

Dissertation

**Proanthocyanidins in barley and malt analyzed  
by pressurized liquid extraction, solid-phase  
extraction and HPLC**

BENNO F. ZIMMERMANN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.  
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Nov. 2005

Dieses Buch wurde mit  $\text{\LaTeX}$  auf einem *iBook* und einem *iMac* geschrieben.  
Gedruckt auf Recyclingpapier.

Berichte aus der Chemie

**Benno F. Zimmermann**

**Proanthocyanidins in barley and malt analyzed  
by pressurized liquid extraction, solid-phase  
extraction and HPLC**

D 98 (Diss. Universität zu Bonn)

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften,  
Fachgebiet Lebensmittelchemie I

Shaker Verlag  
Aachen 2005

**Bibliographic information published by Die Deutsche Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data is available in the internet at <http://dnb.ddb.de>.

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4723-8

ISSN 0945-070X

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

# Contents

<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>vii</b>
<b>Publications</b>	<b>ix</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Aim of this Work . . . . .	2
1.2 Structure of Proanthocyanidins . . . . .	4
1.3 Nomenclature of Proanthocyanidins . . . . .	4
1.4 Analysis of Proanthocyanidins . . . . .	7
1.4.1 Sample Preparation . . . . .	7
1.4.1.1 Extraction . . . . .	7
1.4.1.2 Clean-Up . . . . .	10
1.4.1.3 Further Concentration . . . . .	11
1.4.2 Analysis . . . . .	11
1.4.2.1 HPLC . . . . .	11
1.4.2.2 Other Techniques . . . . .	13
1.5 Proanthocyanidins and Brewing . . . . .	14
<b>2 Experimental</b>	<b>17</b>
2.1 Materials . . . . .	18
2.1.1 Samples . . . . .	18
2.1.2 Chemicals . . . . .	18
2.1.2.1 Solvents . . . . .	18
2.1.2.2 Standard Compounds . . . . .	18
2.1.2.3 Other Chemicals . . . . .	18
2.1.3 Consumables Supplies . . . . .	19
2.1.4 Milling . . . . .	19
2.1.5 Pressurized Liquid Extraction . . . . .	19
2.1.6 Automated Solid-Phase Extraction . . . . .	19
2.1.7 HPLC-UV- and -Electrochemical Detection . . . . .	19
2.1.8 HPLC-MS . . . . .	20

## Contents

---

2.2	Optimized Methods . . . . .	22
2.2.1	Pressurized Liquid Extraction . . . . .	22
2.2.2	Automated Solid-Phase Extraction . . . . .	22
2.2.3	HPLC . . . . .	23
2.3	Statistical Analysis . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Results</b> . . . . .	<b>25</b>
3.1	Milling . . . . .	26
3.2	Extraction . . . . .	27
3.2.1	Preparing of the Extraction Cells . . . . .	27
3.2.2	Pressure . . . . .	27
3.2.3	Temperature and Extraction Solvent Mixture . . . . .	27
3.2.4	Multiple Extraction . . . . .	31
3.2.5	Extraction Time and Multiple Extraction . . . . .	31
3.3	Coupling of PLE and Automated SPE . . . . .	33
3.4	Solid-Phase Extraction . . . . .	34
3.4.1	Loading and Eluting . . . . .	34
3.4.2	Differences between Lots . . . . .	35
3.5	HPLC . . . . .	38
3.5.1	HPLC-UV-CEAD . . . . .	38
3.5.2	HPLC-UV-MS <sup>n</sup> . . . . .	38
3.6	Reproducibility and Recovery . . . . .	41
3.6.1	Extraction . . . . .	41
3.6.2	Clean-Up . . . . .	41
3.6.3	Overall Method . . . . .	42
3.7	Content of Proanthocyanidins in Barley and Malt . . . . .	43
3.8	Further Applications . . . . .	46
3.8.1	Beer . . . . .	46
3.8.2	Açaí Seed Extracts . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Discussion</b> . . . . .	<b>51</b>
4.1	Methods and Technology . . . . .	52
4.1.1	Milling . . . . .	52
4.1.2	Extraction . . . . .	52
4.1.3	Solid-Phase Extraction . . . . .	53
4.1.4	HPLC . . . . .	53
4.1.5	Method Validation . . . . .	54
4.1.6	Time and Labor . . . . .	56
4.2	Proanthocyanidins in Barley and Malt . . . . .	57

