

Ontwikkeling van een fingerprint analysemethode voor de apolaire stoffen in kombucha met GC-MS



Naam: Melvin van Dijk
Datum: 07-09-2021

Ontwikkeling van een fingerprint analysemethode voor de apolaire stoffen in kombucha met GC-MS



Naam: Melvin van Dijk

Studentnummer: s1114596

Datum: 07-09-2021

Hogeschool Leiden, Chemie

Specialisatie: Organische chemie

Periode afstudeerstage: 04-01-2021 tot 04-07-2021

Afstudeer instituut: Foodlab Leiden, J.H. Oortweg 21, 2333 CH, Leiden

Externe Begeleider: Dr Angelic van der Aar en Ing Marieke Eikenboom

Abstract

Kombucha is a drink made from fermented sweetened tea. Kombucha has a sweet and sour taste, it is slightly sparkling and in recent years, the drink has become increasingly popular in the western world. This surge in popularity is in part due to the supposed health benefits.

The exact chemical composition and the effects of the fermentation conditions on the composition are relatively unknown. The goal of this study was to develop and validate a method for determining the fingerprint of apolar compounds in kombucha.

The validation was done for menthol, carvone, geraniol and caffeine. These were chosen because they are components of kombucha or representative of components.

The sample preparation is a liquid-liquid extraction of kombucha with dichloromethane as the organic solvent. Pentane and mixture of dichloromethane and pentane were tested as well. The GC-MS used a Rxi-5ms column of 30 meters and a diameter of 25 millimeter. The oven was heated with temperature gradient from 50 °C increased to 170 °C at a rate of 6 °C/min, heated further to 300 °C at a rate of 20 °C/min and held for 10 minutes.

The R^2 were determined in a range of 10 mg/mL to 100 mg/mL. The R^2 of carvone, geraniol and caffeine were 0.99, while the R^2 of menthol was 0.98. The repeatability was found to range from 10% for caffeine up to 16% for menthol. The highest LOD and LOQ were found for caffeine, with an LOD of 13.5 mg/mL and an LOQ of 45.0 mg/mL. The lowest LOD and LOQ were found for menthol, with an LOD of 1.5 mg/mL and a LOQ of 5.1 mg/mL. The reproducibility of all components were found to be unacceptable, with a standard deviation ranging from 23% for caffeine up to 30% for geraniol. The recovery was dependent on the concentration of the spike, increasing with a greater spike.

The developed method was also used to analyze kombucha. Several components were found in kombucha, such as caffeine, phenylethyl alcohol and 2,3-butanediol. However, there are several additional peaks that could not be determined.

Inhoud

Lijst met gebruikte afkortingen.....	6
Inleiding.....	7
Kombucha	7
Fermentatie	7
YAYA kombucha en het Foodlab.....	8
Doel	8
Analysetechniek	9
Vloeistof-vloeistofextractie.....	9
Standaard	9
Gaschromatografie.....	10
Massaspectrometer	10
Validatie	11
Herhaalbaarheid.....	11
Detectielimiet.....	12
Reproduceerbaarheid	12
Proefopzet.....	13
Experimenteel.....	14
Chemicaliën.....	14
Apparatuur.....	14
Materialen.....	14
Mengstandaard.....	14
Validatiestandaard	14
Kombucha methode.....	14
Monstervoorbewerkingmethode	15
GC-MS methode.....	15
Validatie	15
Resultaten en discussie.....	16
GC-instellingen	16
Extractiemethodes.....	18
Kombucha	22
Validatie	25
Lineariteit	25
Herhaalbaarheid	25
LOD en LOQ.....	26
Reproduceerbaarheid	26

Recovery.....	27
Conclusie en aanbevelingen	29
Conclusie	29
Aanbevelingen	29
Referentielijst.....	30
Bijlage.....	32

Lijst met gebruikte afkortingen

SCOBY = Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast
HPLC = High-Performance Liquid Chromatography
GC-MS = Gas Chromatography–Mass Spectrometry
LLE = Vloeistof-vloeistofextractie
QMS = Quadrapool Massa Spectrometrie
EI = Elektronenionisatie
LOD = Limit Of Detection
LOQ = Limit Of Quantification
DCM = Dichloormethaan
PTV = programmed temperature vaporizer

Inleiding

Kombucha

Kombucha is een gefermenteerde drank gemaakt van zoete thee.¹ Kombucha is een heldere, gele tot oranje drank. Het is lichtbruisend, verfrissend en heeft een zoetzure smaak. Tijdens de fermentatie worden suikers van de aangezoete thee omgezet naar zuren. Dit wordt gedaan door een verzameling van verschillende gisten en bacteriën, de Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast (SCOBY). Naast dat de SCOBY suikers omzet in zuren, wordt tijdens de fermentatie ook een cellulose laag boven op de kombucha gevormd met de SCOBY erin. Bij de omzetting van suiker naar alcohol wordt ook CO₂ gevormd, wat zorgt voor het bruisende effect.

Hoewel thee al heel lang bekend is in Europa, is kombucha veel nieuwer. Kombucha vindt zijn oorsprong in oosten van Azië, in de streek Mantsjoerije.² Gedurende de 20e eeuw verspreidde kombucha zich door Europa. De laatste jaren is de populariteit van kombucha sterk toegenomen in het westen. Dit komt vooral door de positieve effecten die kombucha zou hebben op de gezondheid.^{1,3} Zo zou kombucha een antibacteriële werking hebben, de kans op kanker verminderen, een ontstekingsremmend effect hebben en antioxidanten bevatten.^{1,4}

De fermentatie wordt gedaan door een verzameling van bacteriën en gisten.

De bereidingsmethodes voor kombucha verschillen per bron. Daarnaast is de precieze samenstelling van de SCOBY afhankelijk van de bron van de SCOBY.⁵ In grote lijnen wordt kombucha gemaakt door theebladeren te laten trekken in kokend water. Vervolgens wordt er extra suiker toegevoegd aan de thee. De gezoete thee wordt aangezuurd met azijnzuur of met eerder gemaakte kombucha, om de groei van ongewenste bacteriën te verminderen. Daarna wordt er een stuk SCOBY van een vorige kweek toe gevoegd. Tenslotte wordt de drank afgedekt met een doek en bewaard voor ongeveer twee weken.

Fermentatie

Kombucha wordt gemaakt met behulp van fermentatie. Fermentatie is een proces waarbij micro-organismen, zoals bacteriën en schimmels, worden gebruikt om een biologisch materiaal om te zetten naar een ander product.² Het proces van fermentatie is op vrijwel elk deel van de wereld apart uitgevonden, in de periode van de jonge steentijd. Met het fermenteren wordt de kwaliteit en functionaliteit van het voedsel aangepast en in de meeste gevallen verbeterd. Dit komt omdat er tijdens de fermentatie meer of nieuwe voedingsstoffen in het product komen.⁶ Een ander belangrijk effect is dat de houdbaarheid vaak langer wordt. Een duidelijk voorbeeld hiervan is het fermenteren van melk tot kaas, waarbij kaas aanmerkelijk langer houdbaar is. Als laatste wordt fermentatie gebruikt om de smaak van een product te verbeteren of het smaakprofiel complexer te maken.

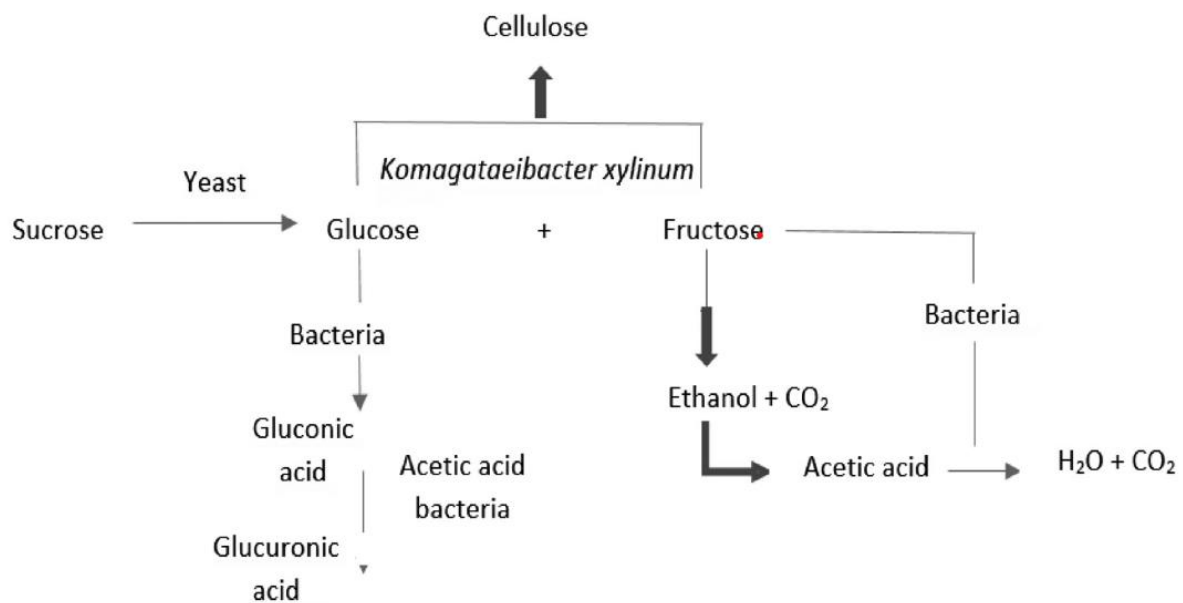
In figuur 1 is een samenvatting van de metabolische activiteit van de SCOBY weergegeven.⁷ Gisten zetten de sacharose in de zoete thee om naar andere suikers zoals fructose en glucose. Vervolgens worden deze monosachariden verder gefermenteerd naar alcohol en CO₂. Deze omzettingen zijn anaeroob. In de SCOBY zitten diverse soorten gisten, maar de meest voorkomende gistsoorten uit eerdere onderzoeken zijn *Saccharomyces cerevisiae* en *Zygosaccharomyces rouxii*.^{5,7}

Verder bestaat de SCOBY nog uit diverse bacteriesoorten. De meest voorkomende type bacterie in de SCOBY zijn azijnzuurbacteriën.⁷ Azijnzuurbacteriën zijn aerobe bacteriën die zetten alcohol om in zuren. De belangrijkste azijnzuurbacteriën zijn *Komagataeibacter xylinus* en *Gluconobacter oxydans*. *Komagataeibacter xylinus* is vooral belangrijk omdat het cellulose maakt uit glucose, iets wat vooral door planten wordt gedaan.⁸ Verder kan *Komagataeibacter xylinus* glucose oxideren naar gluconzuur, zoals te zien is in figuur 1.⁷

Buiten de azijnzuurbacteriën zijn er in verschillende onderzoeken een groot scala aan andere bacteriën gevonden, zoals de melkzuurbacterie *Lactobacillus casei*.⁹

Er zijn veel onderzoeken gedaan om de chemische samenstelling van kombucha te bepalen. Door de complexe interacties van de micro-organismen in de SCOBY bestaat kombucha uit een grote verzameling van stoffen.¹⁰ De belangrijkste stofgroepen in kombucha zijn suikers, zuren, alcoholen, fenolen, lipiden, enzymen en bacteriële metabolieten.^{3, 8}

Verder zijn er veel factoren die invloed hebben op de fermentatie. Uit een onderzoek van Villarreal-Soto et al. blijkt dat onder andere de oppervlakte-volumeverhouding, de temperatuur, de duur en de pH tijdens de fermentatie invloed hebben op de microbiële samenstelling en daarmee ook de chemische samenstelling.⁴



Figuur 1: De belangrijkste metabolische processen in kombucha.⁷ Sacharose wordt gehydrolyseerd door gist tot glucose en fructose. Diverse soorten bacteriën in de SCOBY zetten deze suikers en alcohol om naar zuren en cellulose

YAYA kombucha en het Foodlab

Dit onderzoek wordt gedaan in opdracht van het bedrijf YAYA Kombucha.¹¹ YAYA Kombucha produceert kombucha om het commercieel en op grote schaal te verkopen. Omdat kombucha een natuurproduct is waarbij veel factoren invloed op hebben op het fermentatieproces, wil YAYA Kombucha een analysemethode waarmee ze iets kunnen zeggen over de smaak en kwaliteit van hun product.

