

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra fyzikální chemie**

ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA OBSAHU POLYFENOLŮ A OSTATNÍCH OXIDOVATELNÝCH LÁTEK V PIVU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Radka Straková

Studijní obor:

Materiálová chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Konzultant:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2013

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Radka Straková

Název práce: Elektrochemická analýza obsahu polyfenolů a ostatních oxidovatelných látek v pivu.

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra fyzikální chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Hrbáč

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Cílem této práce bylo navrhnout vhodnou elektrochemickou metodu, kterou by se dala stanovit celková antioxidační kapacita piva, která je u tohoto analytu v podstatě dána obsahem polyfenolů. Na rozdíl od jiných analytů (víno, krevní plasma apod.), u kterých jsou pro stanovení oxidovatelných látek elektrochemické metody standardně využívány, téměř neexistují žádné práce zabývající se rutinním stanovením antioxidantů v pivu za pomoci elektrochemie. Důvodem je skutečnost, že produkty elektrooxidace látek, které jsou součástí piva, se silně adsorbují na povrch pracovní elektrody a tím znemožňují opakovaná měření. Pro analýzy byly použity různé značky českých piv od světlých ležáků, výčepních piv, nepasterizovaných, nealkoholických, ale též i tmavých piv.

Klíčová slova: polyfenolická látka, mikrodialýza, amperometrie, pivo

Počet stran: 71

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Radka Straková

Title: Electrochemical analysis of polyphenols and other oxidisable compounds content in beer.

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Master

Supervisor: doc. RNDr. Jan Hrbáč

The year of presentation: 2013

Abstract: Design of a suitable electrochemical method that could be applied to determine the total antioxidant capacity of beer was the main objective of this work. Determination of antioxidants in beers is not, the main problem of determination of antioxidants in beer using electrochemistry is that some substances contained in the beer are adsorbed onto the surface of the working electrode, and thus prevent the measurement. Light lager beer, draft beer, unpasteurised and non-alcoholic beer, but also dark beers of different manufacturers Czech brands were analyzed.

Keywords: antioxidant, polyphenolic acids, beer, amperometric, microdialysis

Number of pages: 71

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Děkuji doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D., Mgr. Petru Jakubcovi, RNDr. Janě Skopalové Ph.D., za odborné vedení diplomové práce, za cenné rady a připomínky při konečném zpracování, za poskytnutí literatury, a Bc. Danielu Rimanovi za pomoc při experimentech a jejich vyhodnocení.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Složení a charakteristika piva	9
2.2. Fyziologie a toxikologie piva	10
2.3. ROS, antioxidanty a polyfenolové látky.....	13
2.4. Flavonoidy piva	18
2.4.1. Prenylflavonoidy	23
2.5. Iso- α -hořké kyseliny	23
2.6. Antioxidační kapacita a metody stanovení	24
2.7. Metody stanovení ostatních látek obsažených v pivu	29
2.8. Mikrodialýza s amperometrickou detekcí	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1. Použité chemikálie	34
3.2. Příprava roztoků.....	35
Zásobní roztok PBS pufru	35
Zásobní roztoky standardních látek	36
MeOH roztok radikálu DPPH	36
Pracovní vzorky piva pro EPR měření	36
Příprava měřených vzorků pro EPR.....	36
3.3. Použité přístroje a pomůcky.....	37
3.3.1. Elektrody - mikrodialýza s amperometrickou detekcí.....	37
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1. EPR metoda s DPPH radikálem	41
Stanovení vhodných měřících podmínek	41
4.2. Cyklická voltametrie	43
4.3. Průtoková coulometrie - EcaFlow	45
4.4. HPLC s elektrochemickou detekcí	47
4.5. Návrh amperometrické metody kombinované s mikrodialýzou pro stanovení obsahu snadno oxidovatelných látek v pivu	49
Popis systému.....	49
Popis experimentu	50
Regenerace elektrody	50
Hydratace sondy	52
Měření standardů	53
Výběr vhodných podmínek pro měření vzorků piva	54
Výsledky mikrodialýzy s amperometrickou detekcí u deseti	55
zvolených druhů piva	55
4.6. Porovnání mikrodialýzy s amperometrickou detekcí s EPR metody s DPPH radikálem	57
4.7. Porovnání mikrodialýzy s amperometrickou detekcí s HPLC metodou s amperometrickou detekcí a s CV.....	59
5. ZÁVĚR	62
6. SUMMARY	63
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64
8. POUŽITÁ LITERATURA	67

1. ÚVOD

Antioxidanty jsou skupinou látek, které působí proti oxidačnímu stresu tím, že jsou schopny ničit tzv. volné radikály v lidském organismu. Jednou ze základních, velice známou a intenzivně studovanou skupinou těchto látek jsou polyfenolické sloučeniny. Nacházejí se v rostlinách a bývají součástí produktů z nich vyrobených. Lidský organismus není schopen samostatné tvorby těchto látek, a proto je přijímá jako součást potravin, např. v zelenině, ovoci, ale také v červeném, bílém nebo růžovém víně. V neposlední řadě jsou obsaženy také v pivu, kam se dostávají z chmelu, ječmene nebo jiných chmelových produktů během procesu výroby. Další významné zdroje těchto látek pro člověka jsou některé nealkoholické nápoje, jako jsou džusy nebo zelený a černý čaj. Do skupiny polyfenolických sloučenin řadíme fenolické kyseliny a flavonoidy.

Antioxidační kapacita u vína, piva, zeleného nebo černého čaje je dána polyfenolickými látkami, ale v případě džusu se jedná spíše o vitamíny, které plní funkci antioxidantů. Vzhledem k faktu, že studované látky tvoří komplikované směsi, byl zaveden pojem tzv. celková antioxidační kapacita (TAC - total antioxidant capacity), který umožňuje porovnávat jednotlivé druhy vzorků mezi sebou.

Existuje celá řada metod, kterými lze TAC stanovovat. Mezi ty nejzákladnější lze zahrnout FRAP, ORAC nebo TEAC. Existuje i řada elektrochemických metod.

Pivo je složitá matrice, obsahující polyfenolické látky, které inaktivují povrch pracovní elektrody a tím zásadně ztěžují elektrochemické měření. Z tohoto důvodu neexistuje žádná práce, která by se zabývala elektrochemickým stanovením TAC u piva.

Cílem této práce bylo:

- Navrhnout metodu pro stanovení celkového obsahu polyfenolických látek, obsažených v pivu, pomocí mikrodialýzy s amperometrickou detekcