ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ POLYFENOLŮ VE SLADINÁCH, MLADINÁCH A PIVECH

ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN SWEET WORT, WORT AND BEER

MARKÉTA DVOŘÁKOVÁ, PAVEL DOSTÁLEK, PETR HULÍN, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Pavel.Dostalek@vscht.cz

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Hulín, P.: Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. Kvasny Prum. 52, 2006, č. 4, s. 111–114.

Článek popisuje způsoby analytického stanovení polyfenolů v pivovarství. Metody pro toto stanovení jsou rozděleny do dvou skupin, analytické metody pro stanovení skupin polyfenolů a metody pro stanovení individuálních polyfenolů. Skupinové metody slouží ke stanovení anthokyanogenů, tanoidů a flavonoidů. Pro stanovení jednotlivých polyfenolů je nejrozšířenější metodou HPLC na reverzní fázi s různými druhy detekce. Méně rozšířená je metoda GC ve spojení s MS detekcí, a to kvůli derivatizaci analytu.

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Hulín, P.: Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Sweet Wort, Wort and Beer. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 4, p. 111–114.

This article describes the ways of analytical determination of polyphenols in brewing. The methods for this determination are divided into two groups, analytical methods for group determination and determination of individual polyphenols. The group methods are for the determination of anthocyanogens, tanoids and flavonoids. For the determination of individuals polyphenols is the most widespread method HPLC (reverse phase) with different types of detection. Less widespread method is GC with MS detection, from point of view analyte derivatization.

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Hulín, P.: Analytische Methoden zur Polyphenolsbestimmung in den Süßwürzen, Würzen und im Bier. Kvasny Prum. 52, 2006, Nr. 4, S. 111–114.

Klíčová slova: analytické metody, pivo, sladina, mladina, polyfenoly
Keywords: analytical methods, beer, wort, hopped wort, polyphenols

1 ÚVOD

Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin, které do piva přechází ze sladu a chmele. V průběhu pivovarského procesu dochází ke změnám jejich zastoupení a struktury a v řadě kroků ovlivňují technologický postup.

Mezi jejich nejdůležitější chemické vlastnosti patří schopnost reagovat s proteiny za tvorby výšemolekulárních komplexů a dále jejich antioxidační aktivita. Tvorba polyfenol-bílkovinných komplexů negativně ovlivňuje koloidní stabilitu piva, zatímco redukční schopnost a schopnost vychytávání volných radikálů působí pozitivně na senzoryckou stabilitu piva i na lidské zdraví.

Polyfenoly jakožto přirozené antioxidanty vyskytující se v potravě mohou snižovat pravděpodobnost výskytu některých civilizačních chorob konzumentů, v této souvislosti se uplatňují především antiaterosklerotické, antikarcinogenní, případně fytoestrogenní účinky některých polyfenolových látek.

Z uvedených důvodů jsou analytické metody stanovení polyfenolů předmětem výzkumu nejen pivovarských analytiků. Ačkoliv v minulosti se používala celá řada různorodých způsobů stanovení těchto látek, dnes analýze dominuje především vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofoto-

metrickou, hmotnostní nebo elektrochemickou detekcí. Aktuálním problémem stanovení je izolace, přečištění a zakoncentrování analyzovaných látek z vysoce komplexní přírodní matrice.

2 ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ POLYFENOLŮ

Metody používané v analýze polyfenolových látek je možno v současné době rozdělit do dvou hlavních částí. První z nich využívá společných vlastností větších či menších skupin polyfenolových sloučenin a jedná se tedy o metody skupinové.

Analytickým metodám pro stanovení jednotlivých polyfenolových látek dominuje HPLC (High Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) na reverzní fázi s různými možnostmi detekce UV-VIS, DAD (detektor s diodovým polem), MS (hmotnostní detektor). Staršími možnostmi jsou kapilární plynová chromatografie (CGC), papírová chromatografie (PC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a podobně [1].

