

Project 505.5021

Ontwikkeling en verbetering van methoden van onderzoek voor bepaling van antinutritieele factoren (ANF).

Projectleider: ir. P.C.H. Hollman

Rapport 91.55

November 1991

Onderzoek naar de mogelijkheden van HPLC bij de bepaling van de samenstelling van tanninen uit *Vicia faba* bonen.

D.P. Venema, ir. P.C.H. Hollman

afdeling: Micronutriënten en natuurlijke toxische stoffen

Medewerker: H.C.H. Kleijnen

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)  
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

## VERZENDLIJST

### INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen (5x)

programmabeheer en informatieverzorging (2x)

afdeling MNT (3x)

D.P. Venema

ir. P.C.H. Hollman

circulatie

bibliotheek (3x)

### EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Veehouderij en Zuivel

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Instituut voor Veevoedingsonderzoek

Directie Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek

Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek, drs. C. Grashoff

Directie ATO Agrotechnologie, ir. G. Meijer

Directie Centrum voor Plantenverdelingsonderzoek

Centrum voor Plantenverdelingsonderzoek, dr. J. Helsper

Directie Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor Pluimveehouderij

## ABSTRACT

Onderzoek naar de mogelijkheden van HPLC bij de bepaling van de samenstelling van tanninen uit *Vicia faba* bonen.

Investigation on the possibilities of HPLC for the determination of the composition of tannins in *Vicia faba* beans (in Dutch).

Report 91.55

November 1991

D.P. Venema, P.C.H. Hollman

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)  
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

13 figures, 1 table

Possibilities of HPLC for the determination of tannins (proanthocyanidins) in *faba* beans were studied.

A strong interaction of the tannins with the silica of the HPLC column was found.

Using a stepwise gradient a reproducible separation of the proanthocyanidins (PA) leading to a number of broad peaks, could be achieved.

Only the first peak showed a high correlation with the vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method.

A cleanup method with mini Sephadex LH-20 columns was developed allowing to analyse whole beans instead of the skins separately.

Attempts to separate the PA with alternative columns, a carbon column (Hypercarb), a straight phase column (Zorbax CN) and an aminated column (ionexchange principle), were not succesful.

Key words: proanthocyanidins, tannins, *Vicia faba*, HPLC

( )

( )

INHOUD	blz
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODEN	8
2.1 Monstervoorbewerking	8
2.2 Chromatografie	8
3. RESULTATEN	9
3.1 Scheiding volgens het reversed-phase principe	9
3.1.1 Flowsnelheid	9
3.1.2 De proanthocyanidines van de appel	9
3.1.3 Het uitvangen en opnieuw injecteren van de pieken en het aantonen van proanthocyanidines in de pieken met behulp van de vanilline/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reactie	10
3.1.4 Het verband tussen de vanilline/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -methode en de HPLC-methode	10
3.1.4.1 Onderzoek monsters SVP	10
3.1.4.2 Vergelijking van het gehalte PA van aan licht blootgestelde bonen met dat van in het donker en koel bewaarde bonen.	10
3.1.5 Zuivering van de extracten van eiwitten etc.	11
3.1.5.1 Methode van Hussein (1990)	12
3.1.5.2 Methode van Spanos (1990)	12
3.1.5.3 Monstervoorbereiding met Seppak C18 kolommetjes	12
3.1.6 Fluorescentiedetectie	13
3.2 Straight-phase scheiding met een CN-kolom	13
3.2.1 het uitvangen en opnieuw injecteren van de pieken en het aantonen van proanthocyanidines in de pieken met behulp van de vanilline/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> reactie	13
3.2.2 De proanthocyanidines van de appel	14

3.3 Andere kolommen	14
3.3.1 De Hypercarb koolstofkolom	14
3.3.2 Een straight-phase kolom met amineringsreagens (zwakke anionenwisseling)	15
4 DISCUSSIE EN CONCLUSIE	15
5 LITERATUUR	16
BIJLAGEN	

## SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft een onderzoek naar de mogelijkheden voor de bepaling van de samenstelling van de proanthocyanidines (PA) in *Vicia faba* bonen.

Aangezien er aanwijzingen zijn dat de antinutritionele activiteit van de PA samenhangt met het molekulgewicht zou het interessant zijn om de samenstelling van de PA te kunnen bepalen, bij voorkeur met een scheiding op molekulgewicht.

Op silicakolommen geven de PA veel interactie met het kolom materiaal, zodat bij isokratische elutie volledige adsorptie plaatsvindt.

Met een steile gradient komen de PA als een grote "bult" van de reversed-phase kolom. Met een stapsgewijze gradient bleek het op een reversed-phase kolom wel mogelijk om een (geforceerde) scheiding te krijgen. Na uitvangen van de afzonderlijke pieken en opnieuw injecteren kon de scheiding gereproduceerd worden.

Alleen de correlatie van de eerste piek met de vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-methode was hoog. De vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-reactie is het sterkst met de monomeren en de polymeren met de laagste molekulgewichten. Dit zou betekenen dat de PA met de lagere molekulgewichten het eerst van de kolom af komen. Dit is in overeenstemming met literatuurgegevens over de scheiding van PA van sorghum.

De PA bevinden zich uitsluitend in de schillen van de bonen. De kernen bevatten veel storende eiwitten, zodat wanneer geen verdere voorzuivering wordt toegepast het (tijdrovende) ontschillen van de bonen nodig is. Door een voorzuivering met een Sephadex LH-20 minikolommetje toe te passen, konden de storende eiwitten uit het extract verwijderd worden en was ontschillen niet meer nodig. Pogingen om de PA met alternatieve kolommen gescheiden te krijgen zijn niet gelukt. Uitgeprobeerd werden een koolstofkolom (Hypercarb), een straight-phase kolom (Zorbax-CN), en een geamineerde silicakolom (ionwisselingsprincipe).

Het is mogelijk dat de PA van fababonen uit een zo gecompliceerd mengsel van polymeren bestaan, dat het scheidend vermogen van een HPLC-systeem ontoereikend is.

( )

( )



## 1 INLEIDING

Tanninen werken als anti-nutritionele factor. In het kader van een DLO-project naar antinutritionele factoren wordt er gezocht naar een methode om de samenstelling van de tanninen (proanthocyanidinen), aanwezig in de schillen van *Vicia faba* bonen, te bepalen. Proanthocyanidinen (PA) zijn opgebouwd uit polymeren van flavanolen zoals catechine, epicatechine, delphinidine enz. De polymeren zijn samengesteld uit mengsels van dimeren, trimeren, tetrameren, pentameren en nog hogere polymeren. Er zijn aanwijzingen dat de antinutritionele activiteit samenhangt met het moleculgewicht van de polymeren.

Het totaalgehalte aan tanninen kan bepaald worden met een spectrofotometrische methode, de vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methode (Venema 1990), maar er is geen goede methode om de samenstelling te bepalen.

Van vruchten (zoals bijv. appel (Wilson, 1981 en druif (Spanos, 1990) zijn redelijke scheidingen op HPLC-reversed phase kolommen bekend.

Wilson (1981) verkrijgt ook een goede scheiding op een CN-kolom die in de straight-phase mode wordt gebruikt. De reversed phase kolommen geven een scheiding min of meer op moleculgewicht, maar alle epicatechine bevattende verbindingen komen later van de kolom af dan de meer catechine bevattende verbindingen. De CN-kolom zou een scheiding nog meer op moleculgewicht geven.

Bekend is dat de scheiding van tanninen uit sorghum (Putman, 1989) en houtachtige gewassen (Puech (1988) en Mueller-Harvey, 1987) met behulp van HPLC problemen geeft. Van peulvruchten zijn in het geheel geen HPLC -scheidingen bekend. De scheidingsproblemen bestaan eruit, dat de PA als een slecht gedefinieerde bult van de kolom afkomen, en zelfs dat alleen nog maar wanneer er een redelijk steile gradient toegepast wordt. Met een stapsgewijze gradient kunnen er geforceerd pieken geproduceerd worden, die, indien uitgevangen en opnieuw geïnjecteerd, een reproduceerbaar chromatogram geven (Putman, 1989). Ook een snellere flow verbetert de scheiding (Putman, 1989). Het is onduidelijk waarom de PA in vruchten veel makkelijker gescheiden worden, dan de PA uit sorghum en houtachtige gewassen. Van appels is wel bekend (Lea, 1982), dat geoxideerd materiaal als een soortgelijke slecht gedefinieerde bult als de sorghumtanninen van de kolom komt.

Van peulvruchten zijn wel een aantal scheidingen op Sephadex LH-20, een chromatografiegel met een sterke affiniteit voor fenolen, bekend.

Elutie met aceton zou een scheiding op moleculgewicht geven (Bullard, 1981).

In dit rapport wordt een onderzoek naar de mogelijkheden voor het gebruik van HPLC bij de scheiding van de proanthocyanidines in *Vicia faba* bonen beschreven.

## 2 MATERIAAL EN METHODEN

Beschreven wordt de monstervoorbewerking en de chromatografie.

### 2.1 Monstervoorbewerking

Van de monsters werden DMF/H<sub>2</sub>O=80/20 extracten gemaakt door 15 minuten te koken (volgens de spectrofotometrische methode van Kuhla, 1981) of aceton/H<sub>2</sub>O=70/30 extracten door koude extractie met een Waring Blendor. Extracten werden ofwel van hele bonen, ofwel van schillen van de bonen gemaakt. Een uitgebreidere beschrijving van de monsteropzuivering volgt verderop in dit verslag. Het betreft o.a. het verwijderen van storende eiwitten.

### 2.2 Chromatografie

Als uitgangspunt is het artikel van Putman en Butler (1989) genomen.

