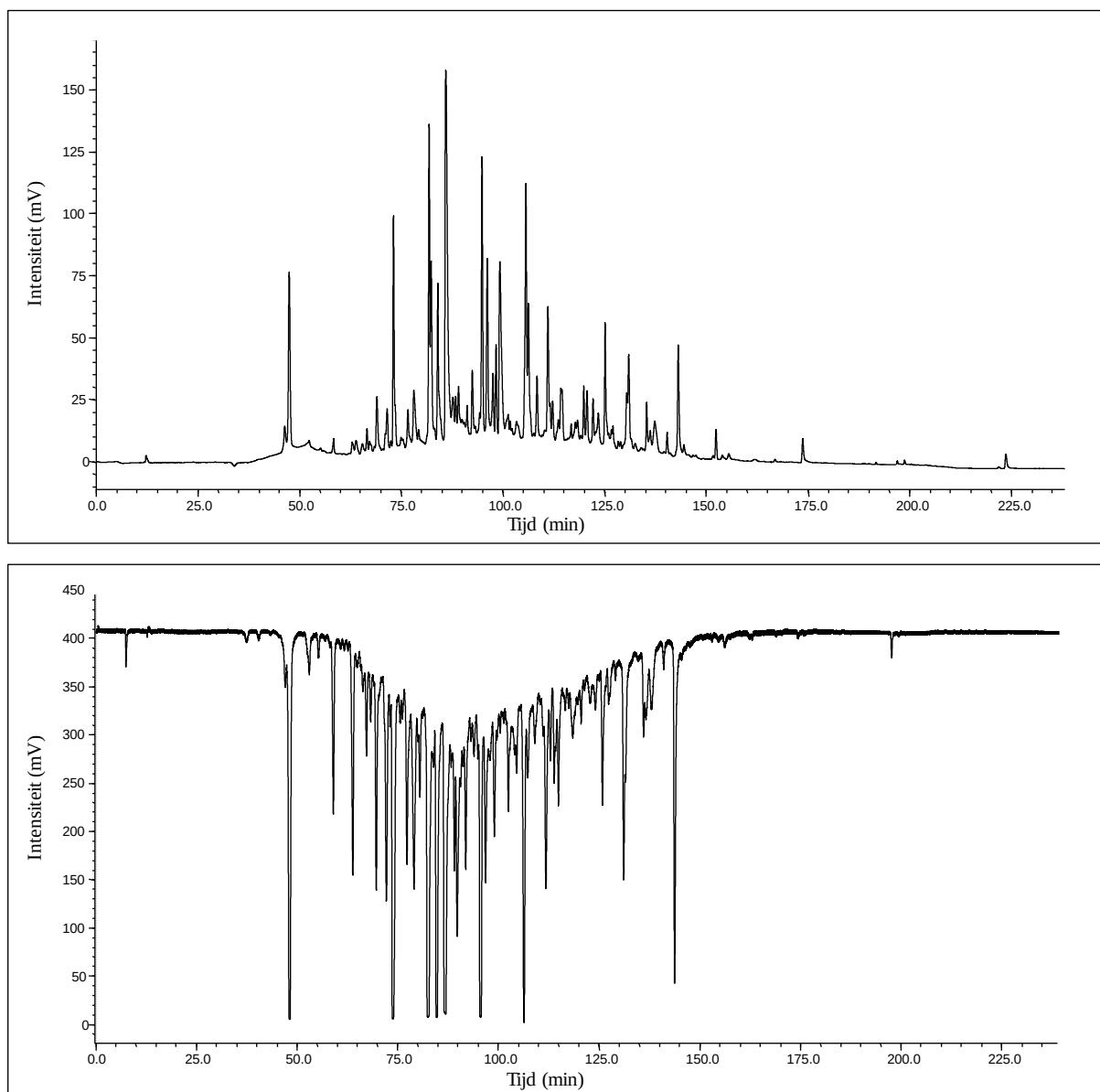
Figuur IV.28: Het ABTS^{•+} signaal van de analyse bij 25°C. De drie gebruikte standaarden waren quercetine (1), rutine (2) en hesperidine (3).

De analyse bij hogere temperatuur toonde wel aan dat de reactie tussen quercetine en ABTS^{•+} beter doorgaat bij hogere temperatuur. De antioxidant-activiteitsbepaling voor polyfenolen met de ABTS-test hangt af van de temperatuur. Aangezien de meeste natuurproducten bij kamertemperatuur worden genuttigd, is het zinvoller om de activiteit te bepalen bij deze temperatuur.

Merk op dat rutine, een bekend antioxidant, weinig tot geen ABTS signaal vertoont.

5.3.2 De hoog-efficiëntie analyse van polyfenolen in wijn

De polyfenolen in wijn werden gescheiden en gedetecteerd met behulp van de geoptimaliseerde ABTS-test. Om een hogere efficiëntie te halen werden er twee Luna C18 kolommen (250 mm, i.d. 4,6 mm, 5µm; Phenomenex, Torrance, USA) gekoppeld. De analyse werd bij kamertemperatuur (24°C) uitgevoerd. Er werd een gradiëntelutie uitgevoerd waarbij de mobiele fase een initiële samenstelling had van 4% methanol en 96% water. Dit werd aangehouden gedurende 24 minuten. Vervolgens veranderde de samenstelling lineair naar 96% methanol en 4% water over een periode van 176 minuten. Dit werd 40 min aangehouden. Het injectievolume was 20 µl en de monstervoorbereiding gebeurde door de SPE procedure waarbij 4 ml wijn werd geladen. Figuur IV.29 toont de scheiding over twee kolommen en detectie van de polyfenolen in zowel het UV-chromatogram als het ABTS^{•+}-absorbantie chromatogram.