2.1 Skupinové analytické metody
Stanovení celkových polyfenolů metodou EBC: Tato metoda je založena na reakci

In diesem Artikel werden angewandte Methoden zur Polyphenolsbestimmung in den Brauereien beschrieben. Die für diesen Zweck bekannte Methoden wurden in zweien Gruppen geteilt, die erste analytische Methode zur Bestimmung von Polyphenolsgruppen, die auch zur Anthokyanogen-, Tanoid-, und Flavonoidbestimmung angewandt wird und die zweite Methode zur Individualpolyphenolsbestimmung. Die Methode HPLC auf der reversen Phase mit verschiedenen Detektionssorten ist die häufigste angewandte Methode zur Bestimmung von individualen Polyphenols, die andere Methode GC in Verbindung mit MS Detektion ist wegen der Analytderivatization weniger verbreitet.

Дворжакова, М. – Досталек, П. – Гулин, П.: Аналитические методы определения полифенолов в неохмеленных суслах, суслах и пивах. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 4, стр. 111–114.

В статье описываются способы аналитического определения полифенолов в пивной промышленности. Настоящие методы распределены в две группы, т.е. методы для определения групп полифенолов и методы для определения индивидуальных полифенолов. Первая группа методов служит для определения антокианогенов, таноидов и флавоноидов. Для определения отдельных полифенолов более часто употребляемым методом является HPLC на реверсивную фазу с применением разных видов детектирования. Менее часто употребляемым методом является GC в связи с MS детектированием из за дериватизации аналита.

polyfenolů s trojmocnými ionty železa v alkalickém prostředí, při které dochází k tvorbě červeně zbarveného komplexu. Intenzita vzniklého zbarvení je měřena spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 600$ nm proti slepému pokusu. Výsledek je dán vzorcem a uvádí se v miligramech na litr [2].

Stanovení anthokyanogenů podle Harrise a Ricketse: V této metodě jsou polyfenolové látky vzorku nejprve adsorbovány polyamidovým práškem, zachycené látky jsou potom z adsorbentu uvolněny za tepla působením směsi butanol-chlorovodíkové kyseliny. Intenzita zbarvení vzniklých oxoniových solí je určena spektrofotometricky při $\lambda = 550$ nm proti slepému pokusu. Závislost obsahu anthokyanogenů na naměřené absorbanci je tabelována a výsledky je možno odečíst z tabulky [3].

Stanovení tanoidů podle Chapona: Metoda je založena na principu tvorby komplexů polyfenolů s polyvinylpyrrolidonem (PVP). Do roztoku obsahujícího tanoidy se dávákuje polyvinylpyrrolidon (PVP). Vzniká zákal, jehož intenzita se zvyšuje tak dlouho, než se všechny tanoidy adsorbují. Množství PVP, které se musí přidat k dosažení maxima zákalu, je proporcionální obsahu tanoidů. Vzniklý zákal se změří nefelometricky. Výsledek je dán vzorcem a je vyjádřen v miligramech PVP na litr [3].

Stanovení flavanoidů: V kyselém prostředí reagují flavanoidy s chromogenem p-dimethylaminocinnamaldehydem za vzniku barevných pigmentů. Metoda dovoluje kvantitativní stanovení např. katechinu a proanthokyanidinu. Vzorek se smíchá s kyselou solucí chromogenu a výsledná intenzita zbarvení je proměřena spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 640$ nm. Výsledek je dán vzorcem a je vyjádřen v katechinových ekvivalentech v miligramech na litr [2].

2.2 Analytické metody pro stanovení jednotlivých polyfenolů

Volby jednotlivých analytických kroků pro stanovení jednotlivých polyfenolů jsou shrnuty v následující části. Extrakce a zakoncentrování stanovených látek bývá běžně provedeno v jednom kroku, dále se někdy zavádí frakcionace polyfenolů na fenolové kyseliny a neutrální látky.

2.2.1 Extrakce, zakoncentrování a purifikace

Nízká hladina polyfenolových látek v analyzovaném materiálu často vyžaduje provedení vhodné extrakce vedoucí k získání zakoncentrovaného podílu analyzovaných látek s redukovaným obsahem interferujících příměsí. Vzhledem ke značné složitosti chromatogramů extraktů polyfenolů z HPLC, zavádí někteří autoři analytické kroky vedoucí k frakcionaci polyfenolových látek nejčastěji na základě rozdílné disociační konstanty [4,5].

