

## Analýza polyfenolů v pivovarských surovinách s využitím PSE (Pressurized solvent extraction) – tlakové extrakce rozpouštědlem a metodou HPLC s CoulArray detekcí

### *Analysis Of Polyphenols In Brewing Raw Materials By PSE (Pressurized Solvent Extraction) And By HPLC Method With CoulArray Detection*

MARIE JURKOVÁ<sup>1</sup>, VLADIMÍR KELLNER<sup>1</sup>, JIŘÍ ČULÍK<sup>1</sup>, TOMÁŠ HORÁK<sup>1</sup>, PAVEL ČEJKA<sup>1</sup>, PAVEL KARÁSEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting Plc., Brewing Institute Prague*

<sup>2</sup>Ústav analytické chemie AV ČR Brno, v. v. i., Veverčí 97, 602 00 Brno / *Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v. v. i.*

e-mail: jurkova@beerresearch.cz

**Jurková, M. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Karásek, P.: Analýza polyfenolů v pivovarských surovinách s využitím PSE (Pressurized Solvent Extraction) – tlakové extrakce rozpouštědlem a metodou HPLC s CoulArray detekcí. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 1, s. 18–23.**

Moderní extrakční technika PSE (Pressurized Solvent Extraction) – tlaková extrakce rozpouštědlem ve spojení s HPLC s vysoce citlivým elektrochemickým detektorem CoulArray – představuje pokrok v analýze polyfenolů v pivovarských surovinách. Simulaci extrakčního procesu chmelovaru nebo rmutování by bylo metodou PSE možné realizovat pomocí „markerů“, které se oběma postupy extrahují prakticky stejně. Metoda PSE pro zhodnocení totálního obsahu jednotlivých polyfenolů ve sladu i chmelu je vhodnější. Variabilita extrakčních podmínek umožňuje snadno najít podmínky pro maximální výtěžnost. Pro většinu sledovaných polyfenolů při tlaku 150 bar byla nejúčinnější teplota 140 °C, avšak pro nejvíce zastoupenou kyselinu ferulovou (ve sladu i v nejvyšších koncentracích) se jeví jako vhodnější teplota 40 °C ve sladu i chmelu.

**Jurková, M. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Karásek, P.: Analysis of polyphenols in brewing raw materials by PSE (Pressurized Solvent Extraction) – and by HPLC method with CoulArray detection. Kvasny Prum. 56, 2010, No.1, p. 18–23.**

The modern extraction technique PSE (Pressurized Solvent Extraction) – pressure solvent extraction coupled with HPLC with high sensitive electrochemical detector CoulArray – presents the progress in the analytics of polyphenols in brewer's raw materials. It could be simulated extraction processes malting and hop boiling by method PSE by force of "markers" which are extracted in both extraction procedures practically equally. The PSE method is better to estimation of entire content of polyphenols in malt and hops. The variability of extraction process enables to find the optimal extraction conditions for maximal yields. The most efficient temperature for the majority of the polyphenols studied by pressure 150 bar was 140 °C, but for the most frequently found ferulic acid (in malt also in the highest concentrations) more suitable temperature is 40 °C in malt and hops.

**Jurková, M. – Kellner, V. – Čulík, J. – Horák, T. – Čejka, P. – Karásek, P.: Mittels einer Ausnutzung von PSE (Pressurized Solvent Extraction = Druck-flüssig-Extraktion) mit dem Lösungsmittel und Methode HPLC mit der CoulArray Detektion. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 1, S. 18–23.**

Moderne Methode PSE (Pressurized Solvent Extraction), eine Druck – flüssig-Extraktion mit einem Lösungsmittel in Verbindung HPLC mit hochempfindlichen elektrochemischen Detektor CoulArray stellt ein Fortschritt in Analyse von Polyphenolen in den Braurohstoffen dar. Durch die Methode PSE wäre es möglich, eine Simulation eines Extraktionsverfahrens des Hopfenkochens oder Maischens mittels „Markers“ zu realisieren, weil die beiden Verfahren praktisch auf die gleiche Weise extrahieren. Die Methode der Bestimmung des Totalgehalts von einzelnen Polyphenolen im Malz und in Hopfen ist jedoch zweckmäßiger. Die Variabilität von den Extraktionsbedingungen ermöglicht die Bedingungen für die maximale Ausbeute leicht zu finden. Für die meistens verfolgten Polyphenole unter dem Druck von den 150 Baren wurde als die effektivste Temperatur 140 °C, jedoch für die meist vertretene Ferulasäure (im Malz auch in den höchsten Konzentrationen) kommt als eine geeignetere Temperatur 40 °C im Malz und Hopfen vor.

**Klíčová slova:** polyfenoly, tlaková extrakce (PSE), CoulArray detektor, HPLC, slad, chmel

**Keywords:** polyphenols, pressurized solvent extraction (PSE), CoulArray detector, HPLC, malt, hops

## 1 ÚVOD

Pivovarské suroviny chmel a slad jsou cenným zdrojem polyfenolických sloučenin, jejichž antioxidační vlastnosti jsou již řadou studií prokázány. Polyfenoly v pivu zpomalují jeho stárnutí, při jeho konzumaci polyfenoly působí příznivě na lidský organismus zapojováním do antioxidačních procesů.

Z pivovarského hlediska je důležitá znalost složení a zastoupení jednotlivých polyfenolů ve vstupních surovinách a jejich skutečný podíl, který do piva přejde.

Z důvodu získání výsledků co nejvěrněji popisujících skutečný příspěvek polyfenolů ze sladu do piva je extrakční proces totožný s přípravou kongresní sladiny, v níž se polyfenoly dále analyzují. Polyfenoly pocházející z chmele jsou z téhož důvodu analyzovány ve vodním výluhu po chmelovaru.