Deze auteurs gaan voor de scheiding van sorghum procyanidinen uit van een korte reversed phase kolom met grote poriën (300 Å) (de normale poriëngrootte is 60-100 Å). Deze kolommen zijn speciaal geschikt voor het scheiden van grotere moleculen zoals eiwitten. Er wordt een zo hoog mogelijke eluensflow gebruikt en er wordt gebruik gemaakt van een stappengradient, dit alles om interactie met het kolommateriaal te minimaliseren. Gebruikt is een Ultrapore C3 kolom 7.5cm\*4.6mm met 5 µm deeltjes. Deze kolom heeft poriën van 300 Å. Later is overgestapt naar een Novapak C18 kolom 150 \* 3.9 mm, 4 µm deeltjes met normale poriëngrootte. Tenzij anders vermeld werden de volgende condities gebruikt:

Novapak C18 kolom, eluens A: H<sub>2</sub>O/HAc=1000/1, eluens B: methanol, UV-detectie bij 280 nm (0.02 AUFS), flow 0.9 ml/min, 10 µl injectie.

Voor straight-phase scheiding werd een Zorbax CN kolom 150 \* 4.6 mm gebruikt.

Eluens A: THF/Hexaan/Isopropanol/HAc/Mierezuur=23/69/2/4/2, eluens B: THF/Isopropanol/HAc/Mierezuur=92/2/4/2.

Ook zijn nog wat experimenten gedaan met een Chromspher Si kolom die met eluens geamineerd werd en met een Hypercarb koolstof kolom.

Tenzij anders vermeld vond voor alle scheidingstechnieken UV-detectie plaats bij 280 nm. Het verloop van de gradient is op het papier aangegeven (0-100% over de volledige papierbreedte). De papersnelheid was 5mm/min tenzij anders vermeld.



### 3 RESULTATEN

Beschreven worden achtereenvolgens de scheiding van de proanthocyanidines volgens het "reversed phase" principe en volgens "straight phase" principe. Tot slot worden er nog een aantal alternatieve scheidingsmethoden beschreven.

#### 3.1 Scheiding volgens het reversed phase principe.

Zoals al verwacht werd naar aanleiding van het ontbreken van HPLC-gegevens in de literatuur, verloopt ook de scheiding van PA in fababonen zeer problematisch. Isocratisch komt er niets van de kolom en pas met een steile gradient verschijnt er een "bult" (zie fig. 1).

Door een stappengradient, zoals ook Putman (1989) deze toepast, kan deze bult worden opgedeeld in "pieken" (zie fig. 5). Om na te gaan er met de kolom met grotere poriën inderdaad een betere scheiding geeft werd de kolom vergeleken met een Novapak C18 kolom met normale poriëngrootte. Uit figuur 1 blijkt dat de scheiding juist beter is met de Novapak C18 traditionele kolom. Kennelijk wint het veel grotere aantal schotels van de Novapak kolom het van de lagere interactie van de Ultrapore kolom. Omdat het effect van de stappengradient samenhangt met het kolomvolume etc. zijn de kolommen vergeleken door middel van een lineaire gradient.

##### 3.1.1 Flowsnelheid.

In figuur 2 zijn de resultaten te zien van het effect van een verschil in flowsnelheid. De grote 'bult' blijft ongeveer even hoog, alleen de scherpe piekjes die er bovenop zitten veranderen van plaats ten opzichte van de 'bult'.

##### 3.1.2 De proanthocyanidinen van de appel.

De scheiding van de PA uit de *Vicia faba* bonen is erg slecht. Van deze bonen zijn ook geen HPLC scheidingen bekend in de literatuur. Van de appel is bekend dat de scheiding wel goed loopt en zijn ook een aantal pieken benoemd (Wilson 1981). Om een indruk te krijgen van het scheidend vermogen van ons systeem werd ter vergelijking een chromatogram gemaakt van de PA van de appel (Granny Smith). Van het appelsapextract werden mooie chromatogrammen verkregen. Als eluens werd zowel het eluens volgens Wilson (met fosfaatbuffer in de waterfase) als ons 'eigen' eluens (met azijnzuur in de waterfase) gebruikt. Door de extinctie bij 320 nm (geen absorptie van PA) en bij 280 nm te meten, door vergelijking met het chromatogram van Wilson en door wel (PA) of geen adsorptie aan Sephasorb HP, konden een aantal pieken met grote waarschijnlijkheid geïdentificeerd worden (zie figuur 3).

In vergelijking met het fosfaateluens van Wilson werden met ons azijnzuureluens betere chromatogrammen verkregen (vergelijk figuur 4a en c).

3.1.3 Het uitvangen en opnieuw injecteren van de pieken en het aantonen van proanthocyanines in de pieken met behulp van de vanilline/ $H_2SO_4$  reactie.

Om aan te tonen dat de geforceerde scheiding via een stappengradient reproduceerbaar is en om aan te tonen dat deze pieken werkelijk de PA bevatten, zijn de pieken van een aantal injecties apart opgevangen, geconcentreerd (door onder vacuum in te dampen bij  $35^\circ C$ ) en opnieuw geïnjecteerd. Bij de reversed phase kolom was het patroon goed reproduceerbaar (zie figuur 5). Met de voor PA specifieke vanilline/ $H_2SO_4$  reactie werd aangetoond dat we hier werkelijk de PA te pakken hebben.

3.1.4 Het verband tussen de vanilline/ $H_2SO_4$ -methode en de HPLC-methode.

Onderzocht werd op welke manier de vanilline/ $H_2SO_4$ -methode en de HPLC-methode correleren.

3.1.4.1 Onderzoek monsters SVP

Voor het SVP werden een aantal monsters onderzocht waarvan ook de vanilline/ $H_2SO_4$  cijfers bekend waren. Onderzocht werden drie rassen waarvan zowel een witbloeiende als een bontbloeiende variant bestaat (zie figuur 6). De witbloeiende bevatten bijna geen tanninen, zoals ook uit de chromatogrammen blijkt. Van deze rassen werden door het SVP zowel waterige als 70% methanol extracten gemaakt met behulp van de pottertechniek. Van deze extracten werd met door het SVP met de vanilline / $H_2SO_4$  methode het tanninegehalte bepaald en door ons met de HPLC het piekenpatroon bepaald. Integratie van de onvolledig gescheiden pieken vond plaats door doortrekken van het dal tussen twee pieken naar de doorgetrokken basislijn. De resultaten staan vermeld in tabel 1. De drie rassen hebben naast verschillende tanninegehaltenes ook een andere piekverhouding. Opvallend is de hoge correlatie van de eerste piek met de vanillinecijfers en de veel lagere correlatie van de andere pieken met de vanillinecijfer. De oplosbaarheid van de tannines in 70 % methanol ligt duidelijk hoger dan die in water.

3.1.4.2 Vergelijking van het gehalte PA van aan licht blootgestelde bonen met dat van in het donker en koel bewaarde bonen.

Wanneer fababonen in het licht en aan de lucht bewaard worden verandert de kleur van lichtbruinrood in een veel donkerder bruinrood. Door bewaren zou een verandering van het tanninegehalte of een verandering van de samenstelling op kunnen treden.



Tabel 1: De resultaten van de met de HPLC bepaalde PA vergeleken met de resultaten van de vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bepaling in extracten van de bontbloeiende rassen van het SVP.

Monster	piekoppervlakte							vanilline µg/ml	
	piek 1 5 min	piek 2 9.5 min	piek 3 15 min	piek 4 20 min	piek 5 26 min	totaal	piek 1+2		
S*S H <sub>2</sub> O	19	10	2	1	3	35	29	204	
M*P H <sub>2</sub> O	35	12	2	1	6	36	56	290	
H*R H <sub>2</sub> O	15	14	3	1	6	39	39	144	
S*S MeOH	53	40	9	5	8	115	93	350	
M*P MeOH	53	28	7	5	8	101	81	380	
H*R MeOH	31	31	9	4	8	83	62	254	
correlatie met vanillinereactie:									
	.98	.66				.86	.90		

Een mogelijkheid is dat de bruinrode kleur veroorzaakt wordt door oxidatie van de tannines, de oxidatieproducten hebben namelijk een roodbruine kleur (phlobaphenen). Een andere mogelijkheid is een toename van het gehalte van de polymeren. De PA uit de bonen hebben namelijk evenals de oxidatieproducten ook absorptie in het rode deel van het spectrum (bijv bij 500 nm) (zie figuur 7). Toename van het molekulgewicht zou te zien moeten zijn in een veranderde piekverhouding van het chromatogram na scheiding op de HPLC. Bij 500 nm heeft men geen last van storende absorptie van eiwitten zoals bij 280 nm. De gevoeligheid ligt echter een factor 100 lager dan bij 280 nm, wat meestal een bezwaar is in verband met de detectiegrens.

Om te onderzoeken of er een bewaareffect is, zijn de tanninegehalten van in het donker, luchtdicht en koel bewaarde bonen vergeleken met die van bonen die een aantal weken bij kamertemperatuur in het licht gestaan hadden.

Er werd geen verschil in vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tanninegehalte of in de piekenverhouding van het HPLC-chromatogram gevonden. Wat wel opviel was de wederom zeer hoge correlatie van het vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tanninegehalte met de oppervlakte van de eerste grote piek in het chromatogram.

### 3.1.5 Zuivering van de extracten van eiwitten etc.

Naast PA bevatten de extracten uiteraard nog andere stoffen waaronder eiwitten. Het UV-spectrum van eiwitten is helaas vrijwel gelijk aan dat van de PA. Daarom storen de eiwittenpieken in de chromatogram de interpretatie van het geheel. De extracten van alleen de schillen bevatten vrij weinig eiwitten, maar de kernen bevatten veel meer eiwitten. Het scheiden van kernen en schillen is een tijdrovende zaak. Wanneer een relatief simpele manier gevonden zou kunnen worden om de eiwitten uit de extracten van hele bonen te verwijderen, zou de stap van het scheiden van kernen en schillen achterwege kunnen blijven.

#### 3.1.5.1 Methode van Hussein (1990).

Hussein maakt een extract van 70% aceton, extraheert tweemaal met ethylacetaat, voert een batch-extractie uit met Sephadex LH-20, schudt uit met fenol en daarna nog met diethylether. Sephadex LH-20 bezit een grote affiniteit voor aromatische verbindingen wanneer lagere alcoholen gebruikt worden als eluens. De affiniteit wordt weer verbroken met aceton als eluens. Fenol heeft de eigenschap om eiwit-proanthocyanidine complexen te kunnen dissociëren. De diethylether-extractie dient alleen om in de waterfase aanwezig fenol te verwijderen.