Z hlediska provedení se dají jednotlivé metody extrakce rozdělit do dvou následujících skupin: LLE (Liquid-liquid extraction – extrakce kapalina-kapalina) a SPE (Solid Phase Extraction – extrakce na pevné fázi). Např. Bendini a kol. [6] se zabývali porovnáním výtěžností extrahovaných látek z olivového oleje pomocí SPE a LLE. Pirisi a kol. [7] se také zabývají srovnáním SPE s C_{18} a C_8 náplní a LLE s hexanem. Kvantifikace zachycených sloučenin byla provedena pomocí HPLC-DAD-MS a CZE (kapilární zónová elektroforéza) s UV-VIS detekcí. Pořadí jednotlivých metod dle klesající výtěžnosti bylo LLE, C_{18} a C_8 -SPE.

Extrakční a čistící kroky obecně prodlužují dobu analýzy, Cappanesi a kol. [8] uvádí alternativní možnost detekce pomocí biosenzoru, založené na tyrosinasové oxidaci polyfenolových sloučenin, která nevyžaduje předcházející úpravu vzorku.

2.2.1.1 Kapalinová extrakce – (LLE – Liquid-liquid extraction)

V potravinářské analýze polyfenolových látek existuje velká variabilita různých analyzovaných materiálů, přesto se pro účely kapalinové extrakce používá relativně malé množství extrakčních činidel, a to buď samotných, nebo ve vzájemné kombinaci.

Tradičními běžně používanými rozpouštědly jsou horká voda, methanol, ethanol, aceton, a ethylacetát, který se vyskytuje nejčastěji. Vzácněji jsou používána jiná rozpouštědla, např. acetonitril, DMF (dimethylformamid) a chloroform [5, 9].

Extrakce je z důvodu dosažení maximálního výtěžku často prováděna za nepřístupu světla, kyslíku, s případkem umělých antioxidantů apod. Mechanická úprava vzorku bývá použita k zamezení molekulárních interakcí, respektive k podpoře uvolnění látek z vázaných forem. Nejčastějším provedením ex-

trakce fenolových kyselin bývá opakovaná Soxhletova extrakce trvající v jednom kroku jednu až šest hodin [1].

Extrakce flavonoidů a jednoduchých fenolových kyselin probíhá obdobně, rozdělovacím faktorem je pH, čehož lze využít pro oddělení těchto dvou frakcí. Frakcionaci je tedy možné provést např. kapalinovou extrakcí ethylacetátem při pH 7 a při pH 2, případně zadržít na C_{18} koloně a elucí roztoky o různém pH. Jinou možností rozdělení polyfenolů na fenolové kyseliny a neutrální látky může být frakcionace pomocí iontovýmenné chromatografie na silném aniontu [1, 10].

Z jiných možností např. Chang a kol. [11] uvádí možnost použití nadkritické fluidní extrakce oxidem uhličitým pro izolaci polyfenolových látek zeleného čaje.

2.2.1.2 Extrakce na pevné fázi – (SPE)

K tomuto druhu extrakce se nejčastěji používá chromatografických náplňových kolon s řadou adsorpčních materiálů, jako jsou polyamidové materiály, PVPP, Sephadex, modifikovaný silikagel, mikrokrytalická celulóza a další. S extrakčním krokem analýzy zde bývá často spojeno i přečištění analytu, případně frakcionace jednotlivých skupin polyfenolových látek. Silikagel je zvláště vhodný pro analýzu méně polárních isoflavonů, flavanonů, flavonů a flavonolových glykosidů. K modifikaci vnitřního povrchu silikagelové náplně kolon se používají obdobné funkční skupiny jako v případě kolon pro HPLC na reverzní fázi (C_8 , C_{18} , DIOL). Naproti tomu polyamid je adsorbent vhodný pro separaci flavonoidů o různé polaritě, zvláště pak glykosidů [12]. Minikolonky s náplní polyamidu 6 byly použity k frakcionaci flavonolů z červené malinové šťávy. První část flavonoidů, která byla získána elucí methanolem, obsahovala glykosidy kvercetin, kvercetin a kempferol. Druhá část byla z kolony vymyta mobilní fází skládající se z 0,5% roztoku amoniaku v methanolu a obsahovala flavonolové glukuronidy, aglykony, kyselinu ellagovou a její deriváty [13].