4.2.1 Absolute Contents . . . . .	57
4.2.2 Ratio of Proanthocyanidins . . . . .	59
<b>5 Conclusion</b>	<b>61</b>
<b>Appendix</b>	<b>63</b>
<b>A Abbreviations</b>	<b>65</b>
<b>B Detailed ASPEC Settings</b>	<b>67</b>
<b>C Detailed Data Sheets</b>	<b>77</b>
C.1 Milling . . . . .	77
C.2 Extraction . . . . .	77
C.3 Hydrodynamic Voltammograms . . . . .	81
C.4 MS Data . . . . .	86
C.5 Content of Proanthocyanidins . . . . .	93
C.6 Scatterplots . . . . .	98
C.7 Peak Ratios . . . . .	107
<b>List of Figures</b>	<b>113</b>
<b>List of Tables</b>	<b>115</b>
<b>Bibliography</b>	<b>117</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>131</b>
<b>Curriculum vitæ</b>	<b>133</b>

*Contents*

---



## Abstract

Aim of this work is to develop a convenient method for the determination of proanthocyanidins in barley and malt. In a second step this method is applied to 61 barley and malt samples of different varieties, proveniences and growing years.

In the brewing industry proanthocyanidins are of special interest. Main activities of the proanthocyanidins are related to undesired formation of chill haze and to the positively valued augmentation of the antioxidative capacity of beer. The detailed mechanisms are still under discussion. It is clear, that the positive and negative effects of proanthocyanidins depend on their quantity and quality. So determination of the sum of proanthocyanidins does not give sufficient information to discuss their action.

Selective analysis of proanthocyanidins is time and labor consuming. Especially sample preparation requires a lot of manual work. Thus, this work presents a fully automated and therefore fast and reliable method for sample preparation of barley and malt followed by HPLC-UV.

The here described method bases on extraction using pressurized liquid extraction (PLE). Essentially it is a static solid/liquid extraction with high pressure and eventually high temperature in stainless steel extraction cells. Using the *Accelerated Solvent Extractor* (ASE) by *Dionex*, up to 24 samples in a series can be extracted automatically.

The second step of sample preparation is clean-up by solid-phase extraction (SPE). For the first time, commercially available polyamide cartridges are used for proanthocyanidins. SPE is accomplished automatically by a liquid handling robot, the *Automated Sample Preparation with Extraction Cartridges*-device (ASPEC) by ABIMED and Gilson. The ASPEC takes the extracts from the ASE and carries out the complete SPE procedure. The resulting solution is ready to inject into the HPLC, that separates and quantifies six proanthocyanidins and catechin in one run of 90 min.

Sample extraction and extract clean-up are coupled online. This coupling was developed by ABIMED and Dionex and is tested and established under real laboratory conditions for the first time. Within 24 hours 16 samples can be analyzed, about 6 hours of manual work is needed. Recovery of the overall method is 70–91 %, reproducibility is 2.3–6.4%.

With this method 61 barley and malt samples of the growing years 1998-2001 from four locations including summer and winter barley varieties are analyzed. The annual and local variation of absolute contents of proanthocyanidins appears to interfere varietal differences, so differentiation between the samples is not possible. The ratio of several pairs of proanthocyanidins (the relative quantitative polyphenolic fingerprint) is characteristic for the variety and can be used to control authenticity.

In addition, the here presented method is supposed to be applicable to samples taken during the brewing process and to other food samples. Two examples are given: monitoring beer filtration and analyzing proanthocyanidins in the seeds of the açai fruit from northern Brazil. Since proanthocyanidins are discussed to have positive effects on health, there is a market for functional food with naturally high or enriched content of proanthocyanidins. Hence it is necessary to control such products.

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist, eine leicht durchführbare Methode zur selektiven Bestimmung von Proanthocyanidinen in Gerste und Malz zu entwickeln. Als zweiter Schritt wird diese Methode auf 61 Gersten- und Malzproben verschiedener Sorten, Anbauorte und Jahrgänge angewandt.