Figuur 8a geeft een indruk van het effect van de verschillende zuiveringsstappen. Omdat de fenolextractie verreweg de meest effectieve stap leek is hierna ook nog een zuivering uitgevoerd met alleen de fenolextractie (figuur 8b en c). Aan het begin van het chromatogram blijven wat pieken bestaan, maar deze storen verder niet, zodat alleen een fenolextractie zou kunnen volstaan. Fenol zelf heeft echter een sterke UV-absorptie en moet dus grondig verwijderd worden uit het extract door middel van uitschudden met ether.

#### 3.1.5.2 Methode van Spanos (1990).

Spanos maakt bij de voorzuivering van PA gebruik van minikolommetjes Sephadex LH-20 (0.8\*4 cm). Er is geprobeerd om deze methode na te volgen met nog kleinere kolommetjes (1.5 cm hoogte) in een Eppendorf 1 ml pipetpunt. Acetonextracten werden ingedampd en in water opgenomen. Van deze extracten werd 0.5 ml op het kolommetje gebracht. Als eluens werden water, ethanol en later ook methanol geprobeerd. In figuur 8d zijn de resultaten weergegeven. Deze methode lijkt uitstekend te werken, behalve dat er verlies van eventueel aanwezige monomeren optreedt en werkt veel praktischer dan een fenolextractie (vergelijk figuur 8a, b en c met figuur 8d). Ethanol als eluens levert iets betere resultaten dan water. De kolom is misschien iets overladen geweest. Pogingen om een geschikte interne standaard te vinden zijn tot nu toe vergeefs gebleken. De fenolische zuren die op een schone plaats in het chromatogram elueren zijn niet geschikt omdat ze zich niet binden aan het kolommateriaal zoals de tannines. Catechine en epicatechine binden beter wanneer tenminste 20% methanol gebruikt wordt als eluens, maar kunnen in de extracten zelf voorkomen, zodat een blanchorun noodzakelijk zou zijn. Nog uitgetest moet worden of 20 % methanol als elutiemiddel ook geschikt is voor de binding van de PA.

#### 3.1.5.3 Monstervoorbereiding met Seppak-C18 kolommetjes.

Wanneer een waterig extract op de Seppak-C18 kolom wordt gebracht lopen de fenolische zuren er doorheen, de rest wordt gebonden. Omdat de fenolische zuren in het chromatogram elueren voor de PA storen ze de bepaling niet en heeft verwijderen niet zo veel zin. Voor de rest levert deze stap niet zoveel op.



Geprobeerd is ook om de tanninen die zich op de Seppak bevinden te zuiveren met fenol. Bij gebruik van fenol, ook heel erg verdund, elueren de tanninen echter direct van de kolom af.

### 3.1.6 Fluorescentiedetectie.

Hoewel catechine en epicatechine een heel verschillend fluorescentiekoppel hebben (catechine heeft een maximaal koppel excitatie 320 nm en emissie bij 356 nm, epicatechine een maximale excitatie bij 292 en een maximale emissie bij 316 nm.), is het toch mogelijk om fluorescentiedetectie te gebruiken (zie figuur 9). De gebruikte excitatiegolflengte was hierbij 292 nm en de emissiegolflengte was 345 nm.

Hoewel fluorescentiedetectie op zich dus bruikbaar is levert het geen voordelen op boven UV-detectie.

### 3.2 Straight phase scheiding met een CN kolom.

Wilson (1980), voert een straight phase scheiding uit op een Zorbax CN kolom. Deze kolom zou een scheiding geven, nog meer op molekulgewicht. De door ons gebruikte kolom was 15 cm Wilson gebruikt een kolom van 25 cm. De deeltjesgrootte van de kolom is 6  $\mu\text{m}$ .

De te behalen gevoeligheid bleek met deze kolom een stuk lager te liggen door de UV absorptie van tetrahydrofuran. Bij het soort gradienten noodzakelijk om de proanthocyaniden van de kolom af te elueren loopt de basislijn sterk op zelfs bij gebruik van gradientgrade kwaliteit.

De extracten, die normaal veel water bevatten, kunnen niet zomaar geïnjecteerd worden, omdat het water een grote 'ghost' piek geeft. Een monstervoorbehandeling over een Seppak C18 kolommetje gevolgd door elutie met methanol verhelpt dit probleem. In figuur 10a en b is een injectie te zien van een waterig extract van hele bonen en een van schillen. Figuur 10c en d geeft weer hoe een injectie eruit ziet na voorzuivering met Seppak en voor de hele bonen ook met een fenolextractie. Omdat de straight-phase scheiding een soortgelijke 'bult' te zien geeft als de reversed-phase scheiding, werd de 'bult' analoog aan de reversed-phase scheiding met een stappen-gradient in pieken opgedeeld.

In tegenstelling tot bij de reversed-phase scheiding waar de piekverhouding van de monsters verschillend was, was bij de straight-phase scheiding de piekverhouding steeds ongeveer gelijk (zie bijv. figuur 11). Het witbloeiende ras week wel af in die zin dat er helemaal geen pieken te zien waren (figuur 11c).

#### 3.2.1 Het uitvangen en opnieuw injecteren van de pieken en het aantonen van proanthocyanidines in de pieken met behulp van de vanilline/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ reactie.

Analoog aan de procedure beschreven onder punt 3.1.3 werden er ook nu weer de pieken van een aantal injecties opgevangen. Bij de straight-phase kolom werd voor een andere manier van verwerken van de fracties gekozen, omdat gezien de samenstelling van het eluens bij indampen van de fracties het restant erg zuur zou kunnen worden. Aan de fracties werd een gelijk volume water toegevoegd. Er ontstaan nu twee fasen. De waterfase werd ingedampd tot de aanwezige THF juist verdampt was en het restant werd over een Sep-pak C18 kolommetje van water en zuur ontdaan. Bij de straight-phase scheiding bleken de PA bijna volledig verdwenen te zijn. In fractie een was alleen nog een restje van de eerste piek aanwezig. Mogelijk zorgt de zuurtegraad van het eluens voor afbraak (4% azijnzuur en 2% mierzuur), hoewel de opgevangen pieken zo snel mogelijk verwerkt werden. Het experiment werd nog een tweede maal uitgevoerd, maar nu werd fractie vier het snelst geïnjecteerd in plaats van fractie een (zie figuur 11d en e). Opvallend is dat ook nu alleen een deel van de eerste piek verschijnt.

Mogelijk een restje nog niet volledig afgebroken polymeer, ervanuitgaande dat de scheiding in de straight-phase mode op molekulgewicht plaatsvindt.

### 3.2.2 De proanthocyanidines van de appel.

Ter vergelijking werd net als bij de reversed phase scheiding weer een extract van appel geïnjecteerd. De pieken komen veel sneller dan de 'piek' van de bonen (zie figuur 12). De pieken zijn wat minder mooi dan bij Wilson, dit kan komen door het lagere aantal schotels van de kortere kolom.

## 3.3 Andere kolommen

Het onbevredigende chromatografische gedrag van de PA op silicakolommen, zowel op reversed-phase als op straight-phase, wijst mogelijk op een zeer sterke interactie van de PA met het kolom materiaal. Daarom werden ook andersoortige kolommaterialen uitgetest.

### 3.3.1 De Hypercarb koolstofkolom

Een nieuw type kolom materiaal is grafiet-koolstof. Het materiaal is inert en levert een scheiding op die enigszins op een reversed-phase scheiding lijkt. Door de firma LC-service is ons een kolom (Hypercarb) ter beschikking gesteld om uit te proberen. Vele eluentia (o.a. H<sub>2</sub>O, MeOH, ACN, THF, hexaan en 2-propanol) werden uitgetest, maar de PA waren niet van de kolom af te krijgen. Bij het enige eluens waarbij het lukte om de PA van de kolom te elueren, namelijk dioxaan, bevonden zich alle PA in de doorloop. Geprobeerd is door het maken van mengsels van methanol en/of water met dioxaan om een eluenssamenstelling te vinden waarbij retentie en scheiding optreedt. Dit is helaas niet gelukt.



### 3.3.2 Een straight-phase kolom met amineringsreagens (zwakke anionenwisseling).

Onderzocht werd of een scheidingsmechanisme gebaseerd op zwakke anionenwisseling geschikt is voor de scheiding van de PA. Bij dit type scheiding zou de retentie van de PA bepaald worden door interactie tussen de hydroxylgroepen van de PA en de, in dit geval, aminogroepen van de stationaire fase. Gekozen werd voor een dynamische anionenwisselingskolom, een straight-phase kolom met amineringsreagens (tetraethyleen-pentamine, TEPA of putrescine 0.02% met en zonder polyethyleenglycol 0.2%) in de mobiele fase, die wordt gebruikt voor het scheiden van polysacchariden.

Straight-phase kolommen met amineringsreagens worden gebruikt voor het scheiden van polysacchariden (bijv. Praznik, 1984).

Van een extract van schillen werd wel scheiding verkregen, maar de scheiding was niet reproduceerbaar. De pieken uit de schillen waren echter verdwenen na een verdere zuivering met Sephadex LH-20 (zie 3.1.5.2). Ook hadden de pieken geen absorptie bij 500 nm (zie 3.1.4.2). De pieken konden dus geen proanthocyanidines zijn. Suikerbevattende verbindingen, zoals rutine (een flavonolglycoside) werden wel gescheiden, catechine niet (zie figuur 13).