Figuur IV.29: De scheiding en detectie van polyfenolen in wijn met behulp van 2 Luna C18 kolommen. Het bovenste chromatogram toont het normaal UV-chromatogram bij 280 nm. Het onderste chromatogram toont de ABTS absorbantie bij 414 nm na reactie met de polyfenolen. (wijn: Chateau l'Estelle).

Figuur VI.29 toont aan dat de bult afkomstig van het wijnpolymeer nog niet volledig onderdrukt is. In het onderste chromatogram zijn er weer verscheidene pieken die duidelijk beter zichtbaar zijn dan in het bovenste chromatogram.

6 Identificatie van de polyfenolen

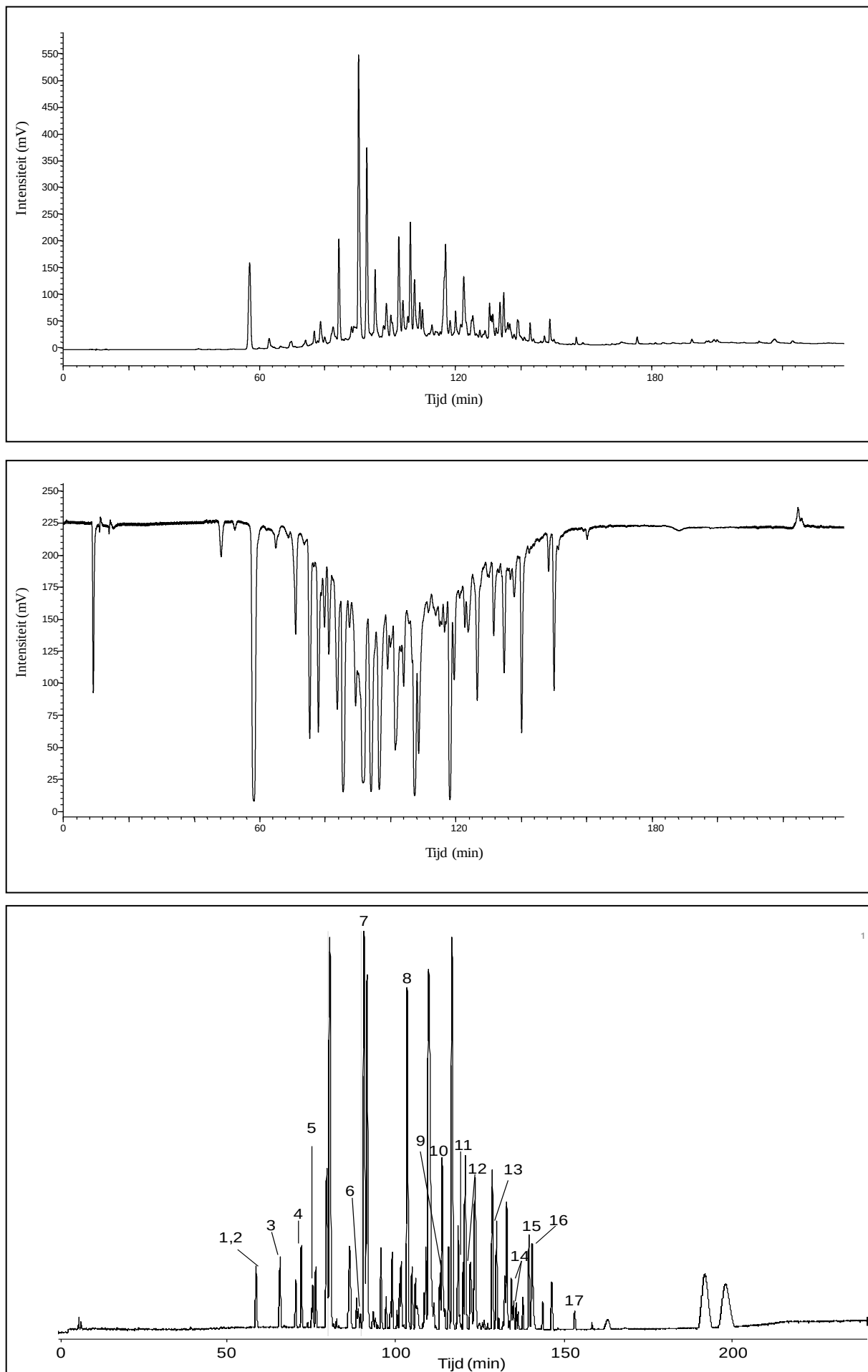
Bij bepaling van de antioxidant-activiteit van de polyfenolen in natuurproducten moet elke activiteit gekoppeld worden aan een geïdentificeerd polyfenol. De identificatie gebeurde door de geoptimaliseerde 2 kolom analyse, beschreven in het voorgaande deel, te lopen op een LC-UV-TOF-MS systeem. Dit werd verwezenlijkt in het Research Institute for Chromatography in Kortrijk.

Tabel IV-4 toont de geïdentificeerde componenten. De verschillende chromatogrammen zijn weergegeven in Figuur IV.31.