Tyto extrakční procesy jsou však časově náročné a neposkytují skutečný obraz zastoupení jednotlivých polyfenolických složek v matici sladu nebo chmele. Přímé extrakční metody polyfenolů do organických rozpouštědel jsou také experimentálně náročné, ale naopak neposkytují informaci, jaké bude jejich složení v pivu v závislosti na technologickém procesu.

Extrakční metoda PSE může využívat k extrakci vodu nebo vodu modifikovanou organickým rozpouštědlem. Kombinací extrakčních teplot a tlaků lze ovlivnit extrakční stupeň, od částečného vyextraho-

## 1 INTRODUCTION

The brewer's raw materials hops and malt are rich sources of polyphenolic compounds which antioxidative qualities were validated in many papers and experiments. Polyphenols inhibit beer ageing. Polyphenols of beer favourably influence human health and they are responsible for antioxidative processes in human body.

The composition of polyphenols in malt and hops and their content in beer is very important from brewing point of view. We can evaluate the real contribution of polyphenols from malt and hops by extraction methods realised by mashing (unhopped wort) and by extraction of hops to hot water. These extraction processes for analytical purposes are very time consuming and they do not give right information about real concentrations of polyphenols in raw materials.

The new extraction technique the PSE can use water or water slightly modified by organic solvent to extraction with combination of pressures and temperatures. This extraction process is very easy and quick, less expensive and more ecology due to little consumption of organic solvents. The choice of extraction conditions can influence an effectiveness of this process. There is a question about a simulation of real brewing extraction of malt and hops by PSE technique. In contrast to the classical extractions the PSE conditions for totally extraction can obtain results which can be used also in other areas of processing of these raw materials.

vání matrice, až po její úplné vyextrahování. Extrakce je velmi rychlá, s malými nároky na organická rozpouštědla, extrakce jsou cenově méně nákladné a odpadá problém s likvidací organických rozpouštědel.

Nabízí se proto otázka, zda lze díky variabilitě systému najít simulaci extrakcí varního procesu nebo rmutování. Naopak informace o složení suroviny při jejím totálním vyextrahování mohou být cennou informací i pro jiné oblasti zpracování chmele a sladu.

Extrakční technika PSE není dosud příliš rozšířena a používá se zejména v oblasti analýzy kontaminantů v rostlinných materiálech [1] a potravinách [2,3]. Užití vysokých teplot a tlaků vede k vyšším výtěžnostem, než poskytují klasické extrakční techniky [4]. Úspěšné použití PSE techniky bylo realizováno v oblasti extrakcí isoflavonoidů [5].

V této studii byly extrahovány polyfenoly ze sladu a chmele při tlaku 150 bar a byla sledována extrakční účinnost v závislosti na extrakční teplotě v rozsahu 40–140 °C. Polyfenoly byly analyzovány metodou HPLC s CoulArray detekcí [6]. Získané výsledky byly porovnávány s hodnotami koncentrací polyfenolů stanovených ve chmelovém extraktu po chmelovaru a ve sladovém extraktu po rmutování.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Materiál a metody

#### 2.1.1 Chemikálie

Kyselina gallová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 2,6-dihydroxybenzoová, kyselina p-hydroxybenzoová, eskulin, kyselina 4-hydroxyfenyloctová, kyselina vanilová, kyselina chlorogenová, (+)-katechin, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyseliny syringová, vanilin, umbelliferon, (-)-epikatechin, skopoletin, ferulová kyselina, sinapová kyselina, 4-hydroxykumarin, rutin, naringin, myricetin, kvercetin, apigenin, biochanin A, daidzein, genistein, formononetin (Fluka).

Acetonitril pro gradient (Merck), voda pro HPLC (Millipore, USA), octan amonný, kyselina mravenčí, methanol pro gradient (Merck).

#### 2.1.2 Extrahovaný materiál

Extrakční pokusy byly prováděny se sladem Prestige a chmelem Žateckým poloraným červeňákem.

#### 2.1.3 Příprava vzorků

Pro extrakce polyfenolů byl použit OnePSE automatizovaný extraktor (Applied Separations Inc., USA). Extrakce probíhala za tlaku 150 bar při teplotách 40, 60, 80, 100, 120 a 140 °C v ocelových extrakčních patronách. 1,5 g (vážení s přesností 0,1 mg) rozemletého vzorku bylo smícháno s inertním materiálem balotinou a naplněno do extrakční cely. K extrakci byla použita voda pro HPLC (Millipore, USA), extrakční cyklus proběhl třikrát. Extrakční cely byla mezi cykly a na konci extrakce vymyta dusíkem. Získané extrakty byly jímány do 50 ml odměrek a doplněny po rysku mobilní fázi A pro HPLC analýzu. Přehled extrakčních podmínek podává *tab. 1*.

Vedle tlakových extrakcí byly provedeny srovnávací extrakce jak pro slad, tak pro chmel.

**Klasická extrakce pro slad:** 50 g sladu bylo extrahováno do vody fouslou sladinou. Sladina byla vyvážena do 450 g vodou.

**Klasická extrakce chmele:** 1,25 g namletého chmele bylo vařeno pod zpětným chladičem 30 minut. Horký extrakt byl filtrován přes skládaný filtr a doplněn do 250 ml vodou.

The extraction technique PSE is not widespread too and is used for analyses of contaminants in plants materials [1] and foods [2, 3]. Using of high temperatures and pressures produce higher recoveries in comparison to classical extraction techniques [4]. The PSE was used successfully in area extraction of isoflavonoids [5].