## 4 DISCUSSIE EN CONCLUSIE

Met een stapsgewijze gradient is het mogelijk om op een reversed-phase kolom een reproduceerbare scheiding van de PA in een aantal brede pieken te krijgen. Bekend is dat, op gewichtsbasis, de gepolymeriseerde gecondenseerde tanninen een minder sterke reactie geven met vanilline dan de monomeren. De UV-absorptie daarentegen neemt evenredig toe met het aantal bouwstenen van de polymeren. De elutievolgorde op de HPLC wordt geacht min of meer volgens molecuulgewicht te zijn. Er is dus een responsverschil voor beide methoden tussen de monomeren en de polymeren. Beide methoden zouden dus een verschillend soort informatie kunnen geven. De gevonden hoge correlatie van de eerste hoge piek uit het chromatogram met de vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methode en de lage correlatie van de overige pieken wijst in dezelfde richting. De verkregen scheiding is echter onvoldoende om de samenstelling van de PA in afzonderlijke componenten te kunnen bepalen.

Door middel van een voorzuivering met Sephadex LH-20 minikolommetjes kan de tijdrovende stap van het ontschillen van de bonen vermeden worden. Het overgrote deel van de storende eiwitten uit de kernen wordt zo uit het extract verwijderd. Een andere methode om het ontschillen te vermijden is de extractieprocedure van Hussein (1990), maar deze procedure is veel tijdrovender dan de Sephadex LH-20 methode, terwijl deze laatste methode zelfs nog iets schonere chromatogrammen oplevert (vergelijk figuur 11d en e). Met de straight phase scheiding is het weliswaar mogelijk om een soortgelijke scheiding te krijgen als bij de reversed phase scheiding, maar de scheiding kon niet gereproduceerd worden na uitvangen en opnieuw injecteren van de

afzonderlijke pieken. In het geval dat de scheidingsproblemen zijn terug te voeren op oxidatie, zou deze oxidatie al tijdens het rijpingsproces plaatsgevonden moeten hebben en niet tijdens het bewaren.

Het is mogelijk, dat de PA van fababonen bestaan uit een gecompliceerd mengsel van polymeren van verschillende polymerisatiegraad, waarbij van iedere polymeer een groot aantal stereoisomeren voor kunnen komen en polymeren opgebouwd kunnen zijn uit verschillende monomeren. In appel komen vooral di- en trimeren voor waarbij het aantal mogelijke combinaties nog redelijk beperkt is, deze zijn goed te scheiden. Wanneer het molekulgewicht toeneemt nemen ook het aantal mogelijke combinaties drastisch toe. Het scheidend vermogen van het HPLC-systeem is in dat geval ontoereikend. Jammer genoeg is het niet gelukt om met alternatieve kolommen (een Hypercarb koolstofkolom en een geamineerde silicakolom) een scheiding te bewerkstelligen.

## 5 LITERATUUR

Bullard, R.W., J.O. York, S.R. Kilburn  
J. Agric. Food Chem. (1981), 29, 973-981.

Hussein, L., M.A. Fattah, E. Salem  
Characterization of pure proanthocyanidins isolated from the hulls of Faba beans  
J. Agric. Food Chem., (1990), 38, 95-98.

Kuhla, S., C. Ebmeier  
Untersuchungen zum Tanningehalt in Ackerbohlen.  
Arch. Tierernaerung, (1981), 31, 573-588.

Lea, A.G.H.  
RP-HPLC of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidising apple juices using a pH shift technique.  
J. Chrom. (1982), 238, 253-257.

Mueller-Harvey, I., J.D. Reed, R.D. Hartley  
Characterisation of phenolic compounds, including flavonoids and tannins, of ten Ethiopian browse species by HPLC.  
J. Sci. Food Agric., (1987), 39, 1-14.

Praznik, W., R.H.F. Beck, E. Nitsch  
Determination of fructan oligomers of degree of polymerisation 2-30 by HPLC.  
J. Chrom., (1984), 303, 417-421.

Praznik, W., R.H.F. Beck

Preparative separation by HPLC of an extract of oak wood and determination of the composition of each fraction.

J. Chrom. (1988), 457, 431-436.

Puech, J.L., P. Rabier, M. Moutounet

Preparative separation by HPLC of an extract of oak wood and determination of the composition of each fraction.

J. Chrom. (1988), 457, 431-436.

Putman, L.J., L.G. Butler

Separation of high molecular weight Sorghum procyanidins by HPLC.

J. Agric. Food Chem, (1989), 37, 943-946.

Spanos, G.A., R.E. Wrolstad

Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thomson seedless grape juice.

J. Agric. Food Chem., (1990), 38, 1565-1571.

Venema, D.P.

Bepaling van het tanninegehalte van Vicia faba bonen met de vanilline/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methode.

Rikilt rapport 90-34.

Wheals, B.B., P.C. White

In situ modification of silica and its use in separating sugars by HPLC.

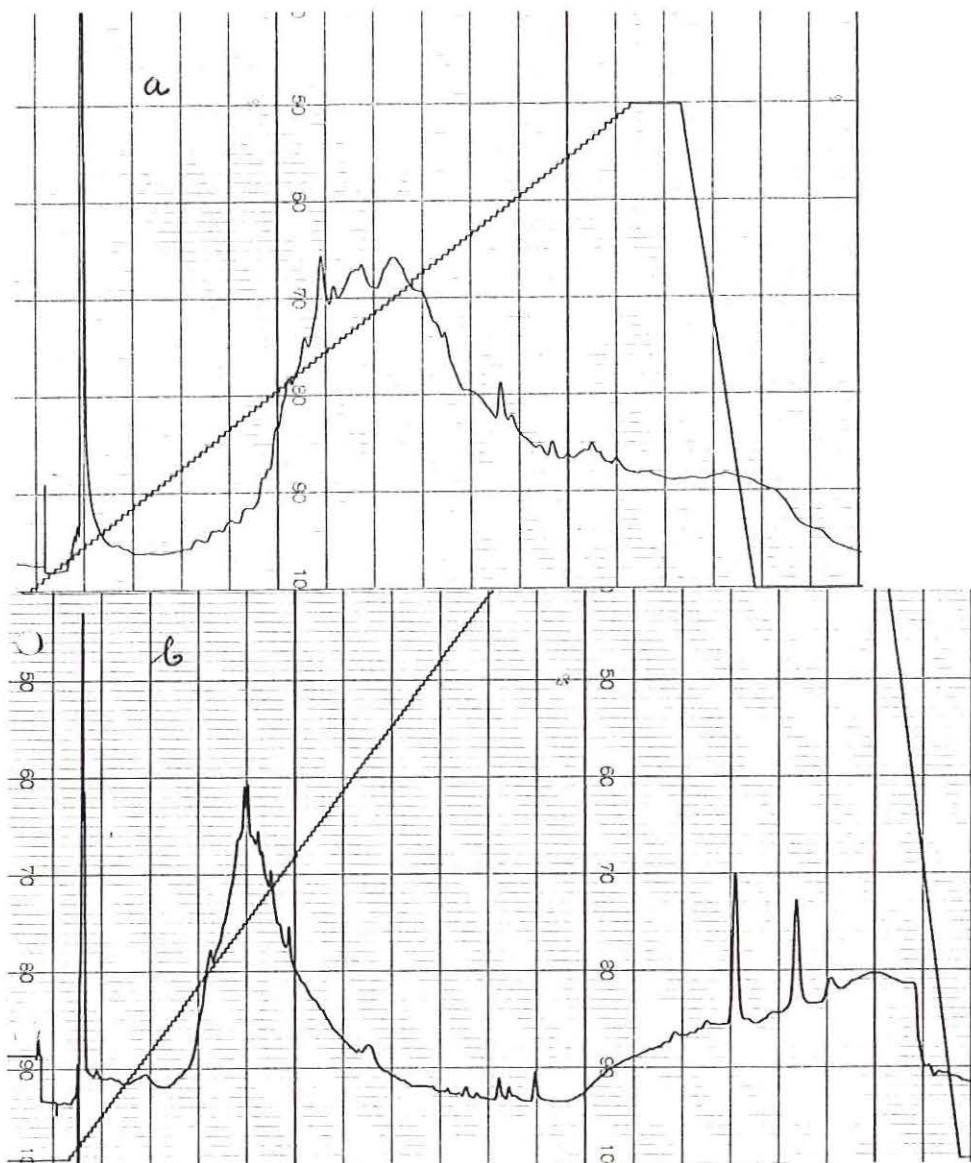
J. Chrom., (1979), 176, 421-426.

Wilson, E.L.

HPLC of apple juice phenolic compounds.