Nr	Ret. Tijd.	Naam	Gemeten massa	Formula	Verwachte massa	fout (ppm)	score (%)
1	58	5-hydroxymethylfurfural	125,0244	C ₆ H ₆ O ₃	125,02441	0,08	100
2	58	gallus zuur	169,01426	C ₇ H ₆ O ₅	169,01424	0,12	100
3	65	cyanidin-(6-coumaroyl)-3-glucoside	594,01726	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	594,13787	203,04	96,35
4	72	epigallocatechine	305,06747	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,06666	2,66	100
5	75	3,4 dihydroxybenzoëzuur	153,05586	C ₇ H ₆ O ₄	153,01932	238,74	65
6	88	epigallocatechine	305,06686	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,06666	0,66	100
7	90	catechine	289,0734	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07175	5,71	100
8	103	epicatechine	289,07356	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07175	6,26	100
9	113	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside	507,12491	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507,11439	20,74	N.I.
10	114	syringinezuur	197,04497	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,04553	2,84	100
11	120	petudin-3-glucoside-pyruvic zuur	549,11346	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₄	549,11713	6,68	94,32
12	121	coumarinezuur	163,03813	C ₉ H ₈ O ₃	163,04006	11,84	100
13	130	chlorogeenzuur	353,12574	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08779	107,47	68,6
14	133	resveratrol	227,07179	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,07136	1,89	100
	135	resveratrol	227,07176	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,07136	1,76	100
15	139	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside	507,11696	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507,11439	5,07	100
16	141	myricetine	317,03091	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,03028	1,99	100
17	153	quercetine	301,03597	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,03536	2,03	100

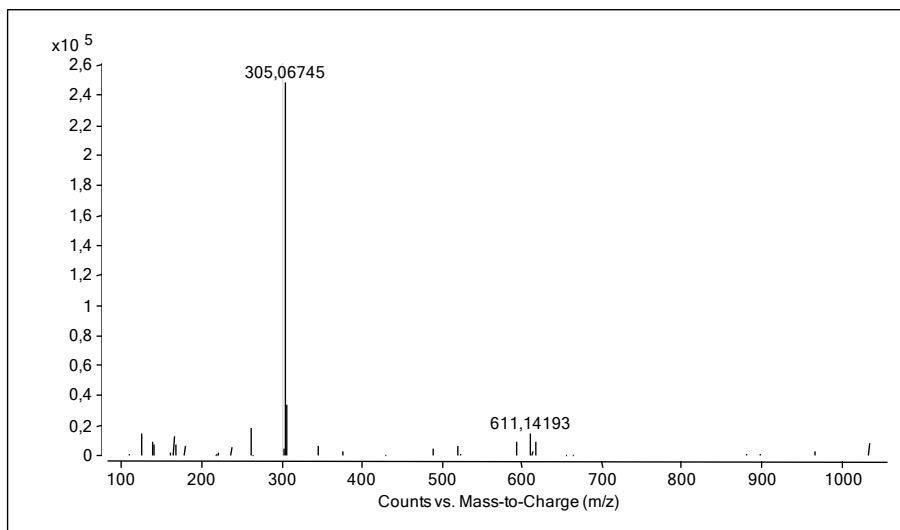
Tabel IV-4: identificatie van de polyfenolen met behulp van een TOF-MS.

Aangezien de informatie over de massa's van de wijnpolyfenolen in de literatuur alsook de beschikbare tijd van dit werk beperkt was, werden er slechts 17 polyfenolen geïdentificeerd.

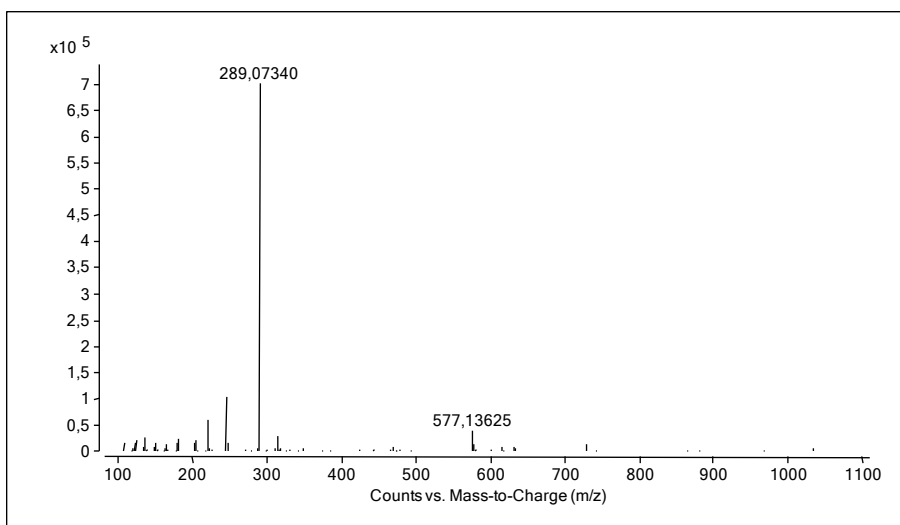


Figuur IV.31: Het UV spectrum, het ABTS spectrum en het TOF-MS spectrum van de analyse van polyfenolen in wijn (wijn: Chateau l'Estelle).

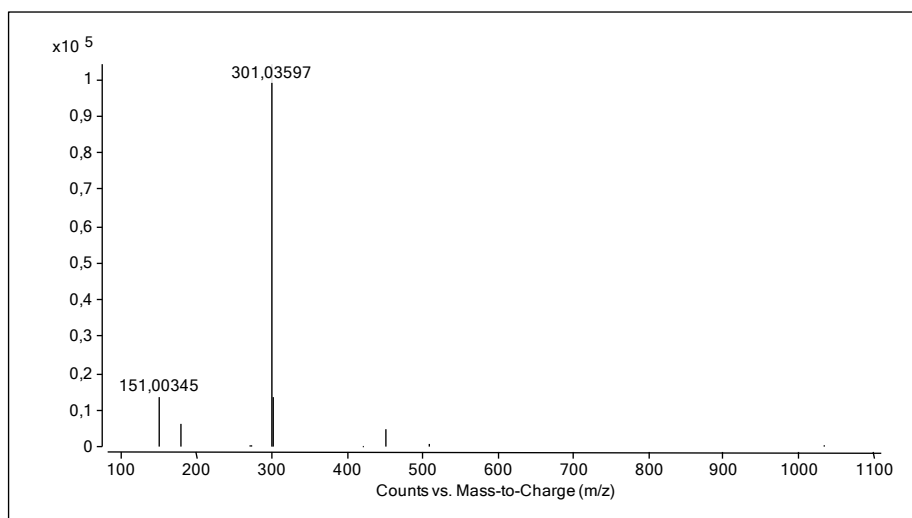
Enkele massaspectra van de geïdentificeerde polyfenolen worden getoond in de Figuren IV.32-34.