Im Brauereiwesen spielen die Proanthocyanidine eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Eigenschaften der Proanthocyanidine sind die Bildung von unerwünschten Kältetrübungen und die positiv bewertete Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Bieres. Die einzelnen Reaktionen und genauen Mechanismen sind noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Fest steht, daß die positiven und negativen Effekte der Proanthocyanidine von ihrer Art und Menge abhängen. Daher bringt die Bestimmung von Summenparametern keine ausreichende Information, um die Wirkungen zu diskutieren.

Die selektive Analyse von Proanthocyanidinen ist sowohl zeit- als auch arbeitsaufwendig - vor allem die Probenvorbereitung erfordert viel Handarbeit. Hier wird eine vollautomatische und daher schnelle und zuverlässige Methode für die Probenvorbereitung von Gerste und Malz zur anschließenden HPLC-UV-Analyse vorgestellt.

Die hier beschriebene Methode basiert auf der Extraktion mittels beschleunigter Lösemittelextraktion (*pressurized liquid extraction (PLE)*). Im wesentlichen ist dies eine statische fest/flüssig-Extraktion unter hohem Druck und ggf. hoher Temperatur in Edelstahlzellen. Mit dem *Accelerated Solvent Extractor (ASE)* von *Dionex* können bis zu 24 Proben in Serie automatisch extrahiert werden.

Der zweite Schritt der Probenvorbereitung ist die Aufreinigung mit Festphasenextraktion (*solid-phase extraction (SPE)*). Zum ersten Mal werden kommerziell erhältliche Polyamid-Kartuschen zur Aufreinigung von Proanthocyanidinen eingesetzt. Die SPE wird vollautomatisch von einem Pipettierroboter, dem *Automated Sample Preparation with Extraction Cartridges*-Gerät (*ASPEC*) von *ABIMED* und *Gilson*, durchgeführt. Der *ASPEC* übernimmt die Extrakte von der ASE und führt die komplette SPE durch. Die resultierende Lösung kann direkt in die HPLC injiziert werden, die sechs Proanthocyanidine und Catechin innerhalb eines Laufes von 90 min trennt.

Die Probenextraktion und -aufreinigung sind online gekoppelt. Diese Kopplung wurde von *ABIMED* und *Dionex* entwickelt und wird zum ersten Mal unter

realen Labor-Bedingungen getestet und eingesetzt. Innerhalb von 24 Stunden können 16 Proben analysiert werden, dabei sind etwa 6 Stunden Personaleinsatz erforderlich. Die Wiederfindung der gesamten Methode beträgt 70-91 %, die Reproduzierbarkeit 2.3-6.4%.

Mit dieser Methode wurden 61 Gersten- und Malzsorten, darunter Sommer- und Wintergersten der Jahrgänge 1998-2001 von vier Anbauorten analysiert. Die jährlichen und lokalen Unterschiede überlagern die Sortenunterschiede, so daß keine Differenzierung zwischen den Proben möglich ist. Das Verhältnis bestimmter Paare von Proanthocyanidinen (der relative quantitative polyphenolische Fingerabdruck) ist jedoch charakteristisch für die Gerstensorte und kann zur Authentizitätskontrolle genutzt werden.

Außerdem kann die hier vorgestellte Methode auch eingesetzt werden, um Proben aus dem Brauprozess oder andere Lebensmittel zu untersuchen. Zwei Beispiele sind angeführt: die Überwachung der Bierfiltration und die Analyse von Samen der nordbrasilianischen Açaí-Frucht. Da Proanthocyanidine als gesundheitsförderlich diskutiert werden, gibt es einen Markt für Lebensmittel, die natürlicherweise viele Proanthocyanidine enthalten oder damit angereichert sind. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, solche Produkte zu überprüfen.