There were extracted polyphenols of malt and hops by conditions of 150 bar and in the temperature range 40–140 °C in this study and the recoveries of individual polyphenols were studied as a function of temperature. Polyphenols were analysed by HPLC method with CoulArray detection [6]. The obtained results from PSE were compared with results of unhopped wort and extraction of hops to hot water.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Material and methods

#### 2.1.1 Chemicals

Gallic acid, Protocatechuic acid, Gentisic acid, Esculin, p-Hydroxybenzoic acid, 4-Hydroxyphenylacetic acid, (+)-Catechin, Chlorogenic acid, Vanillic acid, Caffeic acid, Syringic acid, (-)-Epicatechin, Vanilin, p-Coumaric acid, Umbelliferone, Scopoletin, Ferrulic acid, Sinapinic acid, Rutin, Naringin, Myricetin, 4-Hydroxycoumarin, Daidzein, Quercetin, Genistein, Apigenin, Formononetin, Biochanin A (Fluka).

Acetonitrile gradient grade (Merck), water HPLC (Millipore, U.S.A.), ammonium acetate, formic acid, methanol gradient grade (Merck).

#### 2.1.2 Extracted raw materials

The extraction experiments were performed with malt Prestige and with Czech hops ŽPC

#### 2.1.3 Sample preparation

The OnePSE automated extractor (Applied Separations Inc., U.S.A.) was used to extractions.

The extraction conditions were: 150 bar and 40, 60, 80, 90, 100, 120 and 140 °C in turn in steel extraction cartridges. 1.5 g (weighted with accuracy to 0.1 mg) of milled sample was mixed with inert ballotina and filled into extraction cartridge. The HPLC water (Millipore) was used to extraction, every extraction cycle repeated three times. The extraction cartridge was washed by nitrogen between two cycles. The obtained extracts were collected into 50 ml beakers and filled by mobile phase A. All extraction conditions of PSE gives *Tab. 1*.

There were performed comparative classical extractions:

Extraction of malt: 50 g of malt were extracted by water as a wort completed by water to weight 450 g.

Extraction of hops: 1.25 g of milled hops was boiled in 200 ml water (Millipore) under reverse cooler for 30 minutes. The hot extract was filtered through folded filter, cooled and filled to 250 ml by water.

Both hops and malt extracts were diluted by mobile phase A in rate 1:1.

#### 2.1.4 HPLC chromatography

Apparatus for HPLC consists of the solvent delivery module model 582 (ESA, U.S.A.), autosampler model 542 (ESA, U.S.A) with 100 µl sample loop and CoulArray detector model 5600A (ESA, U.S.A) with eight electrochemical cells in series consisting of porous graphite electrodes and palladium reference electrode and platinum counter electrode.

Tab. 1 PSE podmínky pro slad a chmel / PSE conditions of malt and hops

Počet cyklů / Number of cycles	3
Trvání cyklu / Time of cycle	10 min
Teplota / Temperature	40, 60, 80, 100, 120, 140 °C postupně / in turn
Mod / Mode	A
Tlak / Pressure	150 bar
Hmotnost vzorku / Weight of sample	1.5 g
Inertní materiál / Inert material	Ballotina 7 (570–700 µm)
Rozpouštědlo / Solvent	Ultračistá voda, odplyněná He / Ultraclean water degassing by He
Objem extrakční patrony / Volume of extraction cartridge	11 ml
Vymývání rozpouštědlem / Solvent washing	30 s, 9 ml/min
Vymytí dusíkem / Nitrogen gas washing	1 minuta mezi cykly a 3 minuty na konci / 1 minute between cycles and 3 minutes in the end

Sladový i chmelový extrakt byly vždy zředěny mobilní fází A v poměru 1:1.

#### 2.1.4 HPLC chromatografie

Polyfenolické vzorky byly analyzovány metodou HPLC s elektrochemickou detekcí.

Systém se skládal ze 2 čerpadel model 582, dávkovače model 542 a CoulArray detektorem model 5600 A (ESA Inc., USA). Elektrochemický detektor CoulArray je vybaven osmi elektrochemickými celami z porézního grafitu, seřazenými za sebou, paladiovou referenční elektrodou a platinovou pracovní elektrodou. Jedná se o detektor destruktivní, neboť analyt prochází řadou elektrod s postupně vzrůstajícím vloženým potenciálem a při potenciálu charakterizujícím obtížnou/snadnou oxidace v systému je kompletně zoxidován.

Analyty byly separovány na koloně Synergi-Hydro RP 3,0x150 mm, zrnění 4µm (Phenomenex, USA).

**Separční podmínky:** Vzhledem k velké odlišnosti polarity extrahovaných polyfenolů byly vzorky extraktů postupně analyzovány dvěma HPLC metodami, s odlišným elučním binárním gradientem acetonitrilu s průtokem 0,8 ml/min a teplotě kolony 35 °C. Mobilní fáze byla tvořena 0,005 M octanem amonným (složka A) a acetonitrilem (složka B), pH bylo adjustováno na hodnotu 3,0 kyselinou mravenčí.

Pro polárnější volné polyfenolické kyseliny, katechiny, epikatechiny a kumariny (*obr. 1*) byly použity mobilní fáze A (5 % ACN) a fáze B (50 % ACN) s gradientem: 0–10 min. 0 % B, 10–18 min. 0–8 % B, 18–40 min. 8–10 % B, 40–77 min. 10–21 % B, 77–90 min. 21–52 % B. Po analýze byla kolona po dobu 10 minut promývána 100% fází B a po 15 min ekvilibrace kolony byl nastříknut další vzorek (chromatografická metoda I).

Pro méně polární flavonoidy a isoflavonoidy (*obr. 2*) byly použity mobilní fáze A (14 % ACN), fáze B (50 % ACN) s gradientem: 0–30 min. 0–57 % B, 30–50 min. 57 % B, 50–70 min. 100 % B, 70–80 min.