Daarom is het Foodlab bezig met het ontwikkelen van verschillende analyses om zowel de chemische als microbiële samenstelling te kunnen bepalen. Deze methodes kunnen in een later stadium van dit onderzoek gebruikt worden om in kaart te brengen wat de precieze effecten zijn van verschillende variabelen op het eindproduct, de kombucha.

Doel

Het doel van dit onderzoek is het opzetten van een fingerprint analyse voor apolaire stoffen in kombucha met de GC-MS. Om dit te bereiken zijn er drie subdoelen gesteld. Als eerste moet er een methode ontwikkeld worden. Vervolgens moet deze methode gevalideerd worden. Tenslotte worden er kombucha monsters gemeten om het fingerprint te bepalen.

Analysetechniek

Er is gekozen om de analyse uit te voeren met een Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). De voordelen van een GC-MS zijn dat het een robuuste techniek is, er een grote database beschikbaar is en dat de GC-MS zeer geschikt is voor het identificeren van vluchtige stoffen. Met behulp van de database zijn onbekende stoffen gemakkelijk en nauwkeurig te bepalen en te identificeren. Veel smaak- en geurstoffen zijn kleine, vluchtige, organische stoffen, zoals fenylethanol.¹² Een nadeel is dat GC-MS alleen geschikt is voor de analyse van vluchtige stoffen. Daarom kan er geen water op de GC-MS worden geïnjecteerd. De analieten zullen eerst uit de kombucha moeten worden geïsoleerd.

Gezien kombucha een oplossing in water is, zou een andere logische analysetechniek de High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) zijn. Hier is niet voor gekozen omdat dit apparaat minder gevoelig is dan een GC-MS en dit apparaat niet beschikbaar was op het Foodlab.

Vloeistof-vloeistofextractie

Omdat de analieten uit kombucha moeten worden geëxtraheerd, moet er een monstervoorbewerking ontwikkeld worden. Hierbij is gekeken naar een vloeistof-vloeistofextractie (LLE). Bij deze extractiemethode worden er twee vloeistoffen bij elkaar gedaan die niet mengen. De twee lagen worden door elkaar geschud om vervolgens weer te scheiden. De stoffen die opgelost zijn in één van de vloeistoffen vormen een dynamisch evenwicht tussen de twee lagen. De verdeling hangt af van de affiniteit van de stof voor de oplosmiddelen. Deze affiniteit wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals polariteit, pH en oplosbaarheid.

In het geval van dit onderzoek is het water van kombucha de ene laag. Gezien water erg polair is en we juist geïnteresseerd zijn in de apolaire stoffen, zal er een apolairder organisch oplosmiddel gebruikt worden. Bij een vergelijkbaar onderzoek op het Foodlab is er een fingerprint methode ontwikkeld voor kruiden. Hiervoor werd een extractie gebruikt met een mengsel van dichloormethaan (DCM) en pentaan in een verhouding van 3:2. Daarnaast gaat er gekeken worden naar andere oplosmiddelen. Er wordt gekeken naar extractie met pentaan om grote apolaire stoffen zoals lipiden te extraheren. Tenslotte wordt in dit onderzoek DCM getest om stoffen uit kombucha te extraheren die normaliter moeilijk te extraheren zijn. Een goed voorbeeld hiervan is cafeïne. In de literatuur wordt een extractie met DCM gebruikt om cafeïne te isoleren uit thee.¹³ DCM is hier geschikt voor omdat cafeïne een veel grotere oplosbaarheid heeft in DCM ten opzichte van water. Het voordeel van deze monstervoorbewerkingsmethode is dat er selectief stoffen uit kombucha kunnen worden geïsoleerd zonder water zelf mee te nemen. Ook hoeft het water niet volledig te worden verdampt. Daarmee worden namelijk ook alle andere stoffen verdampt die even vluchtig of vluchtiger zijn dan water. Tenslotte blijven hele polaire stoffen, zoals suikers, in de waterlaag zitten. Deze stoffen kunnen schadelijk zijn voor de GC-MS en zouden gederiviseerd moeten worden. Met de extractie is dit niet het geval en hoeft er geen derivatiereactie gebruikt te worden.

Omdat kombucha een pH heeft rond de 3,5 zullen de meeste zwakke zuren zoals azijnzuur geen lading hebben. De stoffen die na de extractie verwacht kunnen worden zullen daarom alcoholen, lipiden, fenolen en zwakke zuren zijn.

Standaard

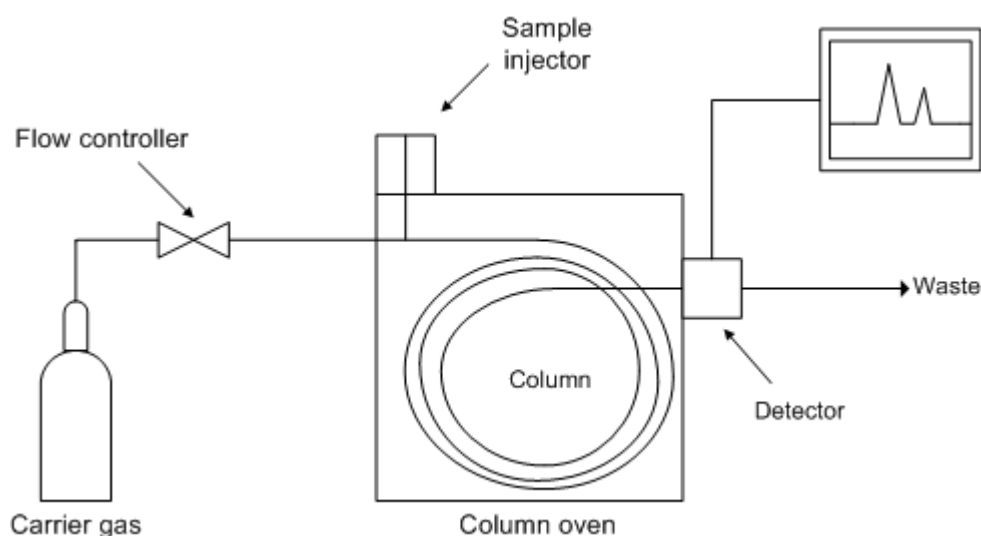
Voor dit onderzoek zijn twee verschillende standaarden gebruikt. Deze standaarden zijn gemaakt door bekende hoeveelheden stoffen op te lossen. Voor het ontwikkelen van de methode werd de mengstandaard gebruikt. De mengstandaard werd gebruikt om te voorkomen dat variatie in de kombucha invloed zou hebben op de methode ontwikkeling. De variatie kan komen door het

fermentatieproces, omdat hier veel factoren invloed op hebben, zoals al eerder vermeld is.⁴ Deze mengstandaard bestaat uit anijsaldehyde, cafeïne, citroenzuur, glucose, glycerol en melkzuur. Deze stoffen zijn gekozen omdat ze representatief zijn voor de verzameling van stoffen in kombucha en thee.^{4,14} Verder kan deze standaard gebruikt worden om te controleren of de extractiemethode werkt en niet te veel polaire stoffen meeneemt. Dit betekent dat citroenzuur, glucose, glycerol en melkzuur in de waterige laag moeten blijven tijdens de extractie, terwijl anijsaldehyde en cafeïne naar de organische laag gaan.

Bij de validatie wordt de tweede standaard gebruikt met de stoffen cafeïne, geraniol, menthol en carvon. Deze stoffen zijn gekozen omdat ze aangetoond in kombucha zitten of vergelijkbaar zijn met stoffen uit kombucha.¹⁵ Geraniol is voor de alcoholen in kombucha. Menthol en carvon zijn gekozen voor de kleine organische moleculen. Cafeïne is gekozen om de stoffen uit theebladeren te representeren.

Gaschromatografie

Gaschromatografie (GC) is een veel gebruikte vorm van chromatografie waarbij stoffen worden gescheiden op basis van hun vluchtigheid en affiniteit met de kolom.¹⁶ In figuur 2 is een schematisch overzicht te zien van een GC. In het algemeen heeft chromatografie een mobiele fase en een stationaire fase. Bij de GC is de mobiele fase een inert draaggas zoals stikstof of helium. De stationaire fase bij GC is een (capillaire) kolom. Het monster wordt in de injector verdampt en geïnjecteerd in de stroom van draaggas. Vervolgens komt het op de kolom, waar de componenten van het monster gescheiden worden door hun affiniteit met de kolom. Tenslotte komen de componenten op de detector terecht waar ze gemeten kunnen worden.

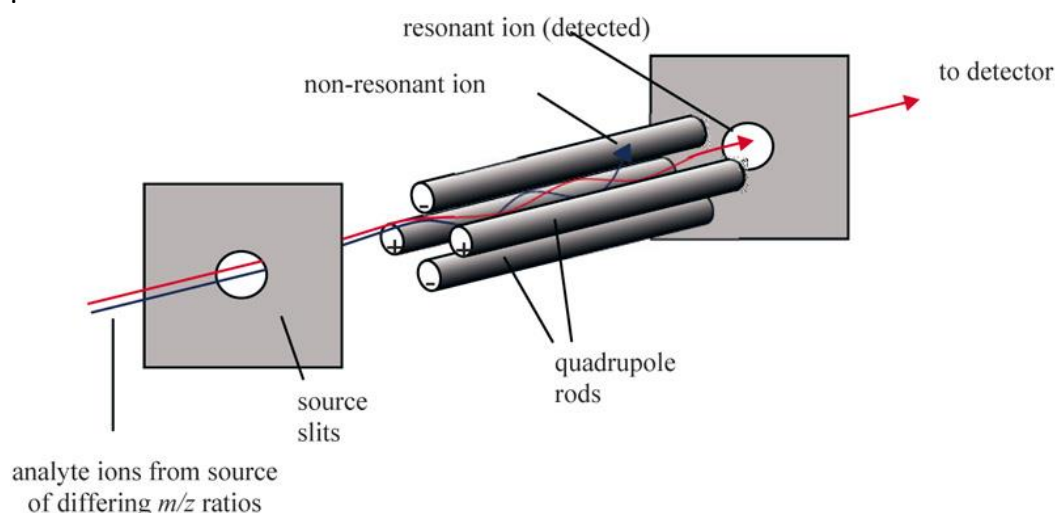


Figuur 2: Een schematische weergave van een gas chromatograaf.¹²

Massaspectrometer

De detectie gebeurt met een quadrupool massaspectrometrie (QMS). De moleculen die van de GC-kolom af komen worden geïoniseerd in de MS. De ionisatie gebeurt door elektronenionisatie (EI). Dit betekent dat de moleculen worden beschoten met elektronen, waardoor de moleculen in verschillende geladen brokken fragmenteren. Na de ionisatie worden de ionen op de quadrupool aangebracht. De quadrupool bestaat uit vier metalen staven die elektrisch verbonden zijn.¹⁷ Hiermee kan er een elektrisch veld gemaakt worden die de ionen afbuigt. Door de sterkte van dit veld aan te passen kunnen ionen van een specifieke massa-ladingverhouding doorgelaten worden tot op de

detector, terwijl alle ionen met een andere massa-ladingverhouding dusdanig worden afgebogen dat ze niet op de detector komen. De fragmenten die ontstaan tijdens de ionisatie zijn kenmerkend voor het molecuul. Dit betekent dat het fragmentatiepatroon vergeleken kan worden met een database en zo kan een onbekend molecuul geïdentificeerd worden. In figuur 3 is een schematische weergave van een QMS te zien.¹⁷



Figuur 3: Een schematische weergave van een massaspectrometer met een quadrupool.¹³

Validatie

Naast het ontwikkelen van een methode, moet de methode ook gevalideerd worden. Bij het valideren wordt gecontroleerd of de methode robuust, nauwkeurig en accuraat is. De validatie is opgezet op basis van het boek "Statistiek, validatie en meetonzekerheid" geschreven door J.W.A. Klaessens.¹⁸ Volgens Klaessens zijn er een aantal prestatiekenmerken die bepaald kunnen worden voor het valideren van een methode. De prestatiekenmerken die bepaald worden in dit onderzoek zijn lineariteit, herhaalbaarheid, detectielimiet, reproduceerbaarheid, en tenslotte de recovery. Deze prestatiekenmerken zijn hieronder kort toegelicht. De gestelde eisen van de prestatiekenmerken zijn opgesteld aan de hand van de richtlijnen binnen de bioanalyse.¹⁹

Lineariteit

De lineariteit moet bepaald worden rondom het verwachte gehalte van het monster. De kalibratielijn voor een stof moet lineair lopen zodat het gehalte van een stof bepaald kan worden met een kalibratielijn. Hiervoor moet de kalibratielijn een correlatiecoëfficiënt (R^2) van $\geq 0,99$ hebben.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid toont aan hoe herhaalbaar een verkregen resultaat is onder normale omstandigheden. De herhaalbaarheid wordt bepaald door een monster acht keer te meten onder dezelfde omstandigheden. Vervolgens kan de standaarddeviatie berekend worden met vergelijking 1. De eis is ook hierbij dat de piekoppervlakten maximaal 15% verschillen.