Figuur IV.32: Het massaspectrum van epigallocatechine.



Figuur IV.33: Het massaspectrum van catechine.



Figuur IV.34: Het massaspectrum van quercetine.

Merk op dat in het chromatogram verschillende componenten worden onderscheiden die nagenoeg dezelfde massa hebben. Zo wordt reservatrol tweemaal geïdentificeerd (nr 14 op Figuur IV.31 en in Tabel IV-3). Reservatrol heeft zowel een cis- als een transconfiguratie. Deze twee componenten hebben dezelfde massa maar een andere retentietijd. Catechine en epicatechine (nr 7 en 8) zijn diastereoisomeren en hebben dus dezelfde massa. Uit voorgaande experimenten bleek dat catechine vroeger van de kolom elueerde dan epicatechine.

In de wijnanalyse zijn er meer dan 140 polyfenolen en mogelijke antioxidanten gedetecteerd en maar 17 geïdentificeerd. Door de beperkte tijdspanne van dit werk kon er op de identificatie niet meer verder ingegaan worden. De resultaten waren echter veelbelovend en nodigen dan ook uit tot verder onderzoek.

V. Conclusie

In het eerste deel van dit werk werd een post-kolom reactor voor de detectie van anti-oxidanten ontwikkeld, die inlijn gekoppeld werd met HPLC. Na optimalisatie van het reactorvolume, de concentratie aan ABTS en het debiet van de ABTS-oplossing, konden standaarden worden gedetecteerd met een concentratie tot 500 ng/ml. Bij testen bleek dat standaarden die geen antioxidant-activiteit hebben, geen respons gaven bij de reactie.

Wanneer eenzelfde monster eerst werd geanalyseerd met HPLC-UV, gekoppeld met de reactor en antioxidant-detectie en vervolgens met HPLC gekoppeld met de universele charged aerosol detector, kan de antioxidant-activiteit van de componenten worden geëvalueerd. Aangezien de respons van de CAD kan gekoppeld worden aan de concentratie en het ABTS-signaal met de antioxidant-activiteit, is het immers mogelijk deze aan elkaar te koppelen, zodat een vergelijking kan worden gemaakt tussen de activiteit van verschillende componenten.

Voor evaluatie van de ontwikkelde post-kolom reactie voor de detectie van antioxidant in een natuurlijk extract werd rode wijn gekozen als voorbeeld. Omdat wijn een zeer complex mengsel is, werd gekozen om eerst een relevante monstervoorbereiding uit te voeren. Waarbij na vergelijking tussen verdunning, vloeistof-vloeistof-extractie en vaste-fase-extractie, gekozen werd voor SPE, omdat hierdoor de meeste interfererende matrixcomponenten verwijderd werden.

Bij analyse van verschillende rode wijnen werd een hoge piekcapaciteit beoogd. Dit werd bekomen door het koppelen van kolommen. Hiervoor werden twee kolommen gekoppeld. Uit experimenten bleek dat de geteste polyfenolen bij deze temperatuur stabiel zijn. Er dient te worden opgemerkt dat de bekomen resultaten, in vergelijking met de tot nu toe gepubliceerde chromatogrammen, een duidelijke winst in chromatografische efficiëntie vertonen.

In rode wijnen werden, zoals verwacht, heel wat componenten aangetroffen met antioxidantwerking. Een wijnmonster werd geanalyseerd met HPLC-TOF-MS, waaruit voorlopig 17 pieken konden worden geïdentificeerd, waaronder de componenten catechine, gallus zuur, epicatechine, resveratrol,....

Hoewel de eerste identificatie van polyfenolen maar een beperkt aantal resultaten opleverde, dringt verder onderzoek zich op. De eerste resultaten waren immers veelbelovend. Er werd een eerste stap gezet voor de universele bepaling van antioxidant-activiteit van componenten in natuurproducten. Dit inleidend onderzoek smeekt naar vervolg en toepassing.

VI. Lijst met afkortingen

ROS	Reactieve oxiderende speciën
HPLC	Hoge performantie-vloeistofchromatografie
LLC	Vloeistof-vloeistofchromatografie
NPC	Normaal-fase-chromatografie
RPC	Omgekeerde-fase-chromatografie
IEC	Ionenuitwisselingschromatografie
SEC	Size exclusion chromatografie
HILIC	Hydrofiele interactie-chromatografie
SPE	Vaste-fase-extractie
CAD	Charged Aerosol Detector
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
MS	Massaspectrometrie
SIM	Single ion monitoring
APCI	Atmosferische druk Chemische Ionisatie
ESI	Electrospray ionisatie bron
CRM	Charged Residue Model
IEM	Ion Evaporatie model
TOF	Time-of-Flight
LDL	Low Density Lipoproteïnen
HDL	High Density Lipoproteïnen
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfon zuur)
DPPH	1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFE	Polytetrafluoretheen
LLE	Vloeistof-vloeistofextractie