## Publications

Parts of this work have been published earlier:

### Papers

LICHTENTHÄLER R, RODRIGUES RB , ZIMMERMANN BF, PAPAGIANNPOULOS M, FABRICIUS H, ALMEIDA O, MAIA JGS AND MARX F: *Total Oxidant Scavenging Capacity of Euterpe oleracea* MART. (*Açai*) Seeds J Agric Food Chem (submitted)

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO M, GALENSA R (2002): *Coupling of ASE, ASPEC and HPLC - Automated Determination of Proanthocyanidins in Malt* G.I.T. Laboratory Journal Europe, 4 175-177

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G AND GALENSA R (2002): *Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt* J Chromatogr A 958 9-16

MELLENTHIN A, PAPAGIANNPOULOS M, KINITZ C, ZIMMERMANN B AND GALENSA R (2001): *Bedeutung und Analytik von Polyphenolen im Brauprozess* Lebensmittelchemie 55 143-144

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A, KRAPPE M, MAIO G AND GALENSA R (2001): *ASE-ASPEC-HPLC Kopplung - Automatisierte Bestimmung von Proanthocyanidinen in Malz* GIT 9/01 950-952

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A AND GALENSA R (2001): *Online-Kopplung von ASE, SPE und HPLC am Beispiel der Polyphenolanalytik in Malz* Lebensmittelchemie 55 66-67

## Posters

RODRIGUES RB, LICHTENTHÄLER R, PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, FABRICIUS H, MAIA JGS, ALMEIDA O AND MARX F: *Evaluation of the total Oxidant Scavenging Capacity of Açai Seeds (Euterpe oleraceae MART.)*

Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13-15<sup>th</sup> September 2004

abstract see: Lebensmittelchemie 59 2004 37

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M AND GALENSA R: *Convenience, Sensitivity and Selectivity: How to Analyze Proanthocyanidins by Online Coupled Sample Preparation and HPLC with Coulometric Electrode Array Detection*  
24<sup>th</sup> Symposium on Chromatography, Leipzig (Germany), 15-20<sup>th</sup> September 2002

ZIMMERMANN B AND GALENSA R: *Wie charakteristisch ist das Proanthocyanidinspektrum in Braugerste und Malz? – Jahrgangs- und Sortenunterschiede*

Lebensmittelchemikertag, Frankfurt (Germany), 9-11<sup>th</sup> September 2002

abstract see: Lebensmittelchemie 57 2003 30

ZIMMERMANN B AND GALENSA R: *Convenient, fast and selective analysis of proanthocyanidins is possible*

26<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Montréal (Canada), 2-7<sup>th</sup> July 2002

ZIMMERMANN B, PAPAGIANNPOULOS M, MELLENTHIN A AND GALENSA R: *Extraktion von Polyphenolen aus Getreide mit der ASE*

ASE/HPLC user symposium, Trier (Germany), 27<sup>th</sup> February 2002

ZIMMERMANN B, FRIEDRICH W AND GALENSA R: *Proanthocyanidine in Braugerste und Malz: Analytik einer Polyphenolklasse mittels ASE, SPE und HPLC-CEAD*

Lebensmittelchemikertag, Braunschweig (Germany), 10-12<sup>th</sup> September 2001

abstract see: Lebensmittelchemie 55 2001 158-159

PAPAGIANNPOULOS M, ZIMMERMANN B, MELLENTHIN A AND GALENSA R: *Online Sample Preparation and HPLC Analysis of Solid Samples*

25<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Maastricht (The Netherlands), 17-22<sup>th</sup> June 2001

---

## Oral Presentations

*Malze und Proanthocyanidine: Polyphenole automatisch analysieren*  
Regionaltagung Süd-West und Bayern of the Lebensmittelchemischen Gesellschaft,  
Würzburg (Germany), 9<sup>th</sup> March 2004  
abstract see: Lebensmittelchemie 58 2004 91

*Die ASE-ASPEC-HPLC-Kopplung: Probieren geht über Studieren*  
ABIMED user symposium, Hamburg (Germany), 5<sup>th</sup> April 2001

*Online-Kopplung von ASE, SPE und HPLC am Beispiel der Polyphenolanalytik  
in Malz oder Warum espresso besser schmeckt als Filterkaffee*  
Regionaltagung NRW of the Lebensmittelchemische Gesellschaft, Paderborn  
(Germany), 15<sup>th</sup> March 2001  
abstract see: Lebensmittelchemie 55 2001 66-67

*Die ASE-ASPEC-Kopplung in der lebensmittelchemischen Methodenentwicklung*  
ABIMED user symposium, Frankfurt a.M. (Germany), 31<sup>th</sup> October 2000