Např. McMurrough a kol. [14] uvádějí extrakci směsí aceton/voda, odpaření rozpouštědla, rozpuštění zbytku v ethanolu a následnou frakcionaci polyfenolů na koloně s náplní Sephadex.

García a kol. [5] uvádí metodu zakoncentrování na C_{18} Sep-Pak koloně kondicionované methanolem a promyté vodou. Po nanesení a eluci okyseleného vzorku byla kolona vysušena dusíkem. Zachycené fenolové látky byly eluovány acetonitrilem a po odpaření rozpouštědla na vakuové odparce opět rozpuštěny ve směsi methanol/voda (1:1) s 1 % kyseliny sírové. Oddělení flavonových glykosidů od flavonolů nebo flavonových glykosidů je obvykle obtížné, ale může být provedeno na celulosových kolonách s vodou jako promývacím roztokem [15].

2.2.2 Chromatografické metody a detekce látek

Mezi starší metody analýzy polyfenolů v potravinách patří jednoduchá provedení chromatografických metod. Do této skupiny patří např. papírová chromatografie (PC), používající jako stacionární fázi chromatografický papír.

Z dalších dříve značně využívaných metod je možno zmínit např. chromatografii na tenké vrstvě (TLC) s různými možnostmi stacio-

nární fáze (silikagel, celulóza, polyamid). Výběr pevné fáze závisí na skupině flavonoidů, která má být analyzována, hydrofilní flavonoidy mohou být snadno separovány pomocí TLC na polyamidu nebo mikrokrytalické celulóze. Silikagel bývá používán při TLC analýze méně hydrofilních látek jako jsou flavony a isoflavony. Detekce separovaných skupin analytů je prováděna reakcí s činidly za tvorby barevných komplexů, případně tvorby fluoreskujících komplexů. Chromatografie na tenké vrstvě je finančně a časově nenáročná, její hlavní nevýhodou je omezená možnost kvantifikace a nízká výtěžnost [1, 13, 17].

2.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza – (CZE)

CZE je vysoce účinná metoda, při které dochází k separaci látek na krátké křemenné kapiláře s průměrem od 50–100 μ m. Jedná se o poměrně rychlou a levnou metodu, která může dosáhnout lepší selektivity než analýza pomocí HPLC [9]. Separaci kromě parametrů kapiláry ovlivňuje navíc pH a také organické látky, které se používají jako modifikátory v nosných elektrolytech. Tato rozpouštědla ovlivňují pohyblivost analytu snížením polarizability, mohou zlepšit selektivitu a tím zvýšit pravděpodobnost identifikace analyzovaných látek [18]. CZE umožňuje paralelní stanovení široké škály nabitých látek, zatímco sloučeniny bez náboje jsou odnášeny elektroosmotickým tokem bez separace. Molekuly flavonoidů obsahují elektrický náboj v alkalickém prostředí. Aby nedošlo k zahlcení kapiláry, bývá objem analyzovaného vzorku velmi nízký [13].

Na rozhraní mezi elektroforetickými a chromatografickými metodami se pohybuje micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC).