VII. Bibliografie

1. Asmus en Landis (1984). "Analysis of steroids in bulk pharmaceuticals by liquid chromatography with light-scattering detection." Journal of Chromatography **316**: 461-72.
2. Bartasiute, Westerink, et al. (2007). "Improving the in vivo predictability of an on-line HPLC stable free radical decoloration assay for antioxidant activity in methanol-buffer medium." Free Radical Biology and Medicine **42**(3): 413-423.
3. Berkowitz (1996). "World's earliest wine." Archaeology **49**(5): 26-26.
4. Bush, Taylor, et al. (1986). "A Critical-Evaluation of Clinical-Trials in Reactions to Sulfites." Journal of Allergy and Clinical Immunology **78**(1): 191-202.
5. Charlesworth (1978). "Evaporative Analyzer as a Mass Detector for Liquid-Chromatography." Analytical Chemistry **50**(11): 1414-1420.
6. Cheynier, Duenas-Paton, et al. (2006). "Structure and properties of wine pigments and tannins." American Journal of Enology and Viticulture **57**(3): 298-305.
7. Cotran (2010). Pathologic Basis of Disease, Saunders.
8. Cox (1999). From vines to wines : the complete guide to growing grapes and making your own wine, Storey Books.
9. de Villiers, Gorecki, et al. (2007). "Improving the universal response of evaporative light scattering detection by mobile phase compensation." Journal of Chromatography A **1161**(1-2): 183-191.
10. De Villiers, Lynen, et al. (2004). "Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in wine." Chromatographia **59**: 403-409.
11. De Villiers, Lynen, et al. (2008). "Effect of analyte properties on the kinetic performance of liquid chromatographic separations." Journal of Chromatography A.
12. Dixon en Peterson (2002). "Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging." Analytical Chemistry(74): 2930-2937.
13. Encinar, Alonso, et al. (2001). "A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS. Part II. Evaluation of total combined uncertainty in the determination of lead in biological matrices by isotope dilution." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **16**(4): 322-326.
14. Engelhardt (2004). "One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations." Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **800**(1-2): 3-6.
15. Ettre (2002). "In memory - A.J.P. Martin (1910-2002)." Lc Gc North America **20**(10): 916-916.

16. Fenn (2003). "Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)." Angewandte Chemie **42**(33): 3871-94.
17. Gardner, Raineri, et al. (1995). "Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian-Cells." Journal of Biological Chemistry **270**(22): 13399-13405.
18. Gerschman K (1954). "Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common." Science(119): 623-626.
19. Gomes, Rocha, et al. (1996). "Determination of sulfur dioxide in wine using a quartz crystal microbalance." Analytical Chemistry **68**(9): 1561-1564.
20. Gritti en Guiochon (2006). "General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC." Analytical Chemistry **78**(15): 5329-5347.
21. Gutteridge en Halliwell (2010). "Antioxidants: Molecules, medicines, and myths." Biochemical and Biophysical Research Communications **393**(4): 561-564.
22. Henriquez, Aliaga, et al. (2002). "Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures." International Journal of Chemical Kinetics **34**(12): 659-665.
23. Iribarne en Thomson (1976). "Evaporation of Small Ions from Charged Droplets." Journal of Chemical Physics **64**(6): 2287-2294.
24. John H. Knox (1983). "B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography." Journal of Chromatography A **282**: 297-313.
25. Koleva, Niederlander, et al. (2001). "Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates." Analytical Chemistry **73**(14): 3373-3381.
26. Koleva, Niederlander, et al. (2000). "An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures." Analytical Chemistry **72**(10): 2323-2328.
27. Kuhlmann en Krauss (1997). "Crocheted ETFE-reactor for on-line post-column photoderivatization of diclofenac in high-performance liquid chromatography." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **16**: 553-559.
28. Li en Zhao (2006). "Simple methods for rapid determination of sulfite in food products." Food Control **17**(12): 975-980.
29. Mamyurin (2001). "Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects)." International Journal of Mass Spectrometry **206**(3): 251-266.
30. Martin (1952). "The development of partition chromatography." Nobel Lectures.
31. Mathews, Higginson, et al. (2004). "Improving quantitative measurements for the evaporative light scattering detector." Chromatographia **60**(11-12): 625-633.
32. McAteer, Akhtar, et al. (2010). "An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide." Atherosclerosis **209**(1): 18-27.
33. McNeff, Yan, et al. (2007). "Practice and theory of high temperature liquid chromatography." Journal of Separation Science(30): 1672-1685.

34. Miller, Rice-Evans, et al. (1993). "A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates." Clinical Science **84**(4): 407-412.
35. Niederländer H (2008). "Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography." Journal of Chromatography A(1210): 121-134.
36. Poole, Gunatilleka, et al. (2000). "Contributions of theory to method development in solid-phase extraction." Journal of Chromatography A **885**(1-2): 17-39.
37. Re, Pellegrini, et al. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." Free Radical Biology and Medicine **26**(9-10): 1231-1237.
38. Robichaud en Noble (1990). "Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine." Journal of the Science of Food and Agriculture **53**(3): 343-353.
39. Son, Hwang, et al. (2009). "1H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains." Analytical Chemistry **81**(3): 1137-45.
40. Son, Hwang, et al. (2009). "1H NMR-Based Metabolomic Approach for Understanding the Fermentation Behaviors of Wine Yeast Strains." Analytical Chemistry(81): 1137–1145.
41. Stewart, Artime, et al. (2003). "Resveratrol: A candidate nutritional substance for prostate cancer prevention." Journal of Nutrition **133**(7): 2440s-2443s.
42. Swartz (2005). "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction." Separation Science Redefined: 8-14.
43. Synge (1952). "Applications of partition chromatography." Nobel Lectures.
44. Taylor (1964). "Disintegration of water drops in an electric field." Proceedings of the Royal Society **280**(1382): 383-397.
45. Tswett (1906). "Physical chemical studies on chlorophyll adsorptions." Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft(24): 316.
46. vandeemter, Zuiderweg, et al. (1956). "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography." Chemical Engineering Science **5**(6): 271-289.
47. Villano, Fernandez-Pachon, et al. (2004). "The antioxidant activity of wines determined by the ABTS(*+) method: influence of sample dilution and time." Talanta **64**(2): 501-509.
48. Wang, Chu, et al. (2004). "Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma." Clinical Chemistry **50**(5): 952-4.
49. Williams, Spencer, et al. (2004). "Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?" Free Radical Biology and Medicine **36**(7): 838-849.
50. Xanthopoulou, Fragopoulou, et al. (2010). "Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts." Food Chemistry **120**(3): 665-672.
51. Zarban, Taheri, et al. (2009). "Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk." Journal of Clinical Biochemical Nutrition **45**(2): 150-4.