J. Sci. Food Agric., (1981), 32, 257-264.



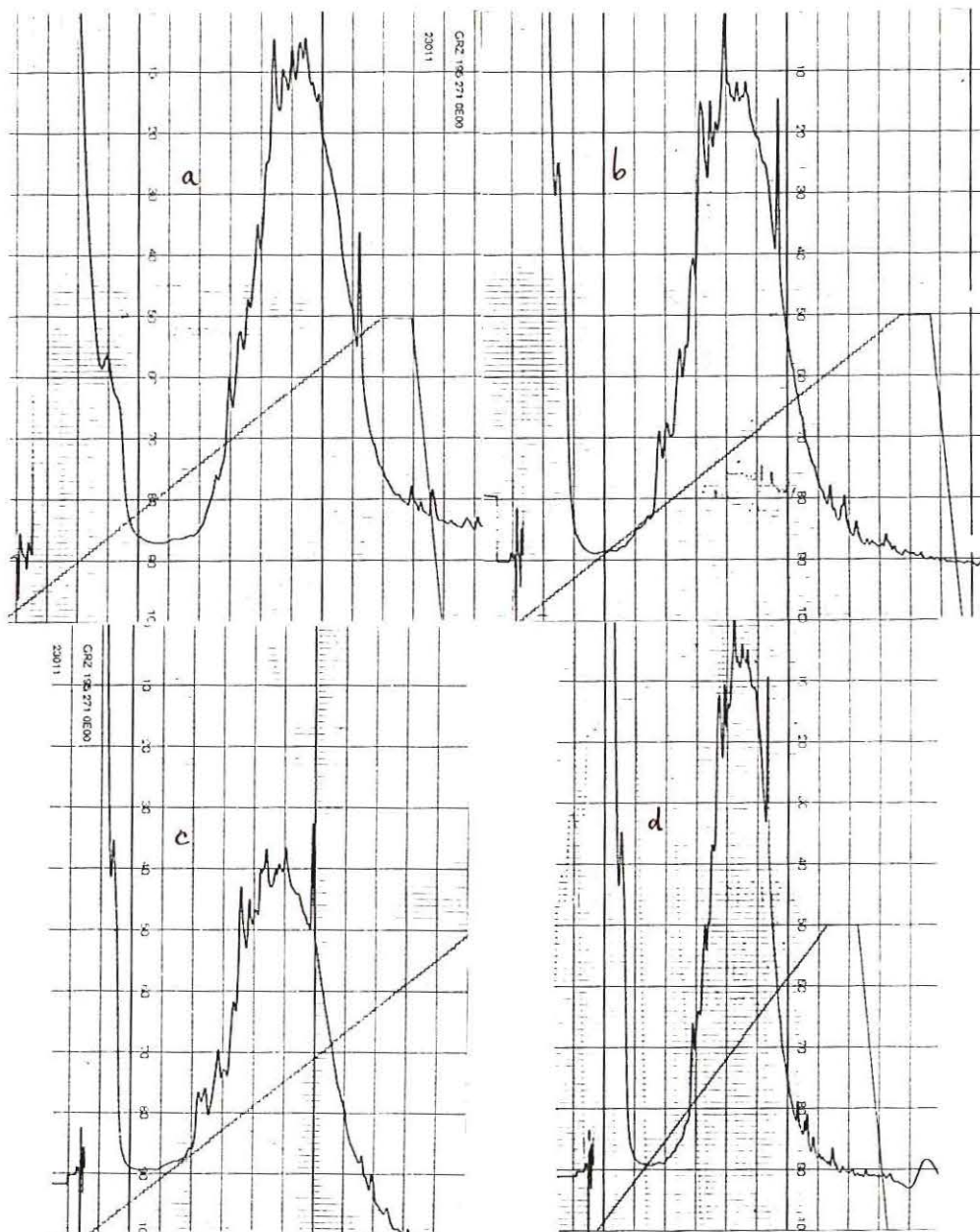


Figuur 1: Vergelijking van de Novapak C18 en de Ultrapore C3 kolom.

Conditie: zie materiaal en methoden. Monster: 80% DMF extract van schillen.

a. Novapak C18 kolom

b. Ultrapore C3 300 Å (widepore) kolom.



Figuur 2: Het effect van een verschil in flowsnelheid.

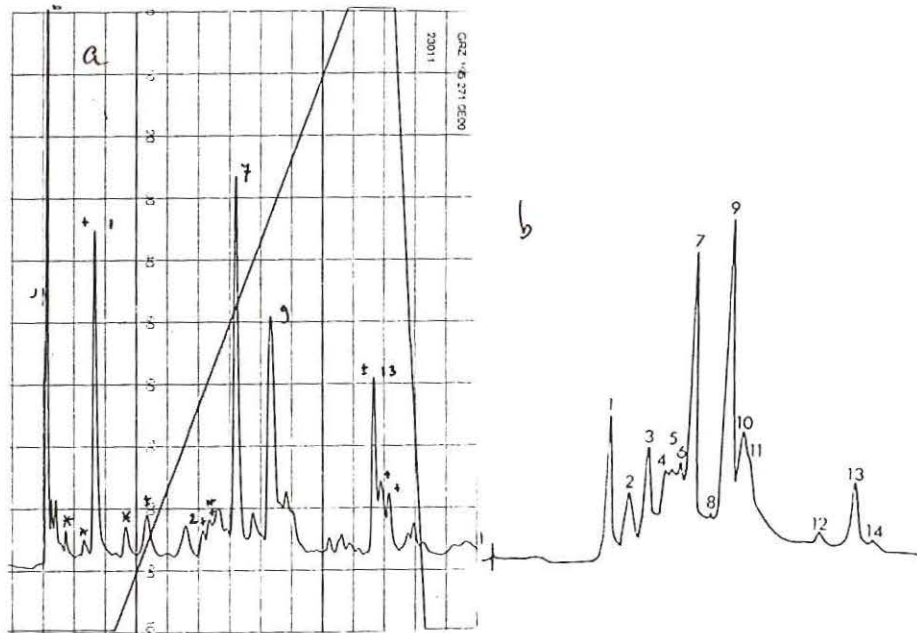
Monster: 70% acetonextract van hele bonen na zuivering over een LH-20 minikolommetje.

a. flow 0.5 ml/min 0.1 AUFS

b. flow 1.0 ml/min 0.05 AUFS

c. flow 1.5 ml/min 0.05 AUFS

d. flow 1.5 ml/min, snellere gradient, 0.05 AUFS



Figuur 3: Chromatogram van appelsap.

Monster: Appelsap verhit met 200 ppm SO<sub>2</sub>.

a. Novapak C18 kolom

b. Scheiding volgens Wilson (1981), Bondapak C18 kolom

Identificatie van de pieken:

1. chlorogenic acid (met standaard)

2. catechine (met standaard)

7. B2 (dimeer van epicatechine), geen abs 320nm, wel adsorptie Sephasorb.

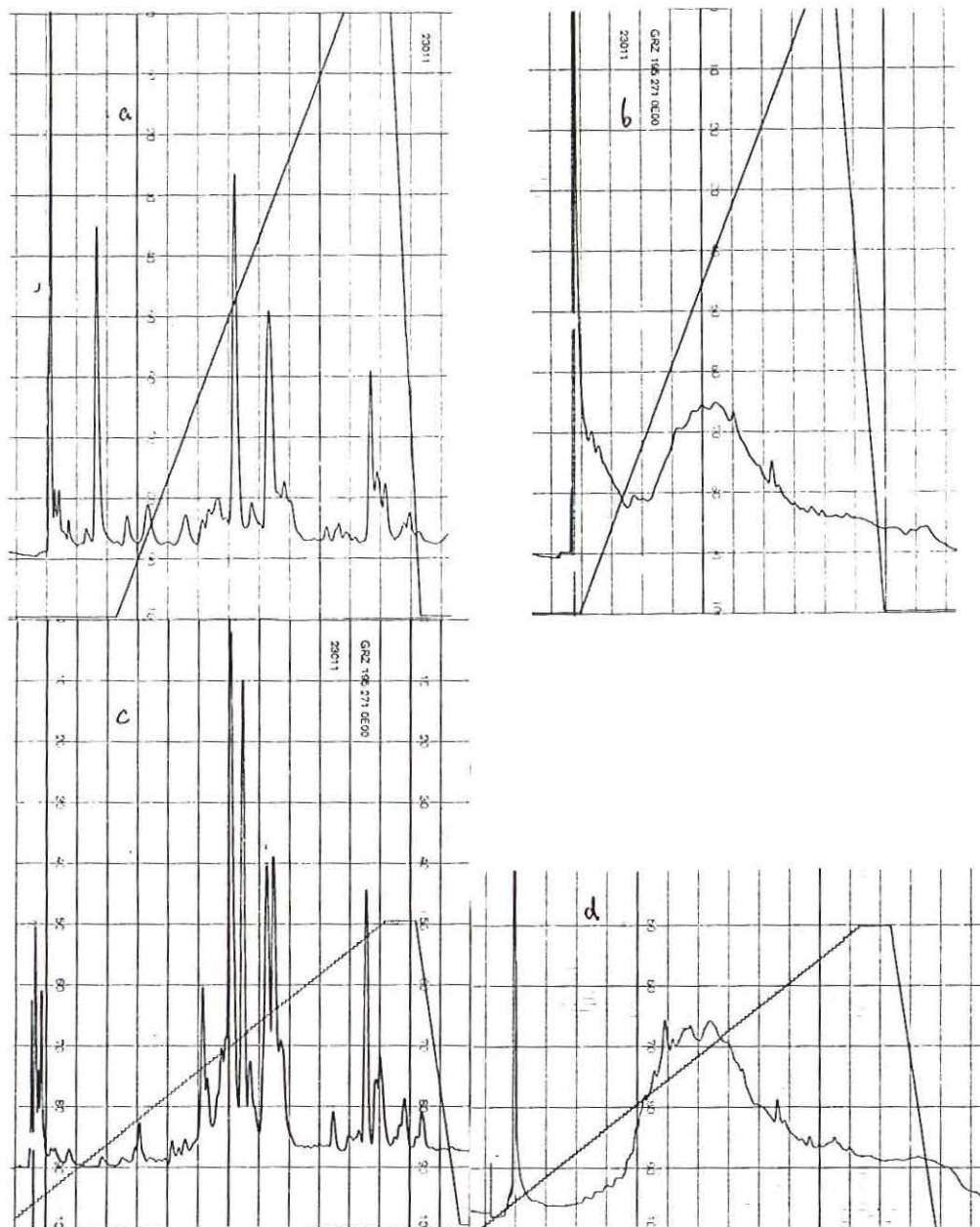
9. epicatechine (met standaard), met polymeren epicatechine?

13. phloretine/phloridzin? (wel enige abs bij 320nm)

tussen piek 2 en piek 7 moet B1 (dimeer van epicatechine en catechine) zitten.

+ pieken met absorptie bij 320 nm.

\* pieken die verdwenen zijn na Sephasorbkolom.