Analytes were separated on Synergi – Hydro RP column, 3.0 x 150mm, 4.0 µm particle size (Phenomenex, U.S.A).

**Chromatographic methods:** Two chromatographic methods were generated. Mobile phases consist of buffer (0.005M ammonium acetate) and acetonitrile, pH of all phases was adjusted to 3.0 with formic acid.

- I. Method with using phase A with 5% content of acetonitrile and phase B with content 50% acetonitrile. Gradient: 0–10 min. at 0 % B, 10–18 min. 0–8% B, 18–40 min. 8–10 % B, 40–77 min. 10–21 % B, 77–90 min. 21–52 % B. After stop run analysis in 90 min. the column was washed 10 minutes with 100 % phase B. Equilibrium time was 15 minutes. Using this method made possible to analyse more polar compounds as free polyphenolic acids and catechin, epicatechin and coumarin and its derivatives. Flow was 0.8 ml/min, column temperature was 35 °C (*Fig. 1*).
- II. Method with using phase A with 14.0 % content of acetonitrile and phase B with 50 % content of acetonitrile. Gradient: 0–30 min. 0–57 % B, 30–50 min. at 57 % B, 50–70 min. 57–100 % B, 70–80 min. at 100 % B. After stop run analysis in 80. min. the phase B was maintained on 100 % B two minutes and from 82. to 83. min. changed to 100 % A. Flow was 0.8 ml/min, column temperature was 35 °C.

Equilibrium time was 17 minutes. This method was useful for less polar flavonoids and isoflavonoids (*Fig. 2*).

The eluted analytes from the column went through an array of electrodes with potentials ordering in turn 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 mV. They were oxidized and corresponding currents were measured as peaks on all potentials. The highest response (dominant peak) was used for calibration and determination of each analyte in its retention time.

### 2.1.5 Calibration standard

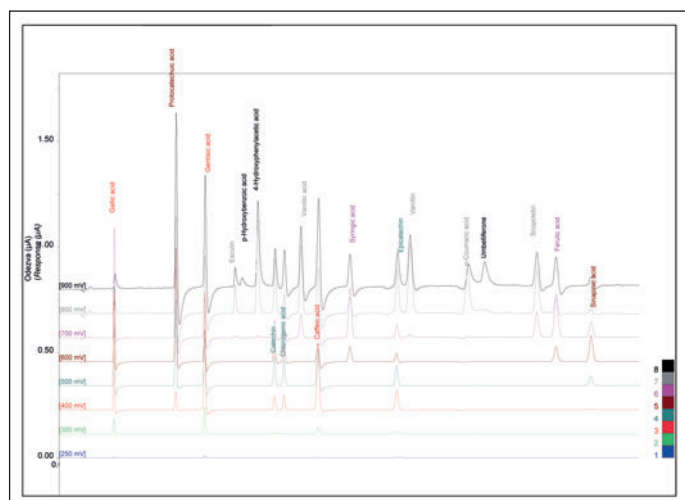
Mixed stock solutions were prepared about 10 mg weighted with accuracy to 0.1 mg of each compound and dissolved in 100 ml methanol. The stock solutions were stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  for a maximum of 3 months. The calibration standard solutions were prepared on four concentration levels (1.0; 0.5; 0.1 and 0.01 mg/l) by diluting stock solution in 100 ml beakers by phase A in both methods.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

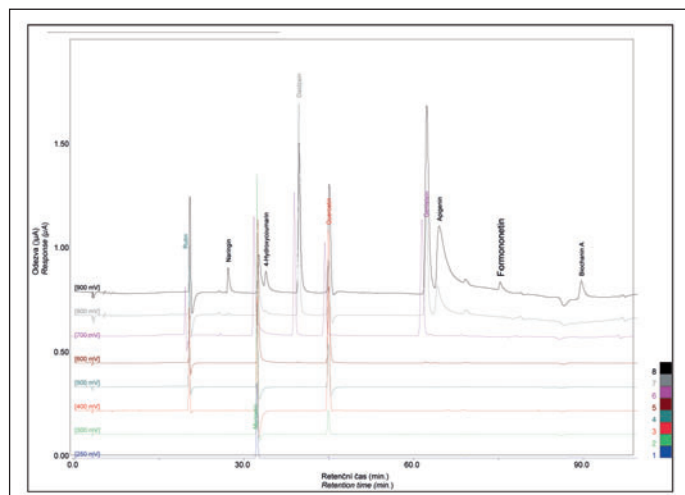
### 3.1 Malt

We found that extraction yields of only some polyphenols of malt by PSE depend on extraction temperatures in all range of applied temperatures by repeated experiments (Fig. 3) while most of other polyphenols depend on extraction temperatures above temperature 120 °C (Fig. 4, 5).

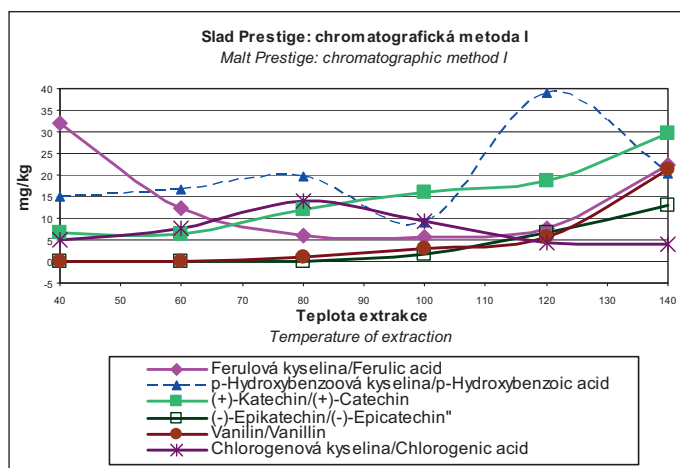
The main marker of malt polyphenols, the ferulic acid, shows the highest content in the group of monitored polyphenols and has the yield maximum by lowest extraction temperature. The p-hydroxybenzoic acid shows the non-standard behaviour with two extraction maxima by 80 °C and 120 °C. The esculin achieved the extraction maxi-