2.2.2.2 Plynová chromatografie – (GC)

Základním problémem použití této analytické metody je nízká těkavost fenolových sloučenin. Z tohoto důvodu se její využití omezuje především na stanovení jednoduchých fenolových kyselin a nízkomolekulárních flavonoidů. Hydroxylové skupiny je nutno převést na ethery, případně estery. K derivatizaci bývá nejčastěji použita trialkylsilylová skupina, nejčastěji v podobě trimethylsilylových derivátů. Nejběžněji používanými silylačními činidly pro derivatizaci fenolových kyselin jsou N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamid, N-metyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid a N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid. Pro vlastní chromatografické rozdělení jsou nejčastěji použity kapilární kolony z taveného křemene o délce 25–30 m, vnitřním průměrem 0,25–0,5 mm a tloušťce vnitřní vrstvy (stacionární fáze) 0,25 μ m. Jako příklad používané stacionární fáze je možno uvést polysiloxanový materiál DB-5, který obsahuje 95 % methylových a 5 % fenylových substituentů.

K detekci byl dříve běžně používán plamenově ionizační detektor (FID), dnes převládá spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) v uspořádání s ionizační nárazem elektronu (EI) [1, 19].

2.2.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – (HPLC)

Nejpoužívanější současnou metodou pro stanovení polyfenolových látek je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi.

Kolony používané v HPLC analýze bývají 10–100 cm dlouhé (nejčastěji 10–25 cm), jejich vnitřní průměr se obvykle pohybuje v rozmezí od 0,2 do 5 mm. U přírodních vzorků obsahujících větší množství balastních látek, které by mohly vyvolat předčasné znehodnocení kolony, bývá často před vlastní kolonou zařazena ochranná předkolonka. Jako chemicky vázané stacionární nepolární skupiny pro reverzní fázi se nejčastěji používají C_8H_{17} –, $C_{18}H_{37}$ – a méně často fenyl. Tyto skupiny jsou obvykle vázány na vrstvu silikagelu. Pro takto hydrofobizovanou stacionární fázi se používá spíše polárních mobilních fází na bázi binárních až ternárních směsí vody, methanolu, acetonitrilu, THF (tetrahydrofuran) či dioxanu. Retenční poměry řady látek se dají ovlivnit změnou pH mobilní fáze (např. zvýšením pH mobilní fáze se zvyšují retenční časy bazických látek a snižují retenční časy kyselých složek) [16, 20].

V analýze fenolových látek je téměř výhradně používána stacionární fáze C_{18} s vnitřním průměrem kolony od 2 do 5 mm (HPLC ve spojení s hmotnostní detekcí využívá menších průměrů). Velikost částic bývá většinou 3 až 5 μ m. Nejčastěji se používá lineární gradientová eluce, mobilní fáze se skládá z polární a nepolární části, někdy obsahuje i roztoky s pufrací kapacitou. Vodná fáze obsahuje často přísady kyseliny octové, používaná organická rozpouštědla v nepolární fázi jsou methanol, acetonitril, propanol, butanol, THF, ethylacetát a další. Volba mobilní fáze a její pH závisí na druhu použité stacionární fáze. Mobilní fáze obsahují často příměsi organických kyselin (nejčastěji kyselina octová) pro zvýšení retence slabě kyselých látek, případně příměsi slabých zásad pro zvýšení retence slabě zásaditých látek. Eluce bývá obvykle prováděna s binárním lineárním gradientem [1, 21].

HPLC s reverzní stacionární fází je používána především pro analýzu nepolárních a slabě polárních látek, je ale možné ji využít i k analýze silně kyselých, případně silně zásaditých látek. K těmto účelům se používá modifikací HPLC na reverzní fázi (RPLC), konkrétně IP-RPLC, kde retenci kyselin (základy) v reverzní fázi zvyšuje přítomnost protiiontu, odtud označení iontové párová – RPLC. Protiiontem pro kyselé látky bývá běžně např. octan amonný, pro zásady např. kyselina mravenčí. Jinou možností separace silně polárních látek jsou metody v provedení chromatografie na měničích iontů (IC-RPLC) [22,23].