Figuur 4: Vergelijking chromatografie met fosfaateluens (Wilson) en met azijnzuureluens, zowel voor appelsap als voor schillen van fababonen.

fosfaateluens: eluens A:  $0.1M\ KH_2PO_4/MeOH=90/10$

eluens B:  $0.1M\ KH_2PO_4/MeOH=60/40$

azijnzuureluens: zie materiaal en methoden

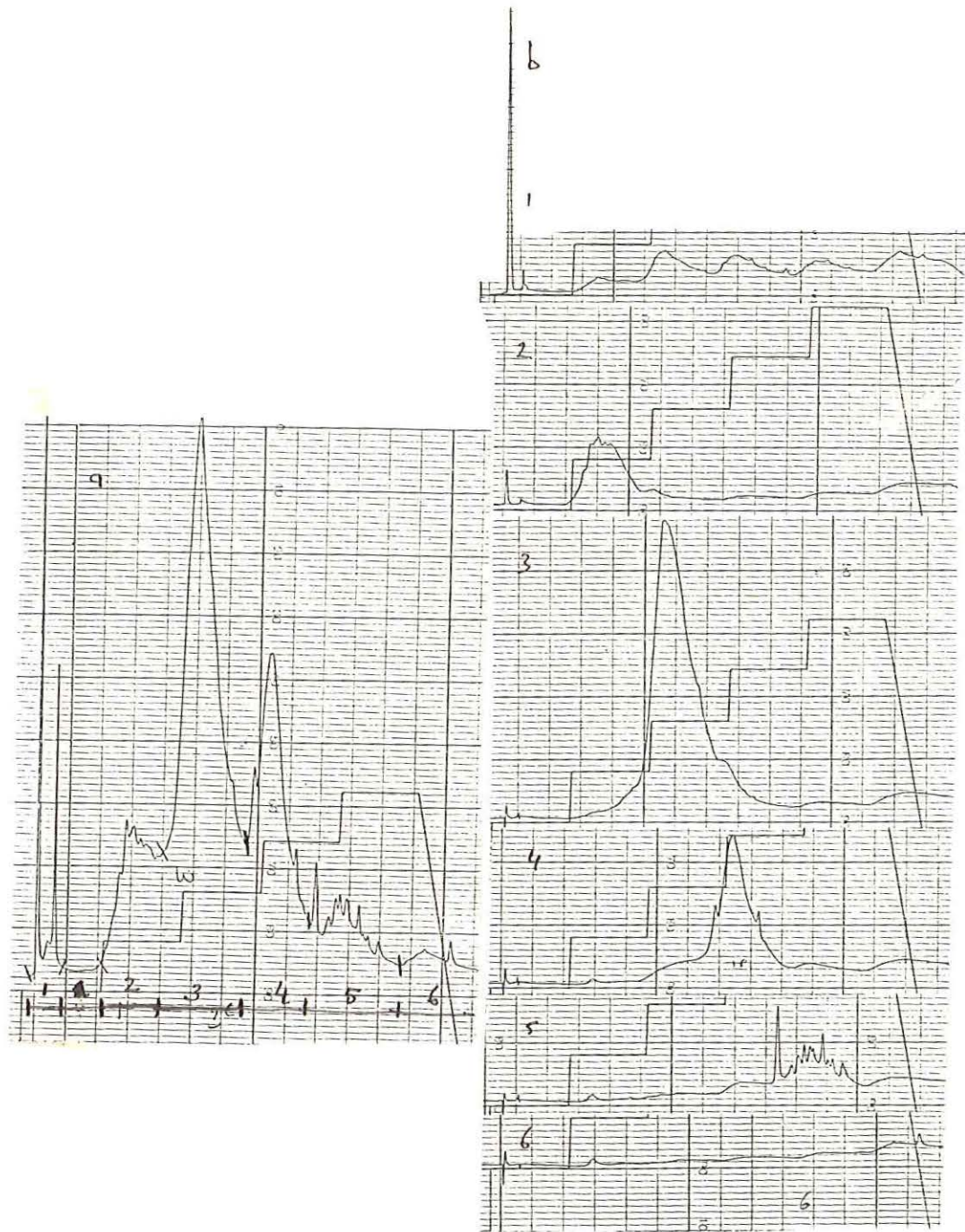
a. appelsap fosfaateluens

b. DMF-extract van schillen van fababonen fosfaateluens

c. appelsap azijnzuureluens

d. DMF-extract van schillen van fababonen azijnzuureluens





Figuur 5: Uitvangen van fracties na stapsgewijze gradient en opnieuw injecteren.

Monster: DMF-extract van schillen van fababonen

a. totaal

b. uitgevangen fracties

extinctie van de uitgevangen fracties na reactie met vanilline/ $H_2SO_4$

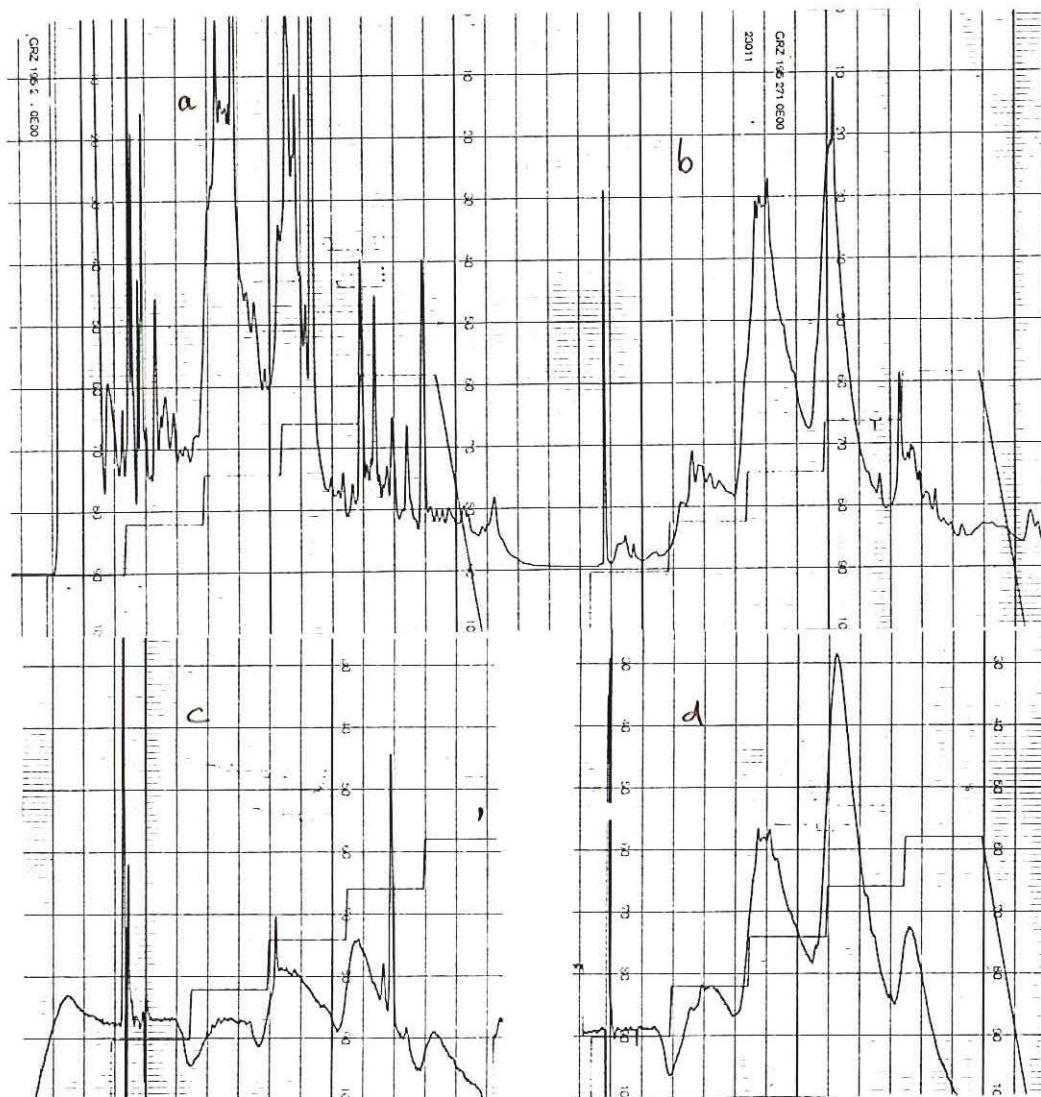
ext 500 nm: fr 1. 0.723, fr 2. 0.376, fr 3. 0.979, fr 4. 0.437, fr 5. 0.164, fr 6. 0.087





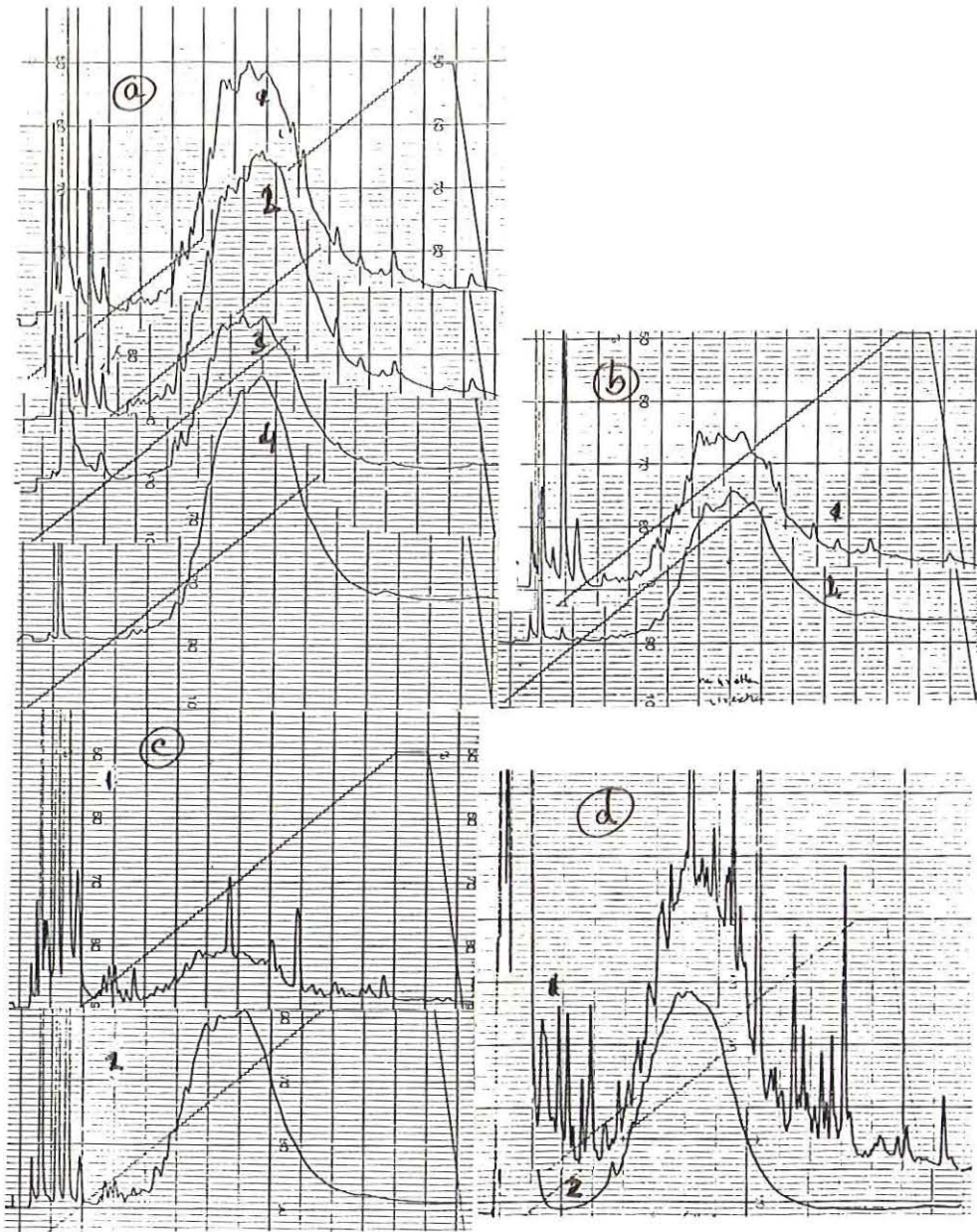
Figuur 6: Voorbeelden van chromatogrammen verkregen met een stapsgewijze gradient, methanolextracten verkregen van het SVP van drie bontbloeiende rassen en een witbloeiend ras.