Detection and identification of Antioxidants in Wine by combining High Efficiency HPLC with an On-Line Post-Column Reactor and high resolution TOF-MS

S. De Smet^a, B. Miserez^a, F. Lynen^a, A. Dos Santos Pereira^b, P. Sandra^{a,b,*}

^a Pfizer Analytical Research Centre, Department of Organic Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281 S4, 9000 Gent, Belgium

^b Research Institute for Chromatography (RIC), President Kennedypark 26, 8500 Kortrijk, Belgium

*Corresponding author: pat.sandra@richrom.com

The detection and identification of antioxidants in natural products as food or drinks is a challenging task. An online post-column reaction using the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)-radical was previously described and used for the detection of antioxidants in natural extracts. In this work the reactor and method are optimized to preserve the high peak capacity of a high efficiency HPLC separation. Antioxidants at concentrations down to 250 ng/ml could be detected. The system was used to detect antioxidants in red wine, a known source of antioxidants. The main compounds were identified by accurate mass determination using HPLC-TOF-MS.

Keywords: HPLC, antioxidants, ABTS, online assay, wine

Introduction

In the last years there is an increasing interest in the analysis of antioxidants and especially polyphenols in natural products, such as plants, tea, wine and fruits [1-4]. This is stimulated by the fact that antioxidants play an important role in prevention of oxidative stress, caused by reactive oxygen species and associated with several diseases such as cancer, Alzheimer, aging and cardiovascular diseases [5-6]. Recently several analytical on-line methods have been developed to determine the polyphenols and their antioxidant activity [7-8]. These online, postcolumn methods coupled with high-performance liquid chromatography are based on the use of a free radical. The most used approach involves ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) or DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) which both form stable free radicals under controlled conditions. After chromatographic separation, the free radical is added to the flow and in the reaction coil, an antioxidants will react with the free radical, resulting in a decrease in absorption at 414 nm. The system is represented in figure 1. Red wine contains significant amounts of polyphenols including flavanols, flavonols, anthocyanins and stilbene derivatives. The aim of this study was to optimize the post-column reaction and couple the system to high resolution HPLC, capable of analyzing complex mixtures. The system is then used to analyze the antioxidants present in red wine, which was also analyzed by HPLC-TOF-MS for identification via accurate mass determination.

Analysis of red wine

The polyphenols in the wine samples were extracted with a solid-phase extraction method on a styrene-divinylbenzene cartridge (SDB-L, STRATA, Phenomenex, Torrance, USA), as described by de Villiers et al [9]. The same instrumentation as described in the paragraph above was used for HPLC analysis. Separations were performed in gradient mode with an LC-flow rate of 0.5 ml/min: 0-12 min: MeOH:H₂O (4:96), 12-100 min: gradient to MeOH:H₂O (96:4), 120-140 min: MeOH:H₂O (96:4). Flowrate of the ABTS solution (35 μ M) was 0.8 ml/min. The reactor dimensions were 2.8 meter x 0.25 mm I.D. All wine analyses were performed on two coupled Luna C₁₈ columns (250 mm, i.d. 4.6mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, USA). Polyphenols were detected at 280 nm and the absorbance of the ABTS radical was performed at 414 nm.

The identification of the polyphenols was done by an Agilent 1200 LC system coupled with an Agilent LC/MSD TOF G1969A mass spectrometer (Agilent, Waldbronn, Germany), using the same chromatographic conditions as described above and negative ionization.

Results and discussion

Optimization of the ABTS assay

The ABTS assay was optimized by variation of the concentration of initial ABTS, the ABTS solution flow rate and the dimensions of the reactor. The signal to noise ratio (s/n) was measured and used as critical value for the optimization of the assay. Each analysis was performed with a sample containing three polyphenols and acetophenone, a none-antioxidant, all at 20 μ g/ml. Each analysis showed (figure 2) a reduction in the absorption signal upon antioxidant elution.