Vergelijking 1: Formule voor het berekenen van de standaarddeviatie

$$S_{rw} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Detectielimiet

De detectielimiet is het gebied waarin de GC-MS nauwkeurig kan meten. Het wordt onderverdeeld in twee delen, de Limit of Detection (LOD) en de Limit of Quantification (LOQ). De LOD is de grens waaronder je een analiet niet van de ruis kan onderscheiden. De LOQ is de grens waaronder je niet met zekerheid kan zeggen dat je daadwerkelijk het analiet meet. De LOD wordt berekend met vergelijking 2, waarbij S_{rw} bepaald wordt volgens vergelijking 1. De LOQ wordt berekend volgens vergelijking 3. De eis is dat de LOQ in mg/mL kleiner is dan 20% van de concentratie van het monster.

Vergelijking 2: Formule voor het berekenen van de LOD

$$LOD = 3 * S_{rw}$$

Vergelijking 3: Formule voor het berekenen van de LOQ

$$LOQ = 10 * S_{rw}$$

Reproduceerbaarheid

Bij de reproduceerbaarheid wordt gecontroleerd of de methode dezelfde resultaten geeft, onder verschillende omstandigheden. Dit wordt gecontroleerd door een monster acht keer te meten op verschillende momenten. Vervolgens wordt de reproduceerbaarheid berekend als de standaardafwijking volgens vergelijking 1. Waarbij S_{rw} de standaardafwijking is, n is het aantal metingen, x_i de gemeten waarde en $\bar{x}$ de gemiddelde waarde. Hierbij is de eis dat de piekoppervlakte niet meer dan 15% uit elkaar liggen.

Recovery

Bij de recovery wordt er bepaald hoeveel van de analieten verloren gaan tijdens de monstervoorbewerking. De recovery wordt in duplo bepaald bij verschillende concentraties. Dit wordt gedaan door een kombucha monster te spiken met een bekende hoeveelheid van een standaard. Vervolgens wordt met vergelijking 4 de recovery berekend, waarbij x_{gevonden} de meetwaarde is van het gespikete monster, x_{kombucha} de meetwaarde van de stof in kombucha en x_{berekend} de waarde is voor de gebruikte concentratie berekend met de kalibratielijn die opgezet is bij de lineariteitsbepaling. Hieraan wordt geen eis gekoppeld, al is een recovery tussen de 70 en 130% wenselijk.

Vergelijking 4: Formule voor het berekenen van de recovery

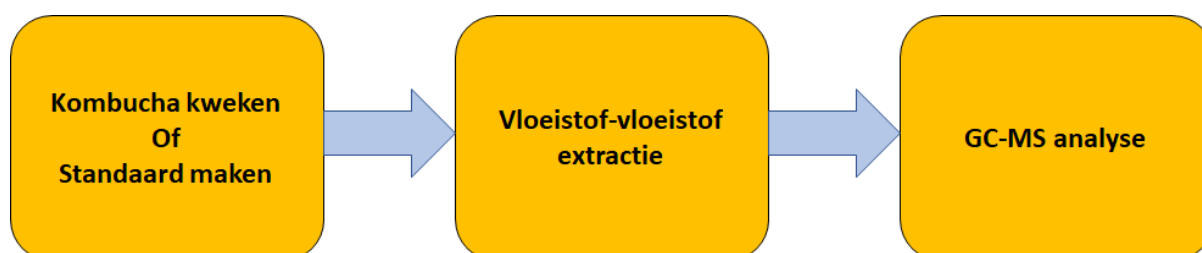
$$Recovery = \frac{x_{\text{gevonden}} - x_{\text{kombucha}}}{x_{\text{berekend}}} * 100\%$$

Proefopzet

De algemene proefopzet is weergegeven in figuur 4. Er wordt eerst een monster gemaakt door kombucha te kweken of door een standaard te maken. Vervolgens wordt de monstervoorbewerking gedaan, in dit geval een vloeistof-vloeistofextractie. Bij deze vloeistof-vloeistofextractie is het de bedoeling dat suikers en polaire zuren zoals citroenzuur in de kombucha blijven, terwijl zoveel mogelijk stoffen oplossen in de organische laag. Tenslotte wordt het monster gemeten met de GC-MS om het fingerprint te bepalen.

Eerst wordt er een methode voor het fingerprint ontwikkeld met de mengstandaard. Vervolgens wordt deze methode gevalideerd op de prestatiekenmerken die hierboven staan beschreven.

Tenslotte worden er kombucha monsters geanalyseerd.



Figuur 4: De proefopzet van dit onderzoek. Er wordt een monster gemaakt door kombucha te kweken of door een standaard te maken. Vervolgens wordt de vloeistof-vloeistofextractie uitgevoerd. Tenslotte wordt het monster gemeten met de GC-MS.

Experimenteel

Chemicaliën

De chemicaliën gebruikt voor de validatie hadden een zuiverheid van 99% of hoger. De chemicaliën waren bij VWR Chemicals aangeschaft tenzij anders vermeld. (-)-Carvon is verkregen bij Sigma-Aldrich. DL-Menthol was verkregen bij Merck. Geraniol was verkregen bij Acros Organics.

Apparatuur

De GC-MS metingen voor de methode ontwikkeling waren gedaan op een Thermo Scientific Trace 1310 GC systeem voorzien van een Thermo Scientific ISQ 7000 MS detector. De gebruikte kolom voor het ontwikkelen van de methode was de OPTIMA 5 MS GC-kolom met een lengte van 30 m, een diameter van 0,25 mm en een deeltjesgrootte van 1 µm. De metingen voor de validatie waren gedaan op een andere locatie met een ander GC-MS systeem. Hiervoor werd Thermo Scientific Trace 1310 GC systeem voorzien van een Thermo Scientific ISQ 7000 MS detector gebruikt. De gebruikte kolom voor de validatie van de methode was een Rxi-5ms kolom met een lengte van 30 m, een diameter van 0,25 mm en een deeltjesgrootte van 1 µm.

De standaarden waren afgewogen met Sartorius MC-1 AC210S analytische balans.

Materialen

De kombucha en standaarden werden bewaard in de koelkast bij 4 °C. De kombucha werd gekweekt volgens de onderstaande methode. De filtraties werden gedaan met 0.2 µm polyethersulfon filter van Fishersci.

Mengstandaard

Voor het ontwikkelen van een methode werd een mengstandaard gebruikt van anijsaldehyde, cafeïne, citroenzuur, glucose, glycerol en melkzuur. Hiervoor werd 25 mg van elk van de bovengenoemde stoffen afgewogen en opgelost in 10 mL demi-water.

Validatiestandaard

Voor de validatie is gebruik gemaakt van een standaard met een bekende concentratie. Hiervoor werd 25 mg van cafeïne, carvon, geraniol en menthol afgewogen en opgelost in 250 mL demi-water, voor een stockoplossing van 100 mg/mL. Vervolgens werd een verdunningsreeks gemaakt 100, 70, 50, 30, 10 en 0 mg/mL voor de bepaling van de lineariteit.

Kombucha methode

De kombucha werd bereid door 10 g zwarte thee en 10 g groene thee te laten trekken in 1 L kokend water gedurende 60 minuten. Daarna werden de theebladeren verwijderd met een zeef. Vervolgens werd er 250 g rietsuiker opgelost in de thee. Er werd 3 L koud water bij de thee gedaan. Toen de thee was afgekoeld tot kamertemperatuur werd er 400 mL van een oude kombucha met een kwart SCOBY toegevoegd. De kombucha werd gefermenteerd in een broeikast op 30 °C gedurende twee weken.

Monstervoorbewerkingmethode

Voor de monstervoorbewerking werd een vloeistof-vloeistofextractie gedaan. Hiervoor werden verschillende oplosmiddelen geprobeerd. Alle extracties waren op dezelfde manier uitgevoerd. De gebruikte organische oplosmiddelen waren DCM, pentaan en een mengsel van DCM en pentaan in een verhouding van 3:2.

Er werd 500 µL kombucha in een epje gepipetteerd. Hieraan werd 500 µL organisch oplosmiddel toegevoegd. De twee lagen werden gemengd door te vortexen. Nadat de twee lagen waren gescheiden, werd de waterlaag verwijderd. De organische laag werd gedroogd met CaCl. Vervolgens werd de organische laag gecentrifugeerd en gefiltreerd om de CaCl te verwijderen. Hierna kon de sample geïnjecteerd worden op de GC-MS.

GC-MS methode

Voor de GC werden de volgende instellingen gebruikt. Als dragergas werd helium gebruikt met een flow van 1,5 mL/min en een split ratio van 1:10. Er werd een injectievolume van 1 µL gebruikt. Voor de injectie werd een programmed temperature vaporizer (PTV) gebruikt met een programma beginnend op 50 °C en verhoogd naar 280 °C met 10 °C/min. Voor de oven werd het volgende temperatuurprogramma gebruikt: Begin temperatuur was 50 °C en wordt verhoogd tot 170 °C met 6 °C/min, vervolgens werd de oven door verwarmd naar 300 °C met 20 °C/min en vastgehouden voor 10 minuten om uit te stoken. De transfer line temperatuur en de ionbron temperatuur werden ingesteld op 300 °C. Er werd gemeten in de massarange 50-600 Da.

Validatie

Op basis van het boek “Statistiek, validatie en meetonzekerheid” was een validatie voor de ontwikkelde methode opgezet.¹⁸ Alle onderstaande concentraties verwijzen naar de concentratie van de stoffen in de validatiestandaard. Na het verdunnen werd de extractie gedaan met DCM zoals beschreven staat bij “Monstervoorbewerkingsmethode”.

De lineariteit werd bepaald met de verdunningsreeks met de concentraties van 100, 70, 50, 30, 10 en 0 mg/mL.

De herhaalbaarheid werd bepaald door de validatiestandaard te verdunnen naar 50 mg/mL. Na de monstervoorbewerking werd het monster 8 keer achter elkaar gemeten.

De reproduceerbaarheid werd bepaald door validatiestandaard te verdunnen naar 50 mg/mL en op 4 verschillende momenten tijdens de validatie op te werken en te meten. Vervolgens werd de recovery bepaald door 400 µL kombucha te spiken met 50, 100 en 200 µL validatiestandaard.

Vervolgens werd de gespikete kombucha verder voorbewerkt zoals de rest van de validatie. De recovery werd bij elke concentratie in duplo uitgevoerd.