Obr. 1 / Chromatogram standardů (1 mg / l), metoda I / Fig. 1 Chromatogram of standards (1 mg / L), method I



Obr. 2 / Chromatogram standardů (1 mg / l), metoda II / Fig. 2 Chromatogram of standards (1 mg / L), method II



Obr. 3 / Polyfenoly s výtěžností extrakce závislé na teplotě / Fig. 3  
Polyphenols with extraction yields dependent on temperature



100 % B. Po skončení analýzy kolonou protékalo ještě 2 minuty 100 % fáze B, poté následovala ekvilibrace kolony 100 % fází A po dobu 17 min (chromatografická metoda II).

Polyfenoly opouštějící kolonu byly detekovány při průchodu řadou elektrod z porézního grafitu v CoulArray detektoru. Na jednotlivých elektrodách se vzestupně vloženým potenciálem 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 a 900 mV byl měřen odpovídající proud a prošlý náboj vznikající při oxidaci polyfenolů na všech elektrodách a zaznamenán jako eluční zóna chromatogramu. Nejvyšší odezva (dominantní pík) byla použita pro kalibraci a stanovení každého analytu.

### 2.1.5 Kalibrační standard

Byl připraven směsný standard navážením kolem 10 mg s přesností 0,1 mg každé sloučeniny do 100 ml odměrky a rozpuštěním v methanolu. Tento zásobní roztok byl uchováván v mrazničce při  $-4^{\circ}\text{C}$  po dobu max. 3 měsíců. Kalibrační roztoky byly pak připraveny na koncentračních úrovních 1,0; 0,5; 0,1 a 0,01 mg/l ředěním zásobního roztoku do 100 ml odměrek fází A pro oba separační postupy.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Slad

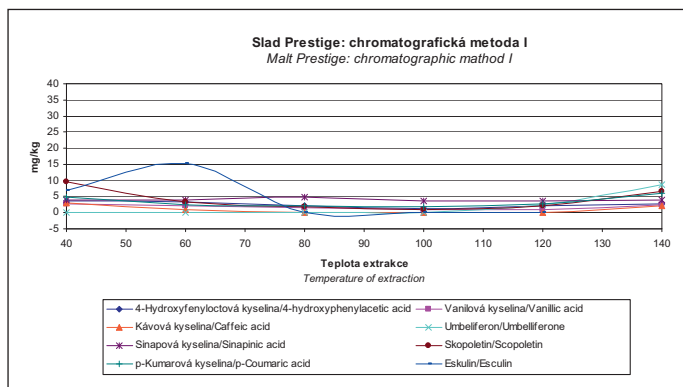
Opakovanými pokusy bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce PSE jen u některých polyfenolů obsažených ve sladu (obr. 3) závisí na extrakční teplotě v celém rozsahu aplikovaných teplot, zatímco u většiny sledovaných polyfenolů se výraznější teplotní závislost extrakce projevuje až od teploty  $120^{\circ}\text{C}$  (obr. 4, 5).

Hlavní marker polyfenolů ve sladu, kyselina ferulová, která vykazuje vždy nejvyšší obsah ve skupině sledovaných polyfenolů, má svoje maximum výtěžnosti paradoxně při nejnižší extrakční teplotě. Nestandardní chování vykazuje též kyselina p-hydroxybenzoová s dvěma extrakčními maximy při  $80^{\circ}\text{C}$  a  $120^{\circ}\text{C}$ . Obr. 4 a 5 demonstrují chování eskulinu, jehož extrakční maximum bylo dosaženo při  $60^{\circ}\text{C}$ , a daidzeinu, jehož extrakční maximum odpovídalo teplotě  $80^{\circ}\text{C}$ . K úplnému vyextrahování sledovaných polyfenolů dochází při  $140^{\circ}\text{C}$  s výše uvedenými výjimkami.

Přehledné výsledky extrakce ze sladu podává tab. 2. Hodnoty zjištěných koncentrací ve sladu při použitých extrakčních teplotách jsou porovnány s hodnotami nalezenými ve sladu při použití extrakci rmutováním. Je zřejmé, že jen u některých polyfenolů (4-hydroxyfenylacetová kyselina, (+) catechin, p-kumarová kyselina, ferulová kyselina a rutin) lze najít teplotní oblast tlakové extrakce, v níž se svými výsledky blíží výsledkům získaným při rmutování. Pro screening kvality sladu pro pivovarské účely z hlediska obsahu polyfenolických sloučenin přecházejících do piva by tento extrakční postup mohl být vhodný, uvedené sloučeniny by mohly být považovány za markery extrakčního procesu. Výsledky ale také naznačují, že skutečný obsah polyfenolických látek ve sladu může být daleko vyšší (např. kvercetin, kyselina chlorogenová a kávová), než kolik jich je zjištěno pomocí rmutovacího procesu.