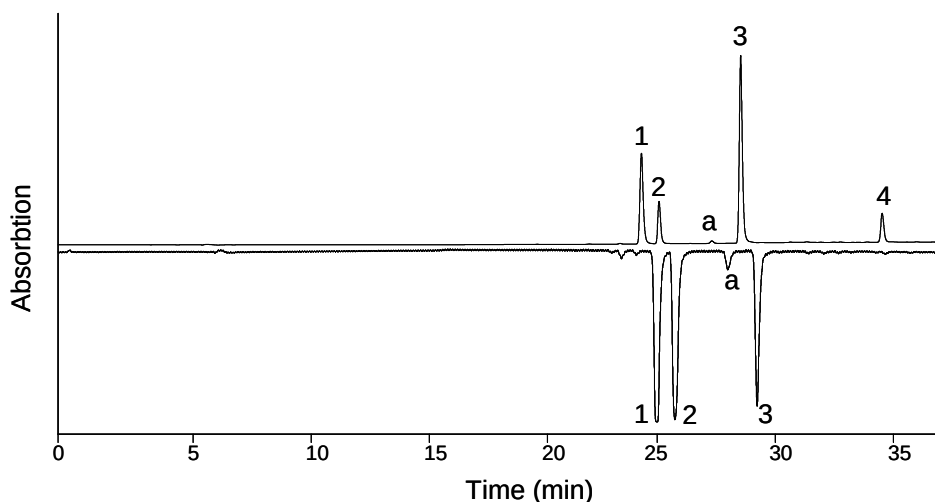


Figure 2: Analysis of protocatechuic acid (1), catechin (2), caffeic acid (3) and acetophenone (4). Top: UV-absorbance at 280 nm, Bottom: ABTS UV-absorbance at 414 nm. The three polyphenols can be identified in the UV-chromatogram as in the ABTS^{•+} chromatogram. Acetophenone shows only a signal in the UV-chromatogram and a is a contamination peak of protocatechuic acid.

The reactor can change in two dimensions, length and internal diameter (i.d.). A reactor with 2.8 m length and 0.25 mm i.d. had the best signal to noise ratio of the tested reactors. Various reactor lengths and I.D's were tested, from which it was concluded that

a length of 2.8 m and 0.25 mm I.D. resulted in an optimal sensitivity (as reflected by a high signal to noise ratio of the negative signals at 414 nm) and also provided sufficient residence time in the reactor to allow complete reaction. Subsequently the flow rate and concentration of the ABTS solution were optimized. The resulting sensitivity of the reactor is shown in Figure 3. It is clear that the ABTS assay with a concentration of 35 μ M and a flow rate of 0.8 ml/min resulted in the most sensitive setup. The limit of detection was determined to be 250 ng/ml.

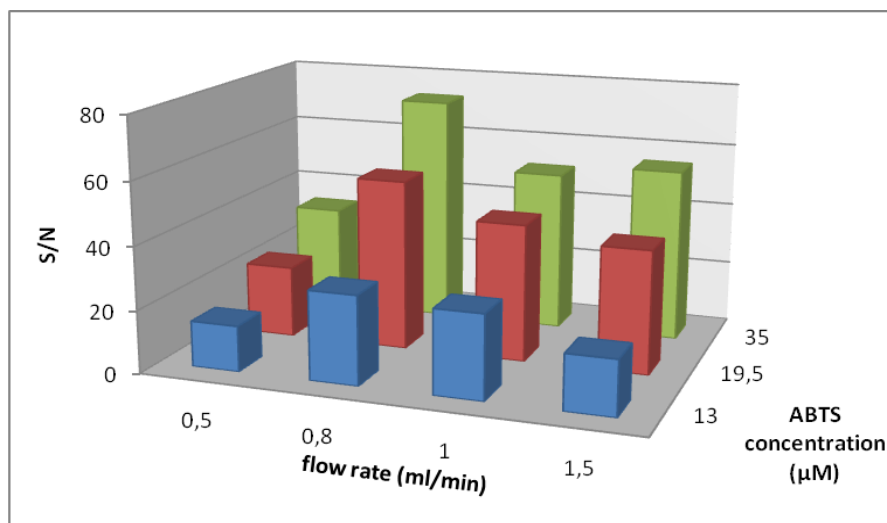


Figure 3: The signal to noise ratio obtained for the protocathechuic acid signal and tested for various ABTS flow rates and concentrations.

Analysis of red wine

Polyphenols in red wine were analyzed with the optimized settings. Figure 4 shows the resulting chromatogram. Subsequently polyphenols with significant antioxidant activity were tentatively identified with the LC-UV-TOF-MS. This allowed the identification of 17 polyphenols with antioxidant activity (Tabel I).

TABLE I. Identification of polyphenols with antioxidant activity using TOF-MS.

Nr.	Name	Nr.	Name
1	5-hydroxymethylfurfural	10	syringic acid
2	gallic acid	11	petudin-3-glucoside-pyruvic acid
3	cyanidin-(6-coumaroyl)-3-glucoside	12	coumaric acid
4	epigallocatechin	13	chlorogenic acid
5	protocatechuic acid	14	resveratrol
6	epigallocatechin	*	resveratrol
7	catechin	15	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside
8	epicatechin	16	myricetin
9	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside	17	quercetin

The complete results are shown in Appendix A.