Resultaten en discussie

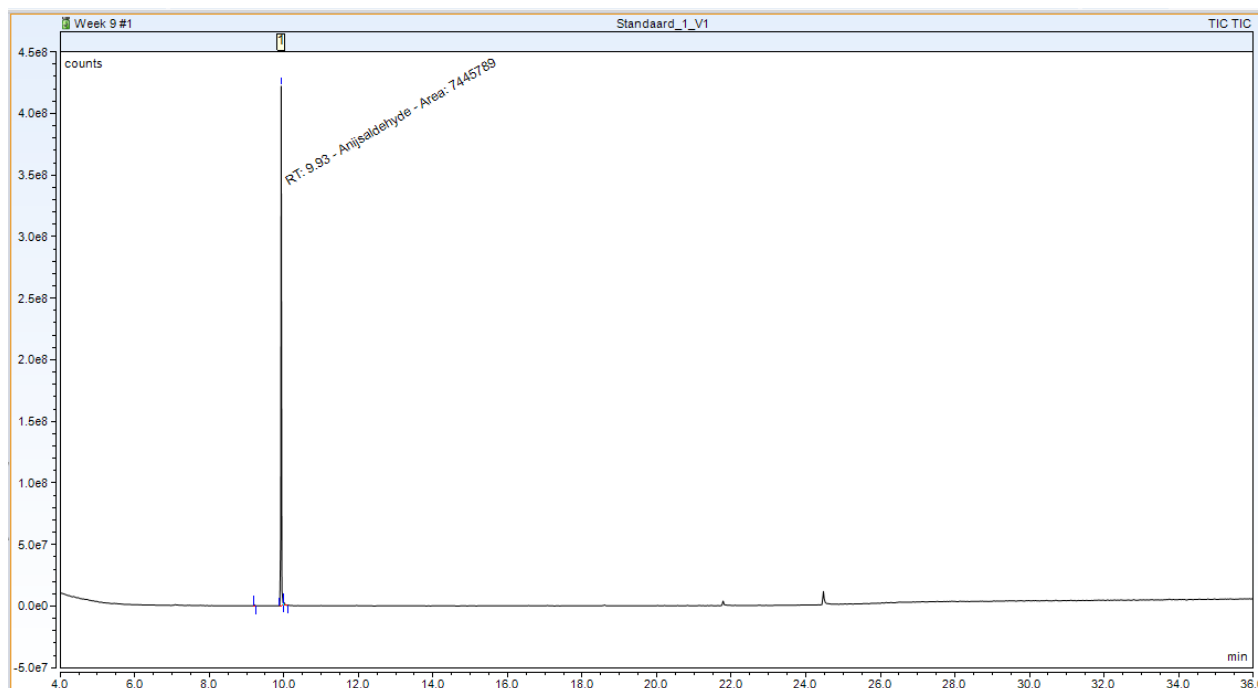
Tijdens het onderzoek is er eerst bepaald welke stoffen in kombucha gemeten kunnen worden. Vervolgens is de analysemethode voor die stoffen verder geoptimaliseerd. Tenslotte is de methode gevalideerd via de eerder benoemde prestatiekenmerken.¹⁸

GC-instellingen

Tijdens de methode ontwikkeling zijn verschillende de GC-instellingen gebruikt. Voor de eerste metingen is er gekozen voor een eenvoudig gradiënt, methode 1. Bij methode 1 werd de GC-oven verwarmd van 50 °C naar 300 °C met een verandering van 10 °C/min. De oven werd 10 minuten op 300 °C gehouden om de kolom uit te stoken. Deze methode duurt 36 minuten. In figuur 5 is een voorbeeld chromatogram afgebeeld.

Om ervoor te zorgen dat de verschillende stoffen uit kombucha goed zouden scheiden is methode 2 getest. Het gradiënt werd verlaagd naar 7 °C/min. Deze methode duurt 50 minuten. In figuur 6 is te zien dat de piek van anijsaldehyde uit de mengstandaard een iets latere retentietijd heeft. Dit zou zorgen voor een betere resolutie voor kombucha. Echter is in figuur 7 te zien dat er helemaal geen stoffen mee kwamen met de extractie. Dit is waarschijnlijk terug te leiden naar de extractie en ligt niet aan de GC-instellingen. De methode werd verlengt om te zorgen dat de diverse stoffen in kombucha gescheiden van de kolom af zouden komen. Vanwege het gebrek aan stoffen is dit een overbodige voorzorgsmaatregel en is er gekozen om verder te gaan met methode 1 voor de validatie.

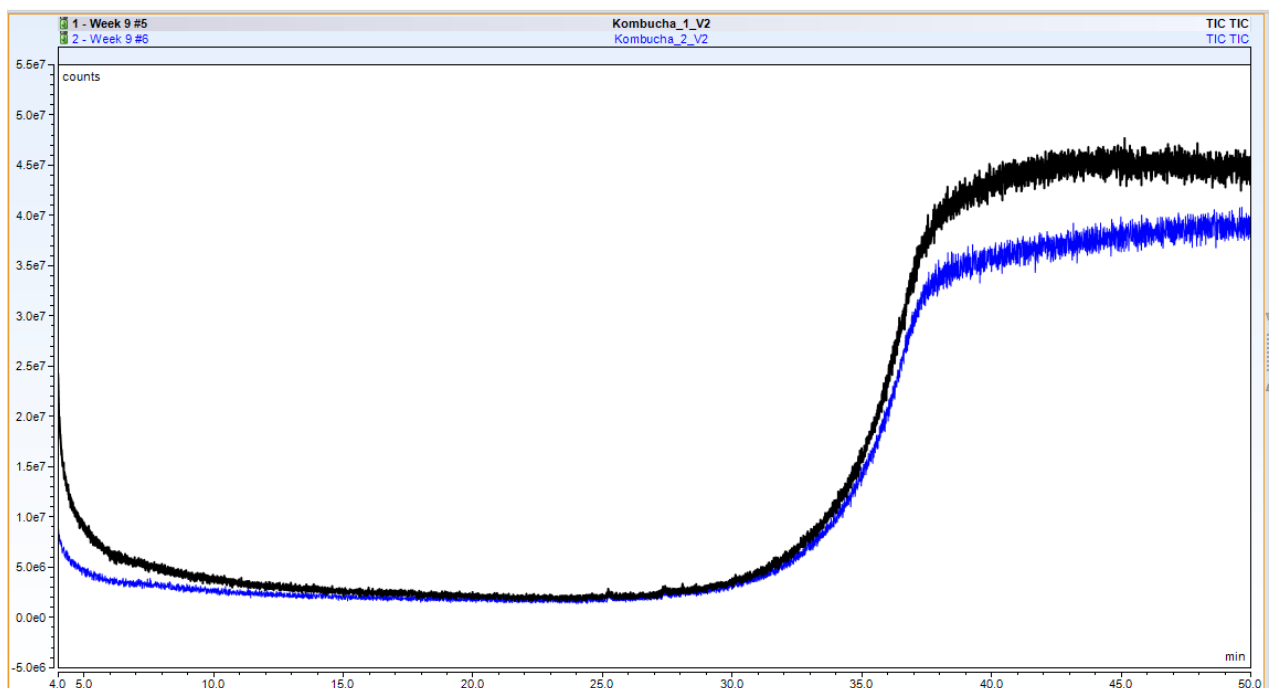
Tijdens het meten van de validatiestandaard bleek dat de pieken van geraniol en carvon niet goed gescheiden werden, zoals te zien is in figuur 10. Daarom is de gradiënt aangepast naar methode 3, die vermeld staat in het experimenteel. In figuur 12 staat een chromatogram van de validatiestandaard gemeten met methode 3 afgebeeld. Hierbij zijn alle pieken gescheiden en is de methode niet overbodig lang zoals methode 2.



Figuur 5: Een voorbeeld chromatogram van de mengstandaard geëxtraheerd met een 3:2 mengsel van pentaan en dichloormethaan gemeten met methode 1



Figuur 6: Voorbeeld chromatogram van de mengstandaard geëxtraheerd met pentaan gemeten met methode 2



Figuur 7: Twee voorbeeld chromatogrammen van de kombucha geëxtraheerd met een 3:2 mengsel van pentaan en dichloormethaan gemeten met methode 2

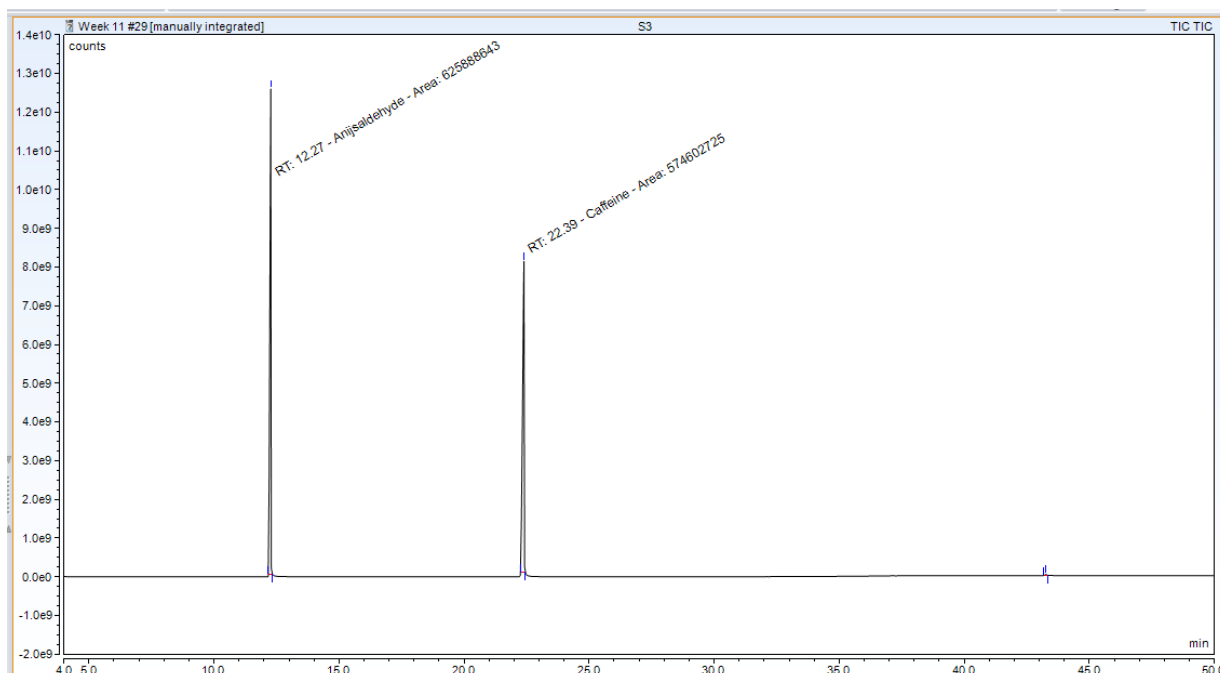
Extractiemethodes

Er zijn verschillende organische oplosmiddelen uitgetest voor de extractie. Als eerste is gekozen om te werken met een mengsel van pentaan en dichloormethaan in een verhouding van 3:2. Dit mengsel is gekozen binnen het Foodlab met deze methode soortgelijke stoffen uit kruiden succesvol zijn geïsoleerd. Gezien kombucha een complex mengsel is met veel verschillende stoffen, is er eerst gemeten met de mengstandaard. In figuur 5 is het GC-chromatogram te zien van de mengstandaard. Er valt op dat er een enkele piek te zien is. Door het massaspectrum te vergelijken met de database is bepaald dat deze piek van anijsaldehyde komt. Zoals verwacht zijn de suikers niet te zien in het bovenstaande chromatogram, omdat deze veel beter oplossen in water. Melkzuur heeft een pK_a van 3,85. Dat betekent dat het ongeladen is bij de pH van 3,5 in kombucha. Toch is het een polaire stof met de (ongeladen) zuurgroep en alcoholgroep. Daarmee lost het beter op in water en is de $K_D < 1$. Citroenzuur is een meerwaardig zuur waarvan de laagste pK_a op 3,1 ligt. Daarmee heeft het een negatieve lading hebben en vooral in de waterlaag blijven. De piek van cafeïne ontbreekt in dit chromatogram, wat verklaard kan worden door $\log(P)$ van -0,07, dus lost het beter op in de waterlaag. Anijsaldehyde heeft een $\log(P)$ van 1,64 lost juist beter op in de organische laag. Hierbij is het erg opmerkelijk dat er ook geen beetje cafeïne is meegekomen. Dat kan verklaard worden door het feit dat pentaan apolairder is dan n-octanol.

In figuur 7 zijn twee chromatogrammen te zien van kombucha. De verwachting was dat hier veel verschillende pieken op te zien zouden zijn. Opvallend genoeg zien deze chromatogrammen eruit als een blanco, zonder pieken. Hieruit volgt dat de extractiemethode geen stoffen heeft geïsoleerd en daarom is er gekozen om een andere organische laag te proberen.

Vervolgens is een extractie gedaan met pentaan als organische laag, om voor een groter verschil in polariteit tussen de waterige laag en de organische laag te zorgen. In figuur 6 is een representatief voorbeeld chromatogram te zien van de mengstandaard met deze methode. Net als bij het vorige organische oplosmiddel zijn de suikers en zuren in de waterlaag gebleven. Anijsaldehyde blijft een grote piek te geven. Cafeïne is om dezelfde reden niet te zien in het chromatogram.