- a. H\*R bontbloeiend
- b. M\*P bontbloeiend
- c. S\*S bontbloeiend
- d. S\*S witbloeiend



Figuur 7: Vergelijking van chromatogrammen verkregen bij 280 nm en bij 500 nm.

- a. 280 nm 0.2 AUFS, extract van hele bonen
- b. 280 nm 0.2 AUFS, extract van schillen
- c. 500 nm 0.002 AUFS, extract van hele bonen
- d. 500 nm 0.002 AUFS, extract van schillen



Figuur 8: Vergelijking van de verschillende zuiveringsmogelijkheden.

a. zuivering van schillen volgens Hussein (1990)

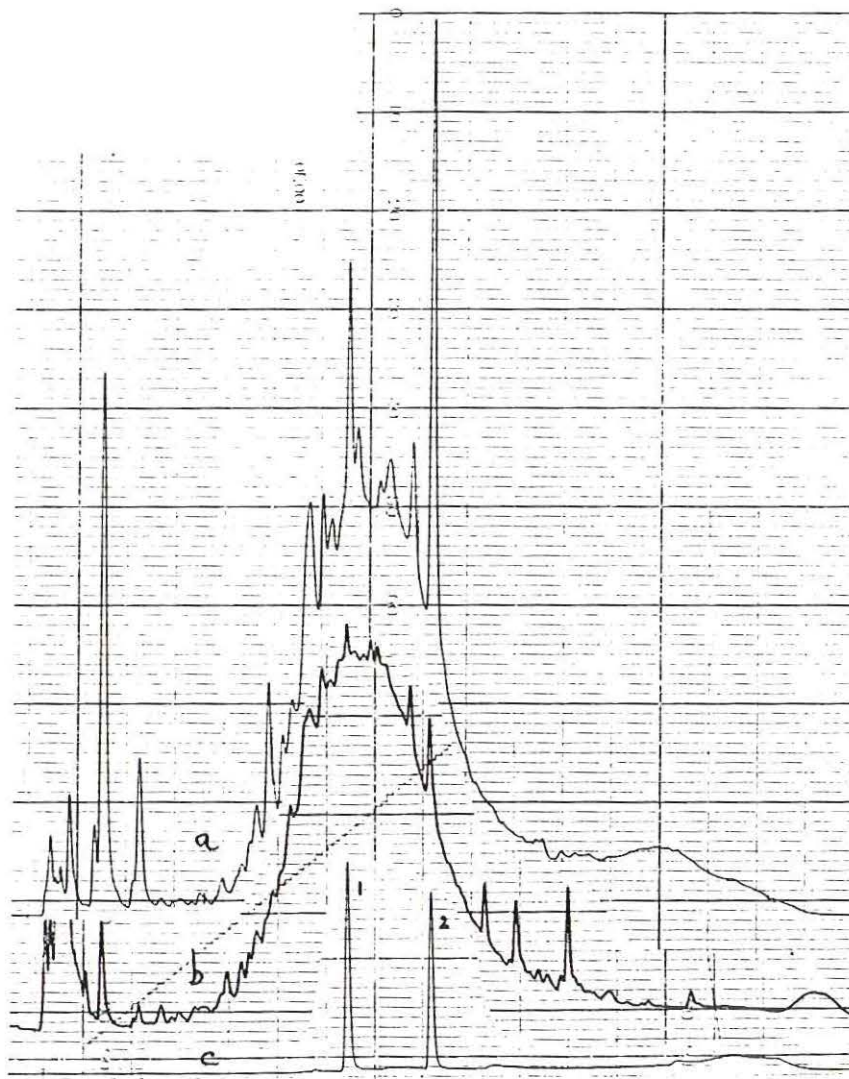
1. extract van schillen in 70 % aceton, aceton afgedampt
2. extract van 1. na tweemaal uitschudden met ethylacetaat
3. extract van 2. na Sephadex LH-20 acetonelutie, aceton afgedampt
4. extract van 3. na fenol- en etherextractie

b. Aceton extract van schillen voor (1) en na (2) fenol- en etherextractie

c. als b. maar extract gemaakt van hele bonen

d. acetonextract van hele bonen, na Sephadex LH-20 minikolommetje elutie met ethanol, daarna elutie met aceton.





Figuur 9: Vergelijking van UV-detectie met fluorescentie-detectie.

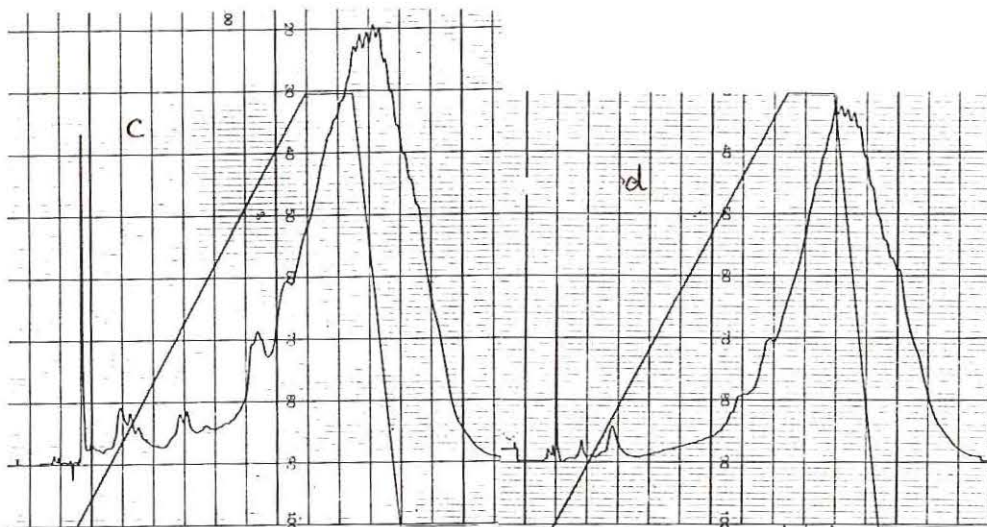
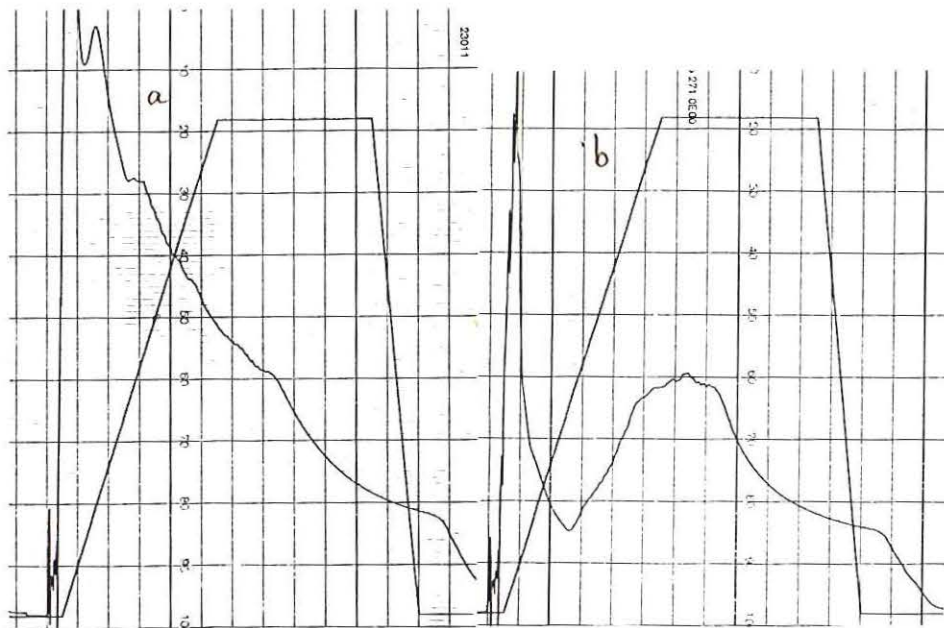
a. acetonextract van schillen, aceton afgedampt. Detectie met fluorescentie, excitatiegolflengte: 292 nm emissiegolflengte: 345 nm, sens. 0.2