Za obvyklých podmínek analýzy na reverzní fázi jsou nejvíce polární látky eluovány jako první, tedy diglykosidy předcházejí monoglykosidy a monoglykosidy předcházejí aglykony. Pro stejné substituované sloučeniny klesá intenzita afinity k mobilní fázi v pořadí flavanony > flavonoly > flavony. Chromatografické chování anthokyanů na koloně s reverzní fází je určeno celkovou polaritou a stereochemií sloučeniny. Klíčovými faktory jsou především charakter substituce B-kruhu flavanového skeletu, počet, poloha a druh sacharidických substituentů, případně míra jejich acylace. Tedy substituce B-kruhu určuje pořadí eluce jednotlivých látek jako delphinidin < kyanidin < petunidin < pelargonidin < peonidin < malvidin. Glykosylace celkově snižuje retenci v řadě 3,7-diglykosidy < 3,5-diglykosidy < 3-glykosidy < 3-galaktosidy < 3-glukosidy < 3-rutinosidy. Případná acetylace cukerných složek snižuje mobilitu sloučenin [21].

Dalluge a kol. [24] srovnával vhodnost šesti různých kolon a dvou mobilních fází pro analýzu čajových katechinů pomocí HPLC na reverzní fázi. Eluované látky byly detekovány spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 210$ nm. Pro správné rozlišení látek za daných podmínek bylo nezbytné použít mobilní fáze (acetonitril-voda a acetonitril, methanol-voda) s přísadkem kyseliny trifluoroctové. Nejvyšší účinnosti dosahovaly deaktivované monomerní kolony s oktadecylsilylovou fází.

2.2.2.4 Detektory používané pro HPLC

Třemi základními variantami detekce pro kapalinovou chromatografii jsou:

- A – optické detektory
- B – hmotnostní detektor
- C – elektrochemické detektory.

A Optické detektory

Dřívější detekce eluovaných látek byla založena především na sledování absorpce záření o charakteristické vlnové délce. Eluát zde obvykle protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou, kde je při vhodné vlnové délce registrována absorpce eluátu. Zdrojem záření bývá obvykle deuteriová výbojka pro UV oblast a halogenová žárovka pro viditelnou oblast. Je možno výhodně využít nastavitelnosti jednokanálového snímače na různou vlnovou délku, případně použít mnohokanálové detekce. Pro skupinu anthokyanidinů a anthokyanů se jednalo o rozmezí 515–520 nm, ostatní flavonoidy byly detekovány v různých hodnotách UV-spektra, např. 280 nm pro flavanonové glykosidy. Většina flavonoidů vykazuje dvě hlavní skupiny absorpčních pásů: pás v rozmezí 320–385 nm vlivem absorpce B-kruhu a druhý pás v rozmezí 250–285 nm vlivem absorpce kruhu A [12, 27].

Značného rozšíření se dostalo detektoru s diodovým polem (diode-array detektor, DAD), který je schopen snímat spektra látek v širším vlnovém rozsahu a pro charakterizaci stanovených látek je tedy použito jak retenčního chování na koloně, tak jejich spektrálních vlastností. S narůstajícím počtem hydroxylových skupin molekuly dochází k posunu absorpčních maxim k viditelným oblastem světelného spektra [12].

Mycí hlavice

REGOM
INSTRUMENTS

Brabcova 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206
☎ 241 400 290

✉ regom@regom.cz
🌐 www.regom.com

Fluorimetrický detektor využívá funkce excitačního monochromátoru, který produkuje záření absorbované fluorescenčně aktivními látkami. Následně emitované záření je detekováno fotoelektrickým násobičem po průchodu emisním monochromátorem, lze tedy nezávisle měnit dva parametry: excitační i emisní vlnovou délku. Jednoznačnou předností fluorimetrického detektoru je jeho vysoká citlivost, v řadě případů je schopen detekovat eluovanou látku v koncentraci 10–1000x menší než fotometrický detektor. Použití fluorescenčního detektoru je ovšem omezeno pouze na látky, které vykazují přirozenou fluorescenci, nebo na nefluoreskující látky, které lze na fluoreskující sloučeniny převést vhodnou reakcí. Z fenolových látek jsou např. deriváty hydroxykumarinu, skopolin a umbelliferon schopny emitovat záření v rozmezí vlnové délky 450–460 nm.