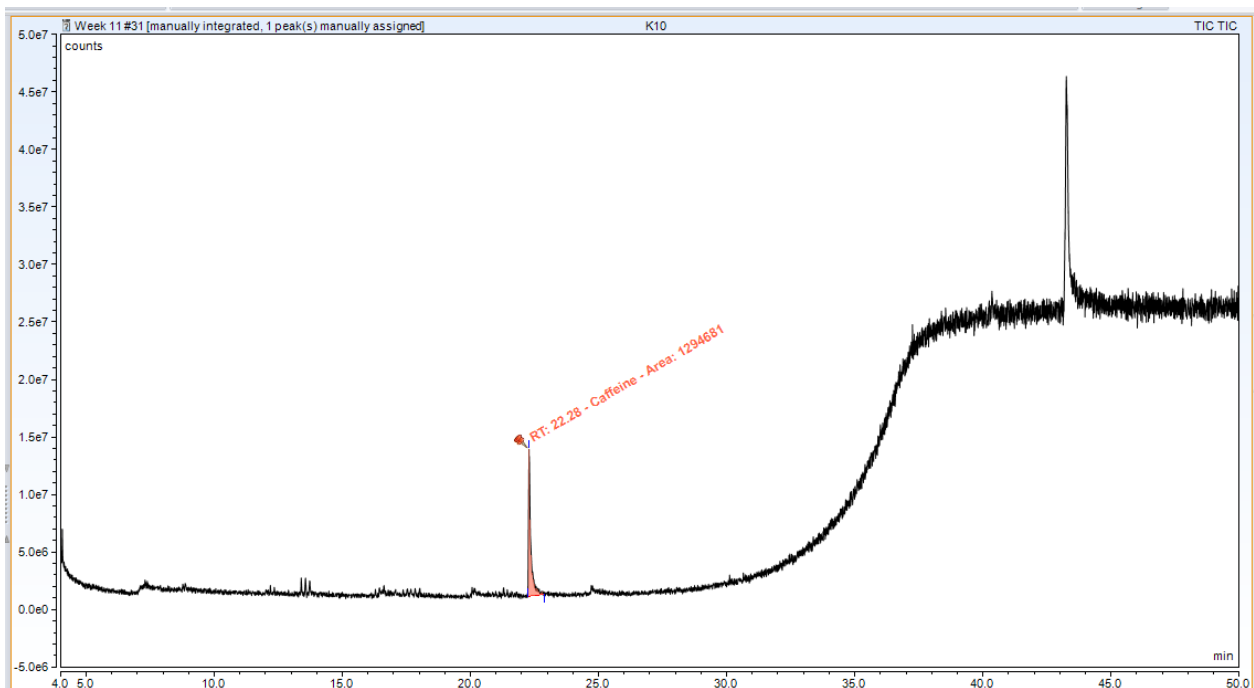
Tenslotte is een extractie met dichloormethaan als organische laag gedaan. Dichloormethaan wordt in de literatuur gebruikt om cafeïne in thee te bepalen en zou daarom ook geschikt moeten zijn voor kombucha.¹³ In figuur 8 is een voorbeeld chromatogram te zien van de mengstandaard. Hierin zijn twee pieken te zien. De eerste is van anijsaldehyde en de tweede is van cafeïne. Voor de zuren en suikers blijft dezelfde redenatie gelden als eerder.



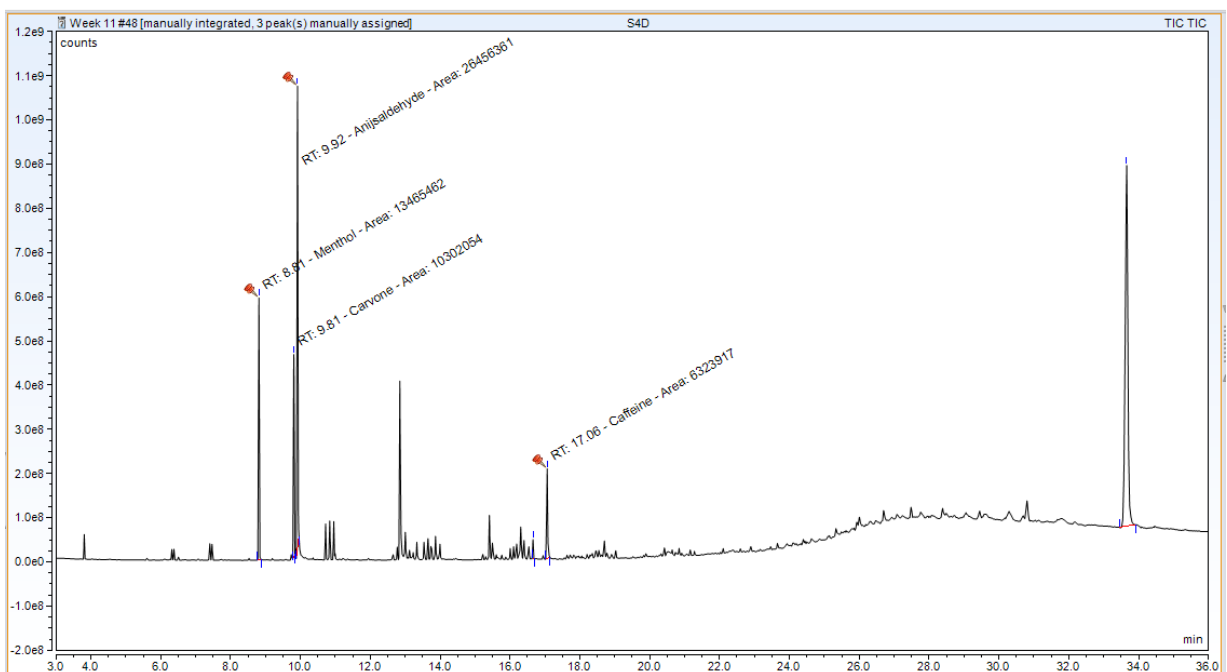
Figuur 8: Voorbeeld chromatogram van de mengstandaard geëxtraheerd met dichloormethaan gemeten met methode 2

In figuur 9 is een voorbeeld chromatogram van kombucha geëxtraheerd met DCM te zien met een piek van cafeïne. De grote piek aan het einde van het spectrum zat ook in de blanco meting en is waarschijnlijk afkomstig van kolom bleeding bij 300 °C. Verder lijken er kleine signalen van andere stoffen in te zitten. Deze konden met behulp van de database niet geïdentificeerd worden. Om deze methode te gebruiken voor het fingerprint is er meer onderzoek gedaan naar deze onbekende signalen.

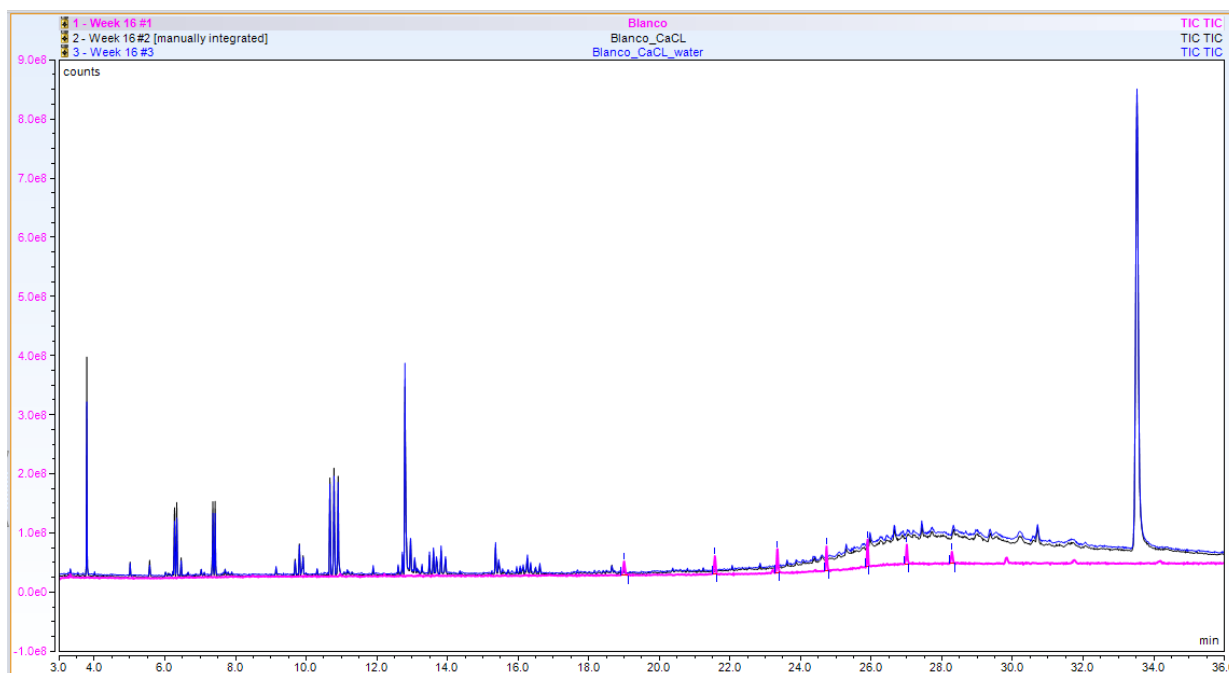
Vanaf dit moment wordt er verder gewerkt met de validatiestandaard. Omdat de meeste stoffen uit de mengstandaard bij de extractie in de waterlaag blijven zitten, zijn de stoffen uit de validatiestandaard gekozen omdat ze representiever zijn van de stoffen die gemeten moeten worden voor het fingerprint. Ook in de validatiestandaard waren deze “extra pieken” aanwezig, zoals te zien is in figuur 10. Na verder onderzoek bleken deze pieken een vervuiling te zijn uit het droogmiddel, CaCl. In figuur 11 wordt een blanco van DCM vergeleken met DCM dat gedroogd is met CaCl en demi-water geëxtraheerd met DCM en gedroogd is met CaCl. Hieruit is af te leiden dat de vervuiling niet in de DCM zit of in een van de stoffen van de standaard, maar dat de vervuiling afkomstig is van de CaCl. Omdat er weinig tot geen water oplost in DCM is ervoor gekozen om de droogstap uit de methode te verwijderen. Bij grote hoeveelheden water in je monster kan het de GC-kolom beschadigen en ervoor zorgen dat je pieken breder worden. Dit is niet het geval met de huidige methode.



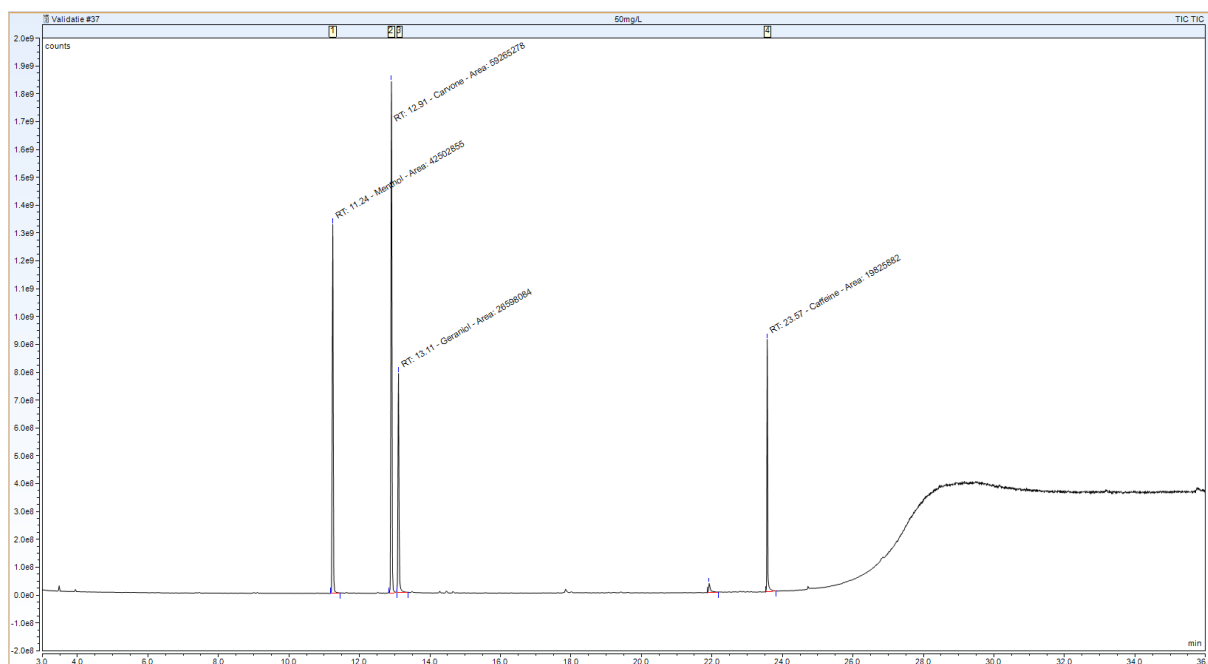
Figuur 9: Voorbeeld chromatogram van de kombucha geëxtraheerd met dichloormethaan gemeten met methode 2



Figuur 10: Voorbeeld chromatogram van de validatiestandaard geëxtraheerd met dichloormethaan gemeten met methode 1



Figuur 11: De spectra van drie blanco's gemeten met methode 1. De roze lijn is zuivere DCM. De zwarte lijn is DCM gedroogd met CaCl. De blauwe lijn is DCM na een extractie met demi-water en gedroogd met CaCl.