### 3.2 Chmel

Bylo zjištěno, že extrakční výtěžnost z matrice chmele je na extrakční teplotě při PSE metodě v rozsahu teplot  $40\text{--}100^{\circ}\text{C}$  nezávislá. Hodnoty koncentrací jednotlivých polyfenolů ve chmelové matrici nalezené pomocí PSE při různých teplotách jsou uvedeny na obr. 6, 7



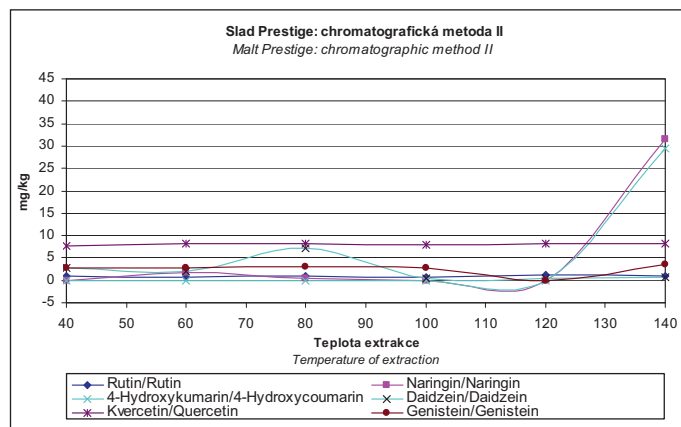
Obr. 4 / Polyfenoly bez závislosti výtěžnosti extrakce na teplotě / Fig. 4 Polyphenols without temperature dependence of extraction yields

mum by  $60^{\circ}\text{C}$  and the daidzein achieved the extraction maximum by  $80^{\circ}\text{C}$  (Fig. 4, 5). The totally extraction of polyphenols occurred by  $140^{\circ}\text{C}$  with mentioned exceptions.

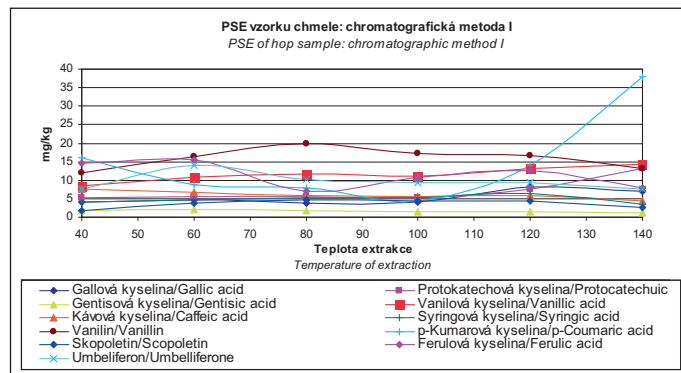
The handlist of extraction yields gives the table 2. The obtained concentrations by PSE at used temperatures are compared with concentrations found by mashing extraction. It is perceptible, that for only some polyphenols (4-hydroxyphenylacetic acid, (+)-catechin, p-coumaric acid, ferulic acid and rutin) we can find the temperature area of PSE, where the extraction results are similar to results of mashing extraction. The PSE could be used to malt quality screening in light of polyphenols content and these polyphenols could be used as markers of extraction process. The results of PSE are indicative of higher real content of polyphenols in malt (for example quercetin, chlorogenic acid and caffeic acid) than is found by mashing extraction.

### 3.2 Hops

It was found, that the extraction yields of polyphenols are independent on the extraction temperatures in the range  $40\text{--}100^{\circ}\text{C}$ . The concentrations of polyphenols in hops found by PSE by different temperatures can be seen in Fig. 6, 7 and 8. The comparison of these values with those found by extraction of hops by hot water is stated in tab. 3. We discovered the similar concentrations for p-hydroxybenzoic acid, (+)-catechin, chlorogenic acid, (-)-epicatechin by both extraction methods, but higher yields were obtained by hot water extraction. The yield of ferulic acid is higher by PSE again but the difference from hot extraction is negligible. These polyphenols mentioned above could be considered as quality markers of hops with regard to polyphenols. Tab. 3 gives the information about other polyphenolic compounds found in hops. It is obvious, that it is possible to extract other studied polyphenols by the PSE method in contrast to the extraction into hot water. It was not possible to establish statistically significant correlation between results found by PSE and hot water extraction. For example concentrations of myricetin and quercetin in hops determined by hot water extraction were 408 and



Obr. 5 / Polyfenoly bez závislosti výtěžnosti extrakce na teplotě / Fig. 5 Polyphenols without temperature dependence of extraction yields



Obr. 6 / Polyfenoly chmele z PSE nalezené v nižších koncentracích s použitím chromatografické metody I / Fig. 6 Hop polyphenols from PSE found in lower concentrations by using chromatographic method I

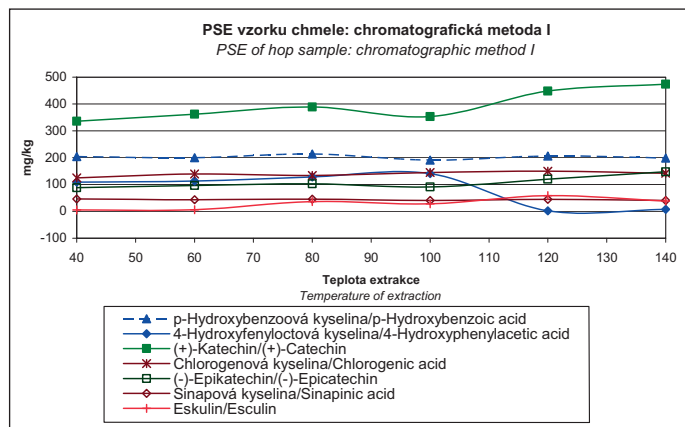
Tab. 2 Porovnání výsledků PSE extrakce a extrakce rmutováním u sladu Prestige / Comparison of results from PSE and wort by malt Prestige