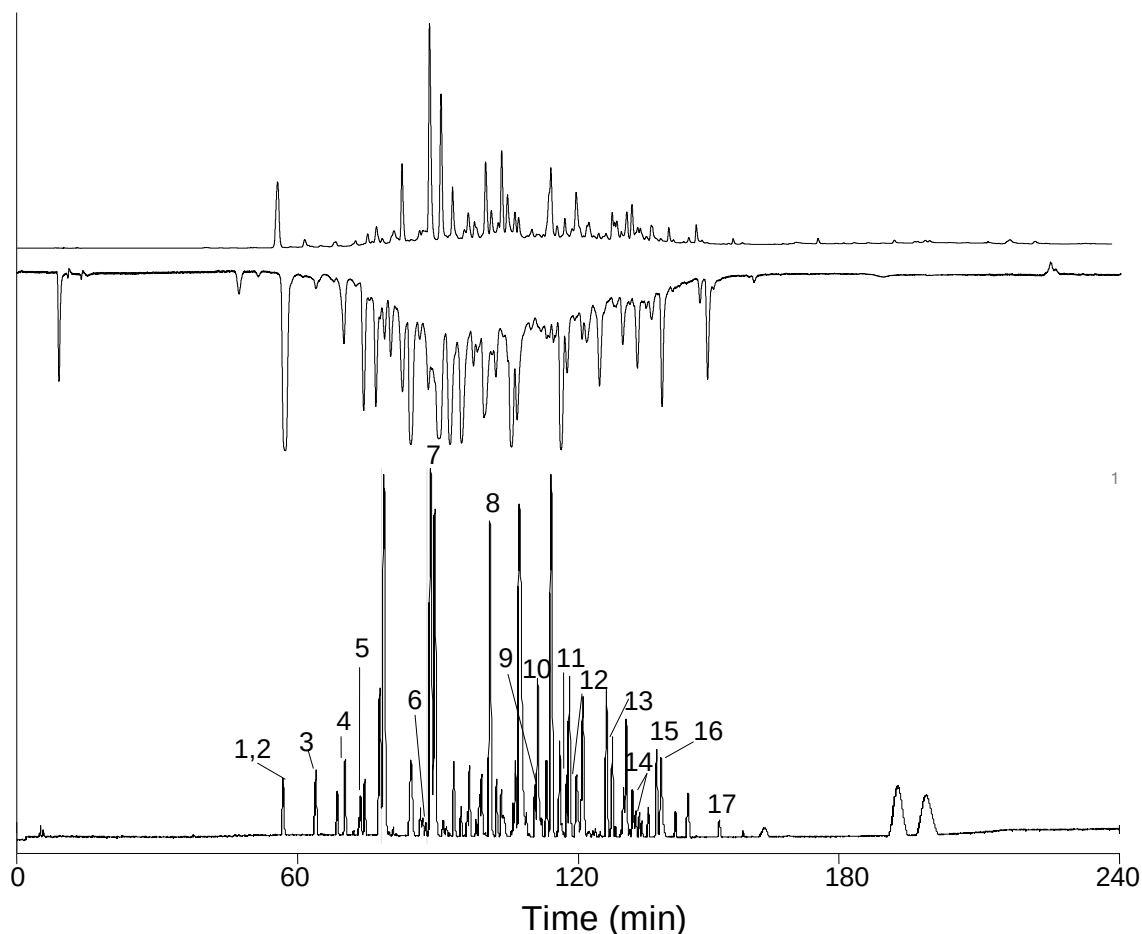


Figure 4: Analysis of red wine. Top: UV-absorbance at 280 nm, Middle: ABTS UV-absorbance at 414 nm, Bottom: TOF-MS signal. Identification as in Table I.

Conclusion

This work presents the optimization of an ABTS assay to determine the antioxidant property and activity of polyphenols. After the optimization of the different parameters, such as reactor dimensions, ABTS flow rate and ABTS concentration, the assay was used to determine the antioxidant properties of the polyphenols in red wine by high efficiency HPLC. These polyphenols were identified by a LC-UV-TOF-MS system and were linked to the ABTS-signals.

References

1. A. Koutelidakis, *Ann. Nutr. Metabol.*, **55**, 330 (2009).
2. M.J. Aguirre. *Food Chem.*, **121**, 44-48 (2010).
3. B. Sun, *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 8623-8627 (2009).
4. A.P. Lopez, *Biol. Plantarum*, **54**; 349-352 (2010).
5. K.F. Gey, *Am. J. Clin. Nutr*, **45**, 1368-1377 (1987).
6. P. Hochstein, *Mutat. Res.*, **202**, 363-375 (1988).
7. C. Y. Kim, *Food Sci. Biotechnol.*, **17**, 846-849 (2008)

8. J. Chen, *J. Sep. Sci.*, **33**, 672-677 (2010)
9. A. de Villiers, *Chromatographia*, **59**, 403-409 (2004)

Appendix A: The identified polyphenols with antioxidant activity

Nr	Ret. Time	Name	Measured mass	Formula	Expected mass	inaccuracy (ppm)	score (%)
1	58	5-hydroxymethylfurfural	125,0244	C ₆ H ₆ O ₃	125,02441	0,08	100
2	58	gallic acid	169,01426	C ₇ H ₆ O ₅	169,01424	0,12	100
3	65	cyanidin-(6-coumaroyl)-3-glucoside	594,01726	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₃	594,13787	203,04	96,35
4	72	epigallocatechine	305,06747	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,06666	2,66	100
5	75	protocatechuic acid	153,05586	C ₇ H ₆ O ₄	153,01932	238,74	65
6	88	epigallocatechin	305,06686	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,06666	0,66	100
7	90	catechin	289,0734	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07175	5,71	100
8	103	epi-catechin	289,07356	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,07175	6,26	100
9	113	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside	507,12491	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507,11439	20,74	N.I.
10	114	syringic acid	197,04497	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,04553	2,84	100
11	120	petudin-3-glucoside-pyruvic acid	549,11346	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₄	549,11713	6,68	94,32
12	121	coumaric acid	163,03813	C ₉ H ₈ O ₃	163,04006	11,84	100
13	130	chlorogenic acid	353,12574	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,08779	107,47	68,6
14	133	resveratrol	227,07179	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,07136	1,89	100
	135	resveratrol	227,07176	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,07136	1,76	100
15	139	delphinidin-(6-acetyl)-3-glucoside	507,11696	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507,11439	5,07	100
16	141	myricetin	317,03091	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,03028	1,99	100
17	153	quercetin	301,03597	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,03536	2,03	100

Tabel A: The polyphenols with antioxidantactivity identified by TOF-MS