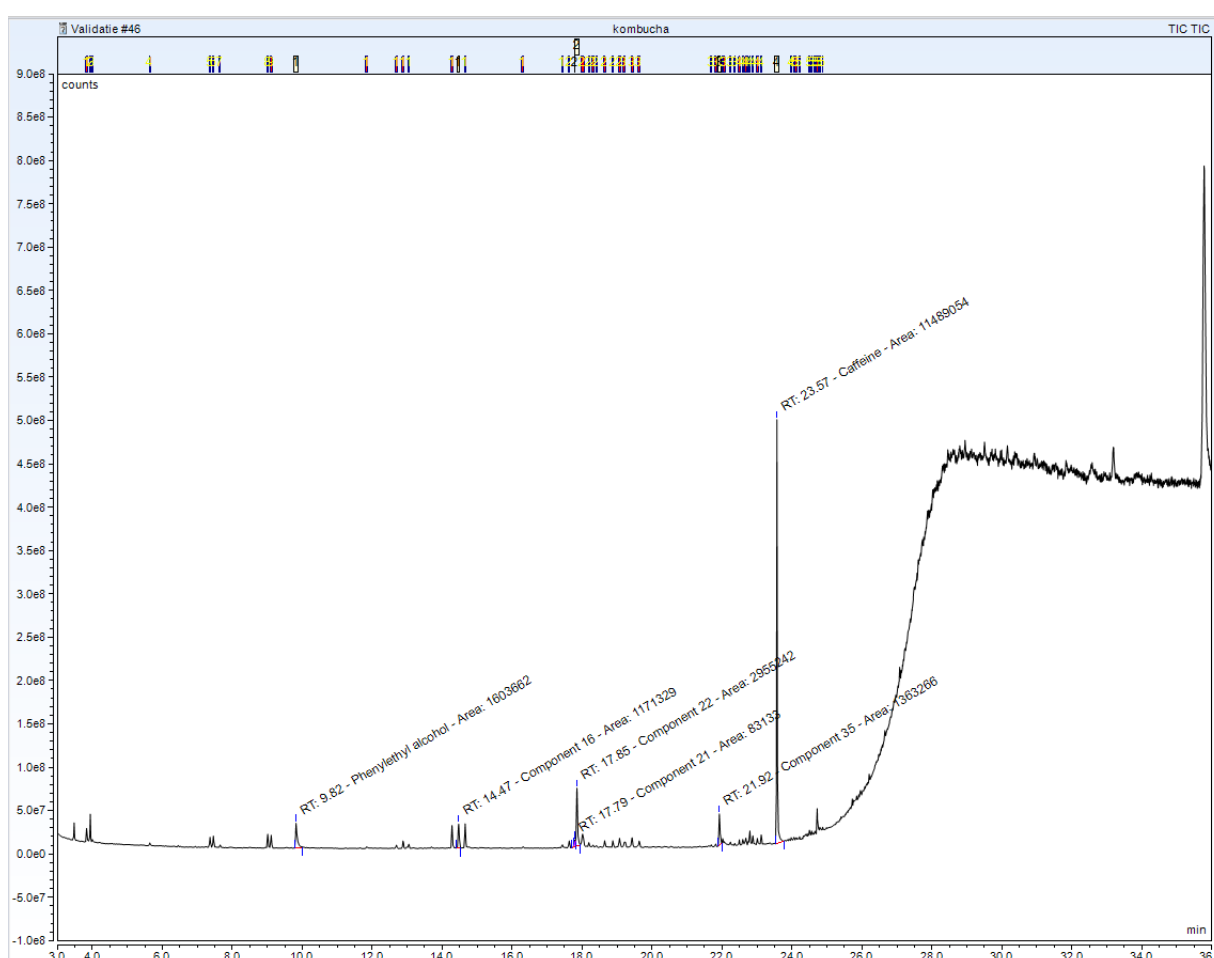


Figuur 12: Het chromatogram van de validatiestandaard gemeten met methode 3

Kombucha

Met de ontwikkelde methode is ook kombucha gemeten. Een voorbeeldchromatogram is hiervan weergegeven in figuur 13. Hierin zijn in totaal 58 pieken gevonden. De meeste van de pieken konden echter niet toegekend worden, omdat het massaspectrum voor 50% of minder overeenkwam met de beste match uit de database. Dat de stoffen niet toegekend kunnen worden kan door twee oorzaken komen. Als eerste is het mogelijk dat er twee of meer stoffen tegelijkertijd van de kolom af komen. Hierdoor vallen de massaspectra over elkaar en matchen de stoffen niet met hun eigen massaspectrum uit de database. De tweede reden is dat de pieken te laag zijn, waardoor de effecten van de ruis te groot worden. Als signalen van de ruis worden meegenomen in de vergelijking met de database, komen de spectra niet meer overeen.

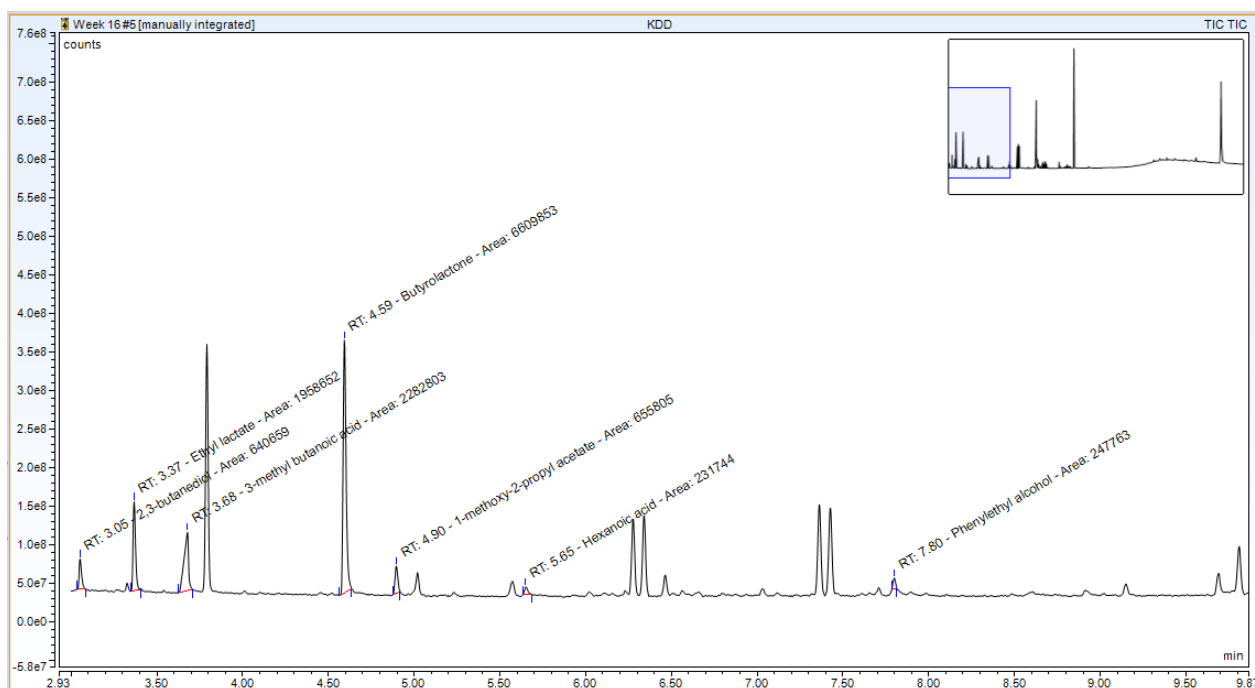
De twee stoffen die wel geïdentificeerd zijn, zijn fenylethanol en cafeïne. Hierbij valt op dat deze stoffen afkomstig zijn uit de theebladeren.²⁰



Figuur 13: Het chromatogram kombucha gemeten met methode 3 en niet gedroogd met CaCl

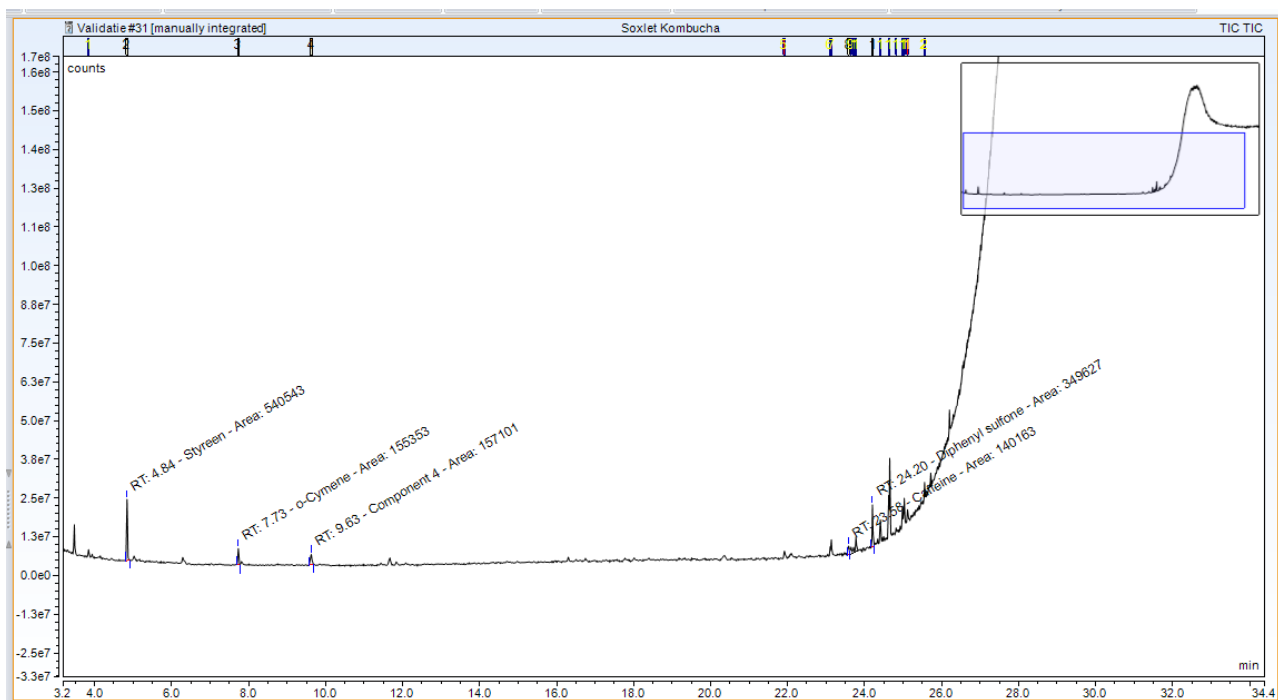
In eerdere metingen van kombucha zijn nog andere stoffen geïdentificeerd. In figuur 14 is een chromatogram te zien van kombucha, waarvan er is ingezoomd op het begin. Een verdere opmerking bij het chromatogram is dat het monster gedroogd is met CaCl, waardoor er extra pieken zijn. De pieken afkomstig uit kombucha die met een waarschijnlijkheid groter dan 50% konden worden toegekend zijn gelabeld. Ook hier is de fenylethanol teruggevonden. Hexaanzuur is in zowel thee als kombucha gevonden en zal waarschijnlijk afkomstig zijn uit de thee.^{4,20} 2,3-butanediol wordt

alleen in kombucha gevonden.⁸ Ethyl lactaat is de ethyl ester van melkzuur, een component uit kombucha. Deze wordt niet in thee gevonden en is een product van de fermentatie. Voor alle stoffen die afkomstig zijn uit theebladeren hangt de hoeveelheid niet af van het fermentatieproces. Een fingerprint met deze stoffen zegt dan ook vrij weinig over de fermentatie.