Sloučeniny / Compounds	Teplota (°C) / Temperature (°C)						
	40	60	80	100	120	140	Sladina/Wort
	mg/kg ve sladu / mg/kg of malt						
Gallová kyselina / Gallic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Protocatechová kyselina / Protocatechuic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.67
Gentisová kyselina / Gentisic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.97
Eskulin / Esculin	ND	6.86	15.33	ND	ND	ND	0.44
p-Hydroxybenzoová kyselina / p-Hydroxybenzoic acid	15.15	16.73	19.77	9.02	39.08	20.48	0.24
4-Hydroxyfenyloctová kyselina / 4-Hydroxyphenylacetic acid	3.54	3.33	2.14	1.12	2.11	2.79	3.29
(+)-Katechin / (+)-Catechin	6.67	6.28	12.16	15.94	18.65	29.54	5.35
Chlorogenová kyselina / Chlorogenic acid	5.08	7.67	14.1	9.24	4.34	4	1.34
Vanilová kyselina / Vanillic acid	2.88	2.19	1.61	0.99	0.93	2.32	5.54
Kávoová kyselina / Caffeic acid	2.98	0.99	ND	ND	ND	2.23	0.61
Syringová kyselina / Syringic acid	ND	ND	1.28	0.57	0	1.84	3.13
(-)-Epikatechin / (-)-Epicatechin	ND	ND	ND	1.58	6.77	13.17	ND
Vanilin / Vanillin	ND	ND	1.04	2.84	5.71	21.45	1.34
p-Kumarová kyselina / p-Coumaric acid	4.83	2.59	2.06	1.95	2.74	6.08	7.1
Umbeliferon / Umbelliferone	ND	ND	ND	ND	2.33	8.71	1.38
Skopoletin / Scopoletin	9.53	3.21	1.73	0.99	2.25	6.55	1.1
Ferulová kyselina / Ferulic acid	31.95	12.21	6.09	5.71	7.66	22.49	42.3
Sinapová kyselina / Sinapinic acid	3.99	3.99	4.76	3.72	3.57	3.91	0.3
Rutin / Rutin	0.88	0.73	0.88	0.59	1.28	0.84	0.52
Naringin / Naringin	0	1.79	0.54	ND	ND	31.62	ND
Myricetin / Myricetin	ND	ND	ND	3.86	18.26	17.24	ND
4-Hydroxykumarin / 4-Hydroxycoumarin	ND	ND	ND	ND	ND	0.24	0.29
Daidzein / Daidzein	2.9	2.04	7.12	0.44	0.48	0.71	0.18
Kvercetin / Quercetin	7.82	8.12	8.13	7.93	8.16	8.24	0.2
Genistein / Genistein	2.88	2.89	2.98	2.87	0	3.61	0.14
Apigenin / Apigenin	ND	ND	ND	3.56	5.26	8.65	ND
Formononetin / Formononetin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.95
Biochanin A / Biochanin A	ND	ND	3.25	ND	ND	2.32	0.11

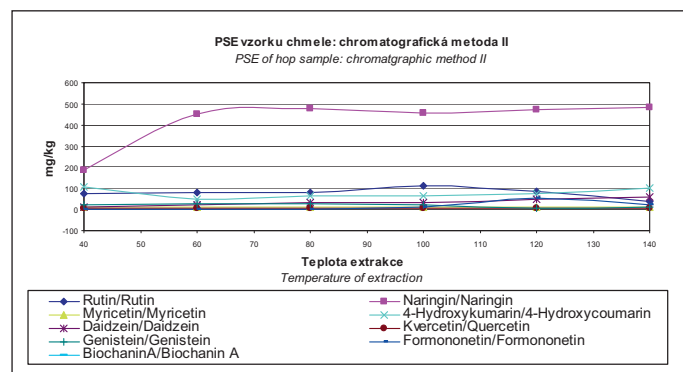
ND – nedetekováno / ND – not detected

a 8. Porovnání s hodnotami zjištěnými extrakčním postupem chmelovaru je v tab. 3. Pro p-hydroxybenzoovou kyselinu, (+)-katechin, chlorogenovou kyselinu, (-)-epikatechin byla nalezena řádová shoda stanovených koncentrací ve chmelu při postupu PSE a postupu vodního výluhu do horké vody (= při chmelovaru), avšak vyšší výtěžnost stanovení byla zjištěna u vzorků z chmelovaru. U ferulové kyseliny je opět výtěžnost při PSE extrakci vyšší, avšak nejedná se o výrazný rozdíl. Tyto uvedené polyfenoly by opět mohly být považovány za markery kvality chmele pro pivovarské účely vzhledem k obsahu polyfenolů. Tabulka 3 dále přehledně podává informaci o ostatních polyfe-

254.8 mg/kg respectively but by PSE method these compounds were determined in concentrations only 12.55 and 4.10 mg/kg respectively in the same sample. Polyphenols vanillic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, umbelliferone and 4-hydroxycoumarin of hop sample were not extracted by hot water. But by using PSE method these compounds were found in concentration of units, tens and hundreds of mg/kg in hops.