B Hmotnostní detektor

Značné pozornosti si zasluhuje spojení HPLC s hmotnostním detektorem (MS), který je v podstatě univerzální a dovoluje přesnou identifikaci velkého množství látek. Nevýhodou hmotnostní spektrometrie jsou vysoké nároky na čistotu analytu, a dále potom velmi vysoké pořizovací a provozní náklady měřicí techniky. Nejčastějším způsobem ionizace bývá ionizace za atmosférického tlaku (API) ve dvou hlavních uspořádáních dle ionizačních zdrojů jako elektro-spray (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Oba dva způsoby mohou vhodně sloužit k analýze širokého spektra látek. ESI patří mezi vysoce citlivé, šetrné ionizační techniky, je vhodná pro analýzu polárních, netěkavých, termolabilních sloučenin, jako jsou např. anthokyany. APCI je dalším zdokonalením electrospray ionizace, při kterém dochází k ionizaci odpařeného vzorku pomocí koronového výboje, analyzované látky získávají elektrický náboj chemickou ionizací. APCI byla použita např. pro stanovení isoflavonů [12, 19, 28, 29].

C Elektrochemická detekce

Pro analýzu polyfenolových látek je dále možno použít detekčních metod založených na měření elektrochemických reakcí. Rozlišení jednotlivých sloučenin je založeno na míře jejich oxidovatelnosti, která souvisí se změnami ve struktuře molekul jednotlivých polyfenolů, respektive s dostupností elektronů a schopností stabilizace náboje.

Dvěma nejběžnějšími možnostmi elektrochemické detekce v analýze polyfenolových látek jsou voltametrická a coulometrická detekce.

Voltametrický detektor: dovoluje zaznamenat velmi malé koncentrace organických látek v eluentu v těch případech, kdy jsou látky elektrochemicky redukovatelné nebo oxidovatelné. Princip detekce je založen na měření proudu mezi polarizovatelnou a měřenou elektrodou v závislosti na vloženém potenciálu. Často je tento detektor označován jako amperometrický detektor, neboť na elektrody se zpravidla vkládá konstantní potenciál a proud je měřen v závislosti na čase. Základní podmínkou voltametrického měření je dostatečná vodivost mobilní fáze [27].

Coulometrický detektor: při coulometrickém stanovení dochází ke kvantitativní oxidaci (případně redukci) analytu na pracovní elektrodě nebo kvantitativně reaguje s činid-

lem na elektrodě vzniklým. Elektroda bývá vyrobena z porézního grafitového materiálu. Při způsobu coulometrické analýzy za kontrolovaného potenciálu, kdy je na elektrochemickou celu vloženo konstantní napětí, je celkový náboj roven ploše pod křivkou závislosti proudu na čase. Látkové množství stanovovaného analytu se vypočte z Faradayova zákona. Proud probíhající celou je úměrný koncentraci redukovatelného (oxidovatelného) analytu a s probíhající reakcí klesá. Coulometrický detektor dosahuje vyšší selektivity a citlivosti vůči analytu [15, 25, 26, 27].

Tato práce je součástí řešení Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a sladu 1M6215648902.