Figuur 14: Een ingezoomd chromatogram van kombucha gemeten met methode 2 en gedroogd met CaCl. De ongelabelde pieken zijn afkomstig uit het CaCl

Tenslotte is een stuk van de SCOBY geëxtraheerd met een soxhlet-opstelling en dichloormethaan als oplosmiddel. Voor de GC-instellingen zijn dezelfde instellingen en apparaten gebruikt als bij de validatiemetingen. Het bijbehorende chromatogram staat hieronder weergegeven in figuur 15. Hier zijn 21 verschillende stoffen gedetecteerd, maar de meeste konden niet worden geïdentificeerd. De piek van cafeïne is erg klein en dat komt doordat cafeïne opgelost is in de kombucha. Er valt wel op dat de gevonden pieken andere retentietijden hebben dan de stoffen die in de kombucha gevonden zijn. Dit is een goede indicatie dat het andere stoffen zijn dan de stoffen die in kombucha worden gevonden.



Figuur 15: Het chromatogram van een stuk SCOBY dat is geëxtraheerd met DCM in een soxhlet-opstelling gemeten met methode 3

Validatie

Lineariteit

Voor de kalibratielijnen zijn 5 standaarden en een blanco gemeten. De ruwe data van deze metingen zijn weergegeven in bijlage 1. Hieruit volgen de onderstaande regressielijnen.

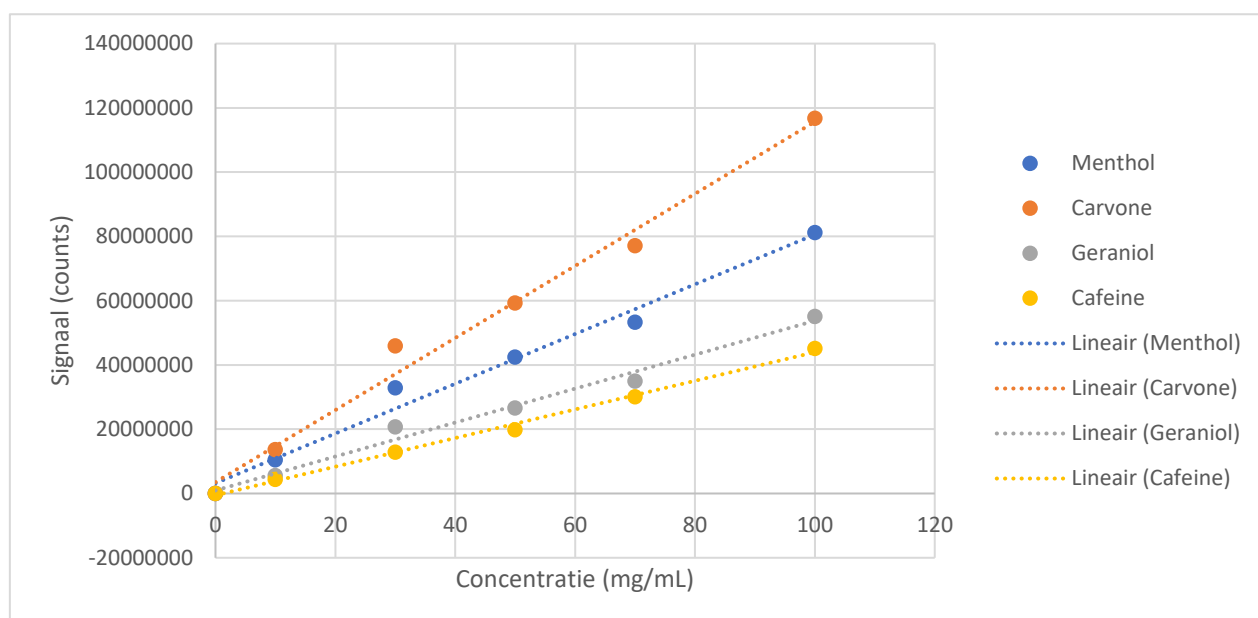
Menthol $y = 3,19 \cdot 10^6 (\pm 2,72 \cdot 10^6) + 8,60 \cdot 10^5 (\pm 5,46 \cdot 10^4) \cdot X$, $n=6$, $R^2 = 0,984$, $S_r = 4,15 \cdot 10^6$

Carvon $y = 3,52 \cdot 10^6 (\pm 3,53 \cdot 10^6) + 7,70 \cdot 10^5 (\pm 4,38 \cdot 10^4) \cdot X$, $n=6$, $R^2 = 0,987$, $S_r = 5,39 \cdot 10^6$

Geraniol $y = 9,50 \cdot 10^5 (\pm 1,73 \cdot 10^6) + 5,50 \cdot 10^5 (\pm 3,25 \cdot 10^4) \cdot X$, $n=6$, $R^2 = 0,986$, $S_r = 2,63 \cdot 10^6$

Cafeïne $y = -5,58 \cdot 10^5 (\pm 7,90 \cdot 10^6) + 4,54 \cdot 10^5 (\pm 1,46 \cdot 10^4) \cdot X$, $n=6$, $R^2 = 0,996$, $S_r = 1,20 \cdot 10^6$

In figuur 16 zijn de kalibratielijnen weergegeven. Menthol valt net buiten de gestelde eis voor de validatie met een correlatiecoëfficiënt van 0,984. De andere stoffen vallen wel binnen de gestelde eis van 0,99. Gezien menthol erg dicht op de eis zit, is ervoor gekozen om door te gaan met de validatie.



Figuur 16: De lineariteit van de stoffen voor de validatie uitgezet. De concentratie is de concentratie van de stoffen in water voor de extractie.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is bepaald door een monster 8 keer achter elkaar te meten. Hiervoor is de standaard gebruikt met een concentratie van 50 mg/mL. De ruwe data van deze metingen zijn weergegeven in bijlage 2. De gestelde eis hierbij is een standaarddeviatie van minder dan 15%. In tabel 1 zijn de gevonden standaarddeviaties weergegeven. Hierbij valt op dat menthol en geraniol boven deze gestelde eis valt. Gezien de metingen van hetzelfde monster zijn, komt het verschil in de metingen uit de GC-MS. Om dit op te lossen zou er een interne standaard toegevoegd kunnen worden om te compenseren voor onregelmatigheden in de GC-MS. De overige stoffen voldoen wel aan de gestelde eis.

Verder is de herhaalbaarheid een eigenschap van het GC-MS systeem. Omdat er achter elkaar uit hetzelfde monster wordt geïnjecteerd, komen de verschillen vrijwel uitsluitend door het apparaat.

Tabel 1: Een samenvatting van de data voor het bepalen van de herhaalbaarheid berekend uit de dataset uit bijlage 2 met vergelijking 1

Stof	Standaarddeviatie in procent	Standaarddeviatie in mg/mL
Menthol	16,1	0,511
Carvon	14,0	1,63
Geraniol	15,3	2,43
Cafeïne	10,4	4,50

LOD en LOQ

De LOD en LOQ zijn bepaald uit de dataset van de metingen voor de herhaalbaarheid. De gevonden LOD en LOQ staan weergegeven in tabel 2. Hierbij valt op dat de LOD en LOQ aanzienlijk hoger is voor cafeïne. De eis was dat de LOQ kleiner moest zijn dan 20% van het monster. De LOQ is bepaald met een monster met een concentratie van 50 mg/mL, dus is de eis kleiner dan 10 mg/mL. Hier voldoet alleen menthol aan.

Omdat de LOD en LOQ afhangen van de standaarddeviatie zou ook hier een interne standaard kunnen helpen.

Tabel 2: De LOD en LOQ berekend met de dataset uit bijlage 2 met vergelijking 2 en vergelijking 3

Stof	Standaarddeviatie in procent	Standaarddeviatie in mg/mL	LOD in mg/mL	LOQ in mg/mL
Menthol	16,1	0,511	1,53	5,11
Carvon	14,0	1,63	4,88	16,3
Geraniol	15,3	2,43	7,30	24,3
Cafeïne	10,4	4,50	13,5	45,0

Reproduceerbaarheid

In tabel 3 zijn de standaarddeviaties te zien van de reproduceerbaarheid. De ruwe data van deze metingen zijn weergegeven in bijlage 3. De reproduceerbaarheid van alle metingen valt boven de gestelde eis. Deze is vergeleken met de reproduceerbaarheid van een GROB standaard die tussen de validatiemetingen door is gemeten als controle. Ook deze vertoont een soortgelijke spreiding. Net als bij de bepaling van de herhaalbaarheid zou een interne standaard de reproduceerbaarheid kunnen verbeteren.

Tabel 3: Een samenvatting van de data voor het bepalen van de reproduceerbaarheid

Stof	Standaarddeviatie in procent	Standaarddeviatie in mg/mL
Menthol	27,6	7,76
Carvon	28,4	14,3
Geraniol	30,4	11,2
Cafeïne	23,8	11,2

Recovery

Bij de recovery wordt er bepaald hoeveel monster verloren gaat bij de monstervoorbewerking. De recovery is bepaald bij een lage concentratie, een hoge concentratie en een concentratie ertussen in. De ruwe data van deze metingen zijn weergegeven in bijlage 4. De gevonden recovery's staan weergegeven in tabel 4, tabel 5 en tabel 6. Hierbij valt op dat er bij een hogere concentratie ook een hogere recovery is. De uitzondering hierop is cafeïne bij een lage concentratie. De grote standaarddeviatie laat zien dat de duplometing ver uit elkaar liggen. De hoogste waarde zal waarschijnlijk de uitschieter zijn.

Tabel 4: Recovery bij een spike van 50 µL van de validatiestandaard bij 400 µL kombucha

Stof	Recovery in procent
Menthol	53±14
Carvon	55±14
Geraniol	54±12
Cafeïne	86±30

Tabel 5: Recovery bij een spike van 100 µL van de validatiestandaard bij 400 µL kombucha

Stof	Recovery in procent
Menthol	52±7,4
Carvon	52±8,2
Geraniol	51±7,9
Cafeïne	40±17

Tabel 6: Recovery bij een spike van 200 µL van de validatiestandaard bij 400 µL kombucha

Stof	Recovery in procent
Menthol	70±1,6
Carvon	69±0,31
Geraniol	70±0,20
Cafeïne	68±4,6

Hiermee voldoet de methode niet aan de gestelde eisen voor de validatie. Voor de andere resultaten betekent dit dat er een groot vraagteken bijgezet moet worden.

Een mogelijke oorzaak van de grote spreiding in de metingen is dat deze metingen op de GC-MS op de hogeschool gedaan worden. Deze GC-MS wordt door meerdere leerlingen gebruikt voor verschillende projecten. Indien het apparaat niet goed schoon is na eerdere metingen, kan dat invloed hebben op de validatie.

De recovery laat zien dat bij een lage concentratie steeds minder meekomt in de extractie. In de literatuur worden vaak nog lagere concentraties gevonden voor stoffen in kombucha dan in de validatiestandaard.^{3,4} Dit geeft verdere verklaring waarom er in de eerdere stadia van het onderzoek geen stoffen geïsoleerd konden worden uit kombucha en waarom latere metingen zulke kleine signalen geven. De LOD ligt tussen de 1,53 en 13,5 mg/mL. Dit betekent dat veel van de stoffen in kombucha ver onder de LOD liggen en vrijwel niet van ruis kunnen worden onderscheiden.

Verder is de validatie gedaan met de validatiestandaard. De validatiestandaard is samengesteld uit stoffen die representatief zijn voor kombucha, maar niet alle stoffen zijn teruggevonden in kombucha. Dit betekent dat de validatie niet voor kombucha was, maar een validatie voor de detectie van menthol, carvon, geraniol en cafeïne.

Conclusie en aanbevelingen

Conclusie

Het doel van het onderzoek was het opzetten van een fingerprint analyse voor apolaire stoffen in kombucha met de GC-MS.