b. zelfde extract als onder a. Detectie met UV, golflengte 280 nm, 0.2 AUFS

c. Fluorescentiedetectie als a. van

1. catechine

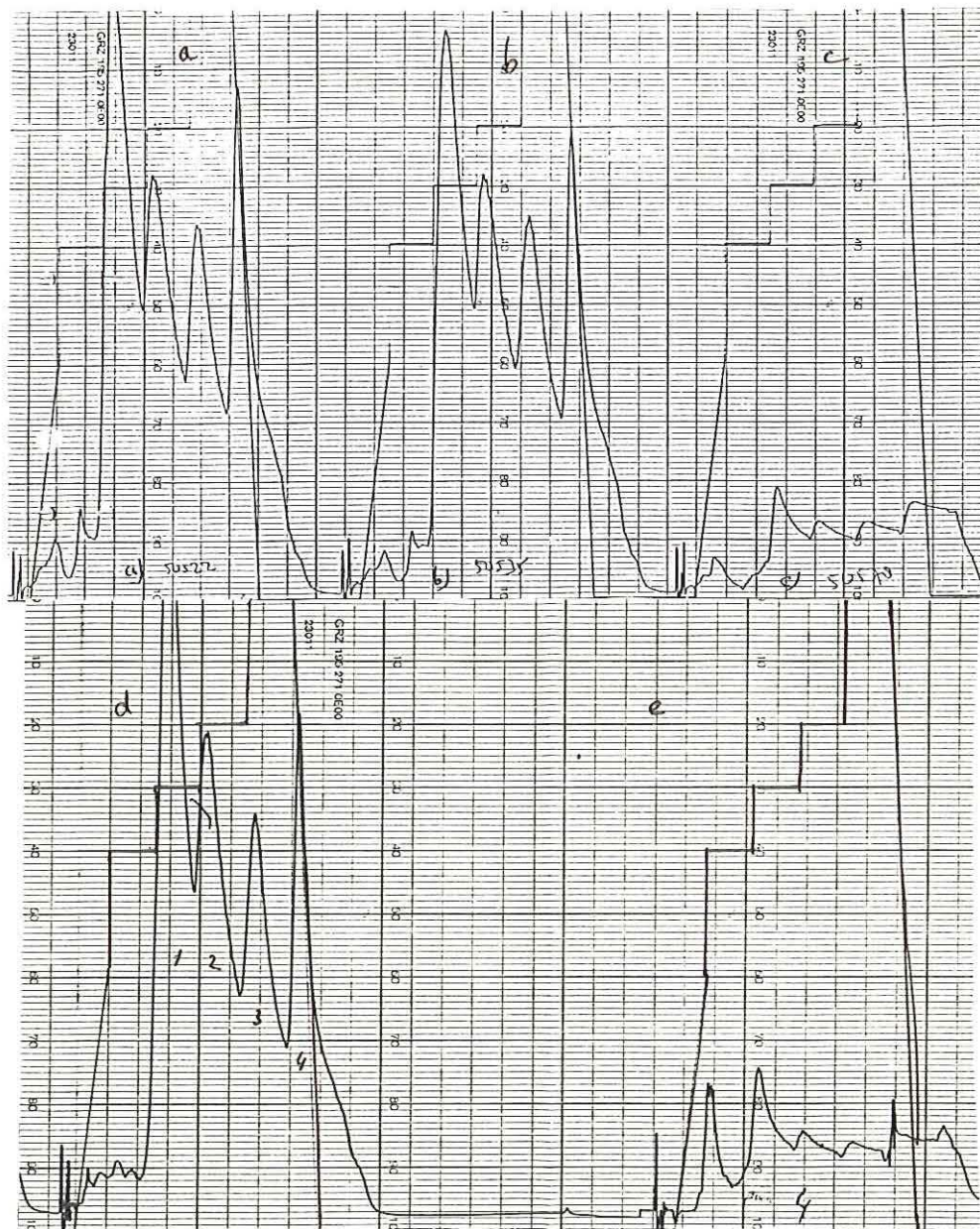
2. epicatechine



Figuur 10: Chromatogrammen verkregen met straight-phase-scheiding op een Zorbax-CN kolom. Eluens zie materiaal en methoden.

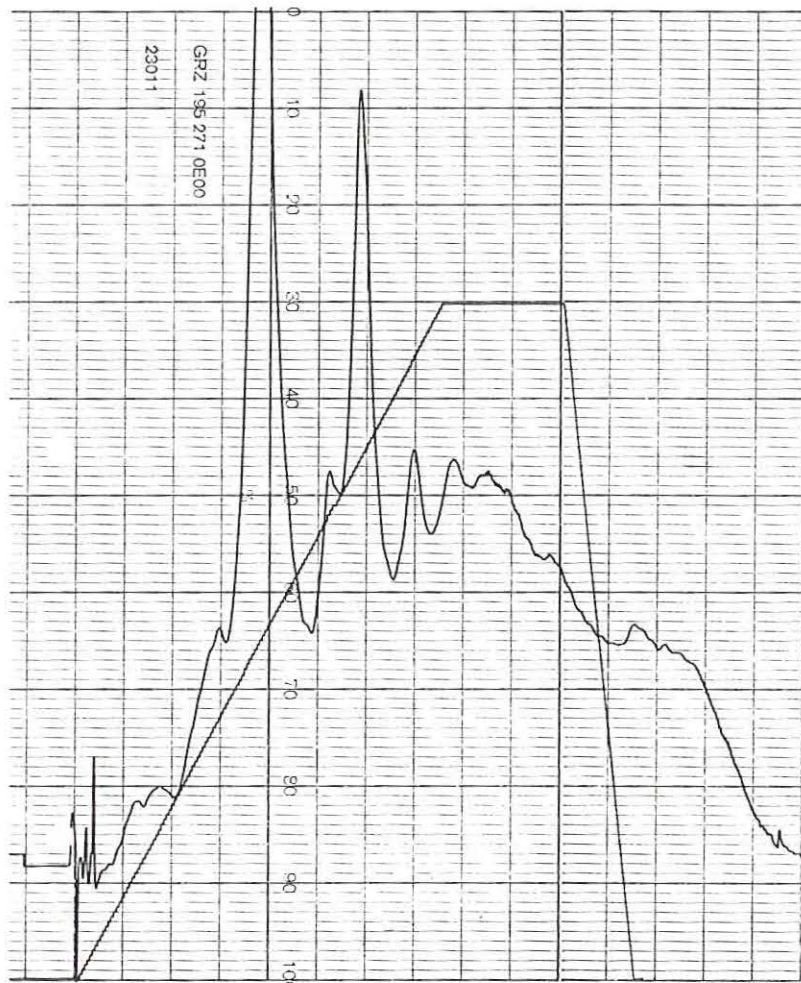
- a. chromatogram van extract van hele boon in 70% aceton, aceton afgedampt
- b. chromatogram van extract van schillen in 70% aceton, aceton afgedampt
- c. chromatogram van extract van schillen na Seppak-C18 en elutie met methanol
- d. chromatogram van extract van hele bonen van fenolextractie en Seppak-C18, elutie met methanol



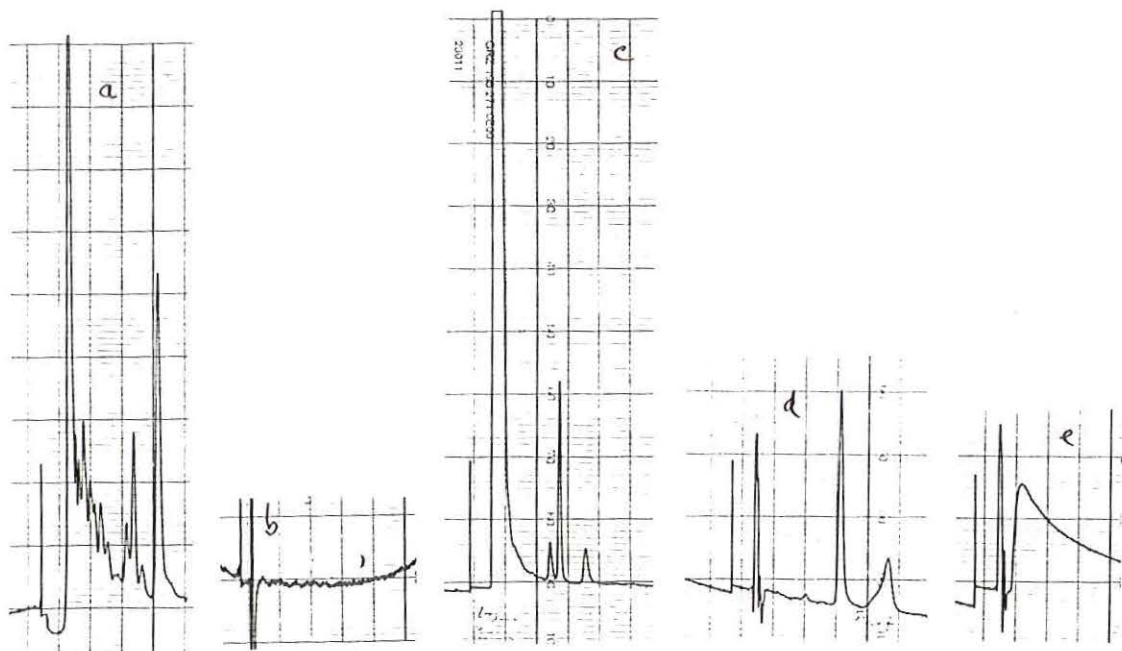


Figuur 11: Chromatogrammen verkregen met straight-phase scheiding op Zorbax-CN kolom met een stappengradient.

- a. Troy bontbloeiend ras
- b. Myther bontbloeiend ras
- c. Blandine witbloeiend ras
- d. chromatogram voor het uitvangen van pieken
- e. piek 4 na uitvangen (verdere beschrijving zie onder punt 3.2.1)



Figuur 12: Chromatogram van appelsap verkregen met straight-phase scheiding op een Zorbax-CN kolom.



Figuur 13: Voorbeelden van scheiding op de geamineerde straight-phase kolom.  
 Eluens ACN/H<sub>2</sub>O=75/25 met 0.01% TEPA, 280 nm, 0.05 AUFS

- a. Scheiding van een acetonextract
- b. Detectie bij 500 nm en 0.005 AUFS
- c. Extract van a. na zuivering op LH-20 minikolommetje
- d. Scheiding van rutine, een flavonolglycoside
- e. Scheiding van catechine