Obr. 7 / Polyfenoly chmele z PSE nalezené ve vyšších koncentracích s použitím chromatografické metody I / Fig. 7 Hop polyphenols from PSE found in higher concentrations by using chromatographic method I



Obr. 8 / Méně polární polyfenoly získané PSE extrakcí analyzované chromatografickou metodou II / Fig. 8 Less polar hop polyphenols from PSE analysed by chromatographic method II

Tab. 3 Porovnání výsledků PSE extrakce a extrakce horkou vodou u vzorku chmele / Comparison of results from PSE and hot water of hops sample

Sloučeniny / Compounds	Teplota (°C) / Temperature (°C)						
	40	60	80	100	120	140	vodný extrakt (výluh) water extract
	mg/kg ve chmelu / mg/kg of hops						
Gallová kyselina / Gallic acid	4.04	4.63	3.76	4.20	8.20	7.04	9.68
Protokatechová kyselina / Protocatechuic acid	5.26	5.59	5.65	5.32	7.57	4.04	11.16
Gentisová kyselina / Gentisic acid	1.69	2.03	1.70	1.45	1.53	1.31	0.00
Eskulin / Esculin	5.19	6.26	36.48	28.44	58.33	38.56	38.72
p-hydroxybenzoová kyselina / p-Hydroxybenzoic acid	203.91	199.88	213.88	190.87	205.90	198.48	261.60
4-hydroxyfenyloctová kyselina / 4-Hydroxyphenylacetic acid	108.98	113.41	128.12	140.7	2.03	7.78	54.80
(+)-Katechin / (+)-Catechin	336.02	361.88	389.12	352.96	448.08	473.50	412.00
Chlorogenová kyselina / Chlorogenic acid	124.69	139.33	133.49	144.61	149.99	141.91	155.20
Vanilová kyselina / Vanillic acid	8.57	10.79	11.66	10.97	13.08	14.24	0.00
Kávoová kyselina / Caffeic acid	7.57	6.68	5.92	5.48	5.85	4.26	0.00
Syringová kyselina / Syringic acid	3.97	4.65	5.39	5.37	6.33	3.54	9.64
(-)- Epikatechin / (-)-Epicatechin	88.47	96.27	10.91	91.08	119.78	147.81	107.20
Vanilin / Vanillin	12.04	16.45	19.92	17.20	16.78	13.08	107.60
p-Kumarová kyselina / p-Coumaric acid	16.07	8.83	7.99	4.25	14.07	38.07	0.00
Umbeliferon / Umbelliferone	7.50	14.01	10.31	9.33	9.34	7.69	0.00
Skopoletin / Scopoletin	1.87	3.70	4.69	4.50	4.24	2.55	29.08
Ferulová kyselina / Ferulic acid	14.47	15.49	7.04	10.79	12.68	7.79	13.16
Sinapová kyselina / Sinapinic acid	45.98	43.52	45.74	40.84	44.52	40.89	25.20
Rutin / Rutin	74.25	77.66	80.19	109.86	84.95	38.61	42.80
Naringin / Naringin	187.87	449.47	476.45	455.89	472.47	480.77	828.00
Myricetin / Myricetin	12.55	12.85	12.92	12.55	12.53	12.55	408.00
4-Hydroxykumarin / 4-Hydroxycoumarin	109.27	49.58	62.26	65.21	74.59	99.61	ND
Daidzein / Daidzein	11.38	21.05	32.50	33.90	48.93	57.74	0.00
Kvercetin / Quercetin	4.10	5.66	5.26	3.46	4.22	5.31	254.80
Genistein / Genistein	24.21	29.52	26.70	22.20	4.24	9.29	17.28
Apigenin / Apigenin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Formononetin / Formononetin	ND	3.28	ND	9.06	54.56	22.01	ND
Biochanin A / Biochanin A	9.27	5.75	ND	ND	ND	ND	28.00

ND – nedetekováno / ND – not detected

nolických sloučeninách nalezených ve chmelu. Je zřejmé, že metodou PSE lze vyextrahovat všechny ostatní sledované polyfenolické sloučeniny z chmele na rozdíl od extrakce do horké vody. Nelze však najít jednoznačný vztah mezi množstvími nalezenými PSE extrakcí a extrakcí chmelovarem. Například myricetin a kvercetin byly stanoveny postupem chmelovaru v koncentracích 408 resp. 254,8 mg/kg ve chmelu, ale extrakční metodou PSE byly tyto látky nalezeny pouze v koncentracích 12,55 resp. 4,10 mg/kg chmele. Polyfenoly kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, umbeliferon a 4-hydroxykumarin u daného chmele nebyly chmelovarem extrahovány, ale metodou PSE byly nalezeny v koncentracích jednotek, desítek i stovek mg/kg ve chmelu.

#### Poděkování

Tento příspěvek byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (Projekt 203/05/2106 a 203/07/0886) a řešen za podpory MŠMT ČR v rámci řešení výzkumného záměru VÚPS, a. s., „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“, identifikační kód MSM6019369701.

#### Literatura / References

- Yusa, V., Pardo, O., Martí, P., Pastor, A.: Application of accelerated solvent extraction followed by gel permeation chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue. Food Adit. Contam. **22**, 2005, 482–489.
- Suchan, P., Pulkrábková, J., Hajšlová, J., Kocourek, V.: Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. Anal. Chim. Acta **520**, 2004 (1-2), 193–200.

#### Acknowledgements

This contribution has been supported by the Czech Grant Foundation (Project No. 203/05/2106 and Project No. 203/07/0886) and the presented results were achieved with the support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic within the solution of the Research Project of the RIBM, Plc, “Research of Malt- ing and Brewing Raw Materials and Technologies” (identification code MSM6019369701).

Translated by Eva Paterson

- Wennrich, L., Popp, P., Koeller, G., Breuste, J.: Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry. J. AOAC Int. **84**, 2001, 1194–1201.
- Ventura, K., Adam, M.: Preparation of sample to analysis – extraction Techniques, Analysis of organic compounds, proceedings of course, 2 THETA Český Těšín, 1999.
- Klejdus, B., Mikelová, R., Petřlová, J., Potěšil, D., Adam, V., Stiborová, M., Hodek, P., Vacek, J., Kizek, R., Kubáň, V.: Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005 (15), 5848–5852.
- Kellner, V., Jurková, M., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P.: Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. Brew. Sci. 2007, Jan/Feb, 32–37.

Recenzovaný článek  
Do redakce došlo: 15. 8. 2009  
Přijato k publikování: 29. 10. 2009