Als eerste is een methode ontwikkeld voor de analyse van menthol, carvon, geraniol en cafeïne. Vervolgens is de methode is gevalideerd voor lineariteit, herhaalbaarheid, detectielimiet, reproduceerbaarheid en recovery. Hierbij voldoet de kalibratielijns van menthol niet aan de gestelde eis. De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van alle componenten voldoen niet aan de gestelde eisen. Daardoor is te stellen dat de methode niet voldoet. Deze problemen kunnen worden opgelost door een interne standaard te gebruiken bij de metingen en de validatie nogmaals uit te voeren. Verder is het mogelijk dat de validatie wel zou voldoen op de GC-MS op het Foodlab. De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid zijn in principe eigenschappen van de GC-MS die wordt gebruikt en niet van de methode.

Tenslotte is er geprobeerd het fingerprint van verschillende batches kombucha te bepalen. Hierbij zijn diverse stoffen geïsoleerd en geïdentificeerd, waaronder cafeïne, fenylethanol, ethyl lactaat. Daarnaast zijn er veel stoffen geïsoleerd die niet geïdentificeerd kunnen worden.

Voordat deze methode volledig in gebruik kan worden genomen zal eerst de validatie moeten voldoen. Daarnaast zullen meer van de ongeïdentificeerde stoffen moeten worden geïdentificeerd.

Aanbevelingen

Op basis van mijn onderzoek kan ik een aantal aanbevelingen geven voor het vervolgonderzoek.

Als eerste kan er gekeken worden naar het indampen van de kombucha. Uit de recoverybepaling van de validatie blijkt dat de recovery hoger en consistent is bij een hogere concentratie in de waterige laag. De gevonden pieken in kombucha zijn erg laag, dus de concentraties van de apolaire stoffen in kombucha zijn ook erg laag. Door de kombucha te concentreren, bijvoorbeeld door het in te dampen met een rotatiefilmverdamer, wordt de concentratie hoger en kunnen de stoffen beter geïsoleerd en gedetecteerd worden.

Een andere richting voor verder onderzoek is kijken naar de mogelijkheid om de SCOBY te extraheren met een soxhlet opstelling.²¹ Een soxhlet wordt gebruikt om een stof te extraheren uit een vaste stof, zoals vetzuren uit de SCOBY. Gezien de gisten en bacteriën de vaste laag vormen op de kombucha, zitten hier waarschijnlijk metabolieten in die een indicatie kunnen geven over de kwaliteit van het product.

Met de bovenstaande methodes wordt de concentratie van de analieten verhoogd. Zoals bij de bepaling van de recovery te zien was, is de recovery hoger bij een hogere concentratie. Daarom is het laatste advies om bij deze nieuwe methodes ook pentaan te testen. Ten opzichten van DCM is pentaan nog minder polair. Daarom zou pentaan beter grote apolaire stoffen uit kombucha en de SCOBY kunnen isoleren.

Tenslotte zal de methode nogmaals gevalideerd moeten worden. Voor deze validatie is het beter om standaarden te kiezen die voorkomen in kombucha, zoals fenylalcohol en catechin, zodat de methode gevalideerd wordt voor kombucha.⁴

Referentielijst

- (1) Dufresne, C.; Farnworth, E. Tea, Kombucha, and Health: A Review. *Food Res. Int.* **2000**, *33* (6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3).
- (2) Tamang, J. P.; Cotter, P. D.; Endo, A.; Han, N. S.; Kort, R.; Liu, S. Q.; Mayo, B.; Westerik, N.; Hutkins, R. Fermented Foods in a Global Age: East Meets West. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19* (1), 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>.
- (3) Jayabalan, R.; Malbaša, R. V.; Lončar, E. S.; Vitas, J. S.; Sathishkumar, M. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>.
- (4) Villarreal-Soto, S. A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J.-P.; Renard, T.; Rollan, S.; Taillandier, P. Impact of Fermentation Conditions on the Production of Bioactive Compounds with Anticancer, Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties in Kombucha Tea Extracts. *Process Biochem.* **2019**, *83*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.004>.
- (5) Greenwalt, C. J.; Steinkraus, K. H.; Ledford, R. A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *J. Food Prot.* **2000**, *63* (7), 976–981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>.
- (6) Şanlıer, N.; Gökçen, B. B.; Sezgin, A. C. Health Benefits of Fermented Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59* (3), 506–527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>.
- (7) Villarreal-Soto, S. A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J.-P.; Taillandier, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J. Food Sci.* **2018**, *83* (3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.
- (8) Villarreal-Soto, S. A.; Bouajila, J.; Pace, M.; Leech, J.; Cotter, P. D.; Souchard, J.-P.; Taillandier, P.; Beaufort, S. Metabolome-Microbiome Signatures in the Fermented Beverage, Kombucha. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *333*, 108778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778>.
- (9) Marsh, A.; Hill, C.; Ross, R.; Cotter, P. Fermented Beverages with Health-Promoting Potential: Past and Future Perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>.
- (10) Chakravorty, S.; Bhattacharya, S.; Chatzinotas, A.; Chakraborty, W.; Bhattacharya, D.; Gachhui, R. Kombucha Tea Fermentation: Microbial and Biochemical Dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *220*, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>.
- (11) Home <https://yayakombucha.com/> (accessed 2021 -05 -31).
- (12) Mcgee, H. *Nose Dive: A Field Guide to the World's Smells*; John Murray Press, 2020.
- (13) Extraction of Caffeine. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* **2019**, *6* (9). <https://doi.org/10.20431/2349-0403.0609002>.
- (14) Bilia, A. R.; Flamini, G.; Taglioli, V.; Morelli, I.; Vincieri, F. F. GC–MS Analysis of Essential Oil of Some Commercial Fennel Teas. *Food Chem.* **2002**, *76* (3), 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00277-1).
- (15) Koek, M. M.; Muilwijk, B.; van der Werf, M. J.; Hankemeier, T. Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (4), 1272–1281. <https://doi.org/10.1021/ac051683+>.
- (16) 3.1: Principles of Gas Chromatography [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.01%3A_Principles_of_Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.01%3A_Principles_of_Gas_Chromatography) (accessed 2021 -01 -31).
- (17) Europe, S. Clinical mass spectrometry: a short review <https://www.spectroscopyeurope.com/article/clinical-mass-spectrometry-short-review> (accessed 2021 -01 -31).
- (18) Klaessens, J.W.A. *Statistiek, Validatie En Meetonzekerheid*; Syntax Media, 2013.

- (19) González, O.; Blanco, M. E.; Iriarte, G.; Bartolomé, L.; Maguregui, M. I.; Alonso, R. M. Bioanalytical Chromatographic Method Validation According to Current Regulations, with a Special Focus on the Non-Well Defined Parameters Limit of Quantification, Robustness and Matrix Effect. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 10–27.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>.
- (20) Baldermann, S.; Yang, Z.; Katsuno, T.; Tu, V. A.; Mase, N.; Nakamura, Y.; Watanabe, N. Discrimination of Green, Oolong, and Black Teas by GC-MS Analysis of Characteristic Volatile Flavor Compounds. *Am. J. Anal. Chem.* **2014**, *05* (09), 620–632.
<https://doi.org/10.4236/ajac.2014.59070>.
- (21) Chin, F.-S.; Chong, K.-P.; Markus, A.; Wong, N. K. Tea Polyphenols and Alkaloids Content Using Soxhlet and Direct Extraction Methods. **2013**, 6.

Bijlage

Bijlage 1: De ruwe data van de lineariteitsbepaling

10 mg/mL	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak	Werkelijke concentratie
Menthol	11.24	10442185	26.05	9
Carvon	12.9	13680557	34.13	14.56
Geraniol	13.1	5626125	14.04	9.60
Cafeïne	23.57	4441738	11.08	9.80
30 mg/mL	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak	Werkelijke concentratie
Menthol	11.24	32858810	27.83	27.00
Carvon	12.91	45931317	38.9	43.68
Geraniol	13.11	20726389	17.56	28.80
Cafeïne	23.57	12839241	10.88	29.40
50 mg/mL	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak	Werkelijke concentratie
Menthol	11.24	42502855	28.31	45.00
Carvon	12.91	59265278	39.47	72.80
Geraniol	13.11	26598084	17.72	48.00
Cafeïne	23.57	19825882	13.2	49.00
70 mg/mL	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak	Werkelijke concentratie
Menthol	11.24	53345466	27.03	63.00
Carvon	12.91	77082246	39.06	101.92
Geraniol	13.1	34964357	17.72	67.20
Cafeïne	23.57	30129162	15.27	68.60
100 mg/mL	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak	Werkelijke concentratie
Menthol	11.25	81170774	26.95	90.00
Carvon	12.91	1.17E+08	38.78	145.6
Geraniol	13.11	55070863	18.28	96.00
Cafeïne	23.57	45166168	14.99	98.00

Bijlage 2: De ruwe data van de metingen voor het bepalen van de herhaalbaarheid

Herhaalbaarheid 1	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	28689368	27.99
Carvon	12.89	40618317	39.63
Geraniol	13.09	18179154	17.74
Cafeïne	23.56	15017106	14.65
Herhaalbaarheid 2	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	26686076	26.29
Carvon	12.9	41073587	40.46
Geraniol	13.1	18167081	17.9
Cafeïne	23.56	15592738	15.36

Herhaalbaarheid 3	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	22043872	26.31
Carvon	12.9	33087785	39.5
Geraniol	13.1	14470702	17.27
Cafeïne	23.56	14169057	16.91
Herhaalbaarheid 4	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	22567920	26.34
Carvon	12.9	34066140	39.76
Geraniol	13.1	14959746	17.46
Cafeïne	23.56	14081082	16.44
Herhaalbaarheid 5	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	21623667	26.44
Carvon	12.9	32677393	39.96
Geraniol	13.1	14112515	17.26
Cafeïne	23.56	13368638	16.35
Herhaalbaarheid 6	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	18834386	26.21
Carvon	12.9	28684084	39.92
Geraniol	13.1	12190638	16.97
Cafeïne	23.56	12137626	16.89
Herhaalbaarheid 7	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	17818824	24.86
Carvon	12.89	28189168	39.33
Geraniol	13.09	12295099	17.16
Cafeïne	23.56	13366969	18.65
Herhaalbaarheid 8	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	22139011	24.66
Carvon	12.9	35240010	39.25
Geraniol	13.1	15490535	17.25
Cafeïne	23.56	16912739	18.84

Bijlage 3: De ruwe data van de metingen voor het bepalen van de reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheid 1	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	48253421	27.11
Carvon	12.91	69841387	39.24
Geraniol	13.1	32452064	18.23
Cafeïne	23.57	25587079	14.38
Reproduceerbaarheid 2	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	35676487	26.08
Carvon	12.9	51886528	37.93
Geraniol	13.09	23976949	17.53
Cafeïne	23.56	21451587	15.68
Reproduceerbaarheid 3	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	24145687	26.96

Carvon	12.91	34316729	38.31
Geraniol	13.11	15124159	16.89
Cafeïne	23.57	15979464	17.84
Reproduceerbaarheid 4	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	34940955	28.41
Carvon	12.9	49373050	40.15
Geraniol	13.1	22152431	18.01
Cafeïne	23.57	16506610	13.42

Bijlage 4: De ruwe data van de recovery bepaling

Recovery 1	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	7456639	13.92
Carvon	12.9	10314087	19.26
Geraniol	13.1	4270604	7.97
Cafeïne	23.56	13948832	26.05
Recovery 1 duplo	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	5132513	10.17
Carvon	12.9	7412485	14.68
Geraniol	13.1	3136409	6.21
Cafeïne	23.56	12064431	23.9
Recovery 2	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.23	10684415	15.99
Carvon	12.9	15131599	22.64
Geraniol	13.1	6551724	9.8
Cafeïne	23.56	13522237	20.23
Recovery 2 duplo	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	8732580	15.72
Carvon	12.9	12118531	21.82
Geraniol	13.1	5273334	9.5
Cafeïne	23.56	11510905	20.73
Recovery 3	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	20657190	20.12
Carvon	12.9	28367021	27.64
Geraniol	13.1	12881782	12.55
Cafeïne	23.56	18508038	18.03
Recovery 3 duplo	Retentietijd	Piekoppervlak	Percentage oppervlak
Menthol	11.24	19994847	20.46
Carvon	12.9	28185487	28.85
Geraniol	13.1	12932859	13.24
Cafeïne	23.56	19431726	19.89