Literatura

- Robbins, R. J.: Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. J. Agric. Food Chem. **51**, 2003, 2866–2887.
- Analytica EBC, 5th Edition, Hans Carl Fachverlag, Nürnberg, 1998.
- Basařová, G. a kol.: Pivovarsko-sladařská analytika. Merkanta, Praha, 1993.
- Hofta, P.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha, 2002.
- García, A.A., Grande, B.C., Gándara, J.S.: Development of a Rapid Method Based on Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection for Determination of Polyphenols in Alcohol-free Beers. J. Chromatogr. A **1054**, 2004, 175–180.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B.: Liquid-liquid and Solid-phase Extractions of Phenols from Virgin Olive Oil and their Separation by Chromatographic and Electrophoretic Methods. J. Chromatogr. A **985**, 2003, 425–433.
- Pirisi, M., Migliorini, M., Muggelli, M.: Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. J. Agric. Food Chem. **48**, 2000, 1191–1196.
- Capannesi, C., Palchetti, I.: Electrochemical Sensor and Biosensor for Polyphenols Detection in Olive Oils. Food Chem. **71**, 2000, 553–562.
- Justesen, U., Knuthsen, P.: Quantitative Analysis of Flavonols, Flavones and Flavanones in Fruits, Vegetables and Beverages by High-performance Liquid Chromatography with Photo-diode Array and Mass Spectrometric Detection. J. Chromatogr. A **799**, 1998, 101–110.
- Guillén, D., Merello, F., Barroso, C.: Solid-Phase Extraction for Sample Preparation in the HPLC Analysis of Polyphenolic Compound in „Fino“ Sherry Wine. J. Agric. Food Chem. **45**, 1997, 403–406.
- Chang, C., Chiu, K., Chen, Y.: Effect of Ethanol Content on Carbon Dioxide Extraction of Polyphenols from Tea. J. Food Compos. Anal. **14**, 2001, 75–82.
- Robards, K., Antolovich, M.: Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review. Analyst. **122**, 1997, 11–34.
- Díaz, D., Arias, C.: A Chromene an Isoprenylated Methyl Hydroxybenzoate and a C-methyl Flavanone from the Bark of Piper Hostmannianum. Phytochemistry **26**, 1987, 809–811.
- McMurrough, I.: High Performance Liquid Chromatography of Flavonoids in Barley and Hops. J. Chromatogr. A **215**, 1981, 683–693.
- Chu, K. O., Wang, Ch. Ch., Rogers, M. S., Choy, K. W., Pang, Ch. P.: Determination of catechins and catechin gallates in biological fluids by HPLC with coulometric array detection and solid-phase extraction. Anal. Chim. Acta **510**, 2004, 69–76.
- Tsao, R., Deng, Z.: Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. J. Chromatogr. B **812**, 2004, 85–99.
- Finger, A., Kuhr, S.: Chromatography of Tea Constituents. J. Chromatogr. A **624**, 1992, 293–315.
- Zuo, Y., Chen H., Deng, Y.: Simultaneous Determination of Catechins, Caffeine and Gallic Acids in Green, Oolong, Black and Pu-erh Teas Using HPLC with a Photodiode Array Detector. Talanta **57**, 2002, 307–316.
- Robards, K., Prenzler, P., Tuckler, G.: Phenolic Compounds and their Role in Oxidative Processes in Fruits. Food Chem. **66**, 1999, 401–436.
- Drbal, K., Křížek, M.: Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1999.
- Stevens, J., Taylor, A., Deinzer, M.: Quantitative Analysis of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids in Hops and Beer by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A **832**, 1999, 97–107.
- Castro, R., Moyano, E., Galceran, T.: Ion-pair Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Quaternary Ammonium Herbicides. J. Chromatogr. A **830**, 1999, 145–154.
- Castro, R., Moyano, E., Galceran, T.: Determination of Quaternary Ammonium Pesticides by Liquid Chromatography-electrospray Tandem Mass Spectrometry. **914**, 2001, 111–121.
- Dalluge, J., Nelson, B., Thomas, J.: Selection of Column and Gradient Elution System for the Separation of Catechins in Green Tea Using High-performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. A **793**, 1998, 265–274.
- Whittle, N., Eldridge, H.: Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. J. Inst. Brew. **105**, 1999, 89–99.
- Harvey, D.: Modern Analytical Chemistry. MacGraw-Hill Companies, 2001.
- Volka, K., a kol.: Analytická chemie II. VŠCHT, Praha, 2000.
- Stevens, J., Taylor, A., Nickerson, B., Ivancic, M., Henning, J., Haunold, A., Deinzer, M.: Prenylflavonoid Variation in *Humulus lupulus*: Distribution and Taxonomic Significance of Xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. Phytochemistry **53**, 2000, 759–775.
- Gibala, P.: Diplomová práce, VŠCHT, Praha, 2003.

Zpracováno na základě přednášky
na 21. Pivovarsko-sladařských dnech,
6.–7. 10. 2005, Ústí nad Labem
Do redakce došlo 8. 2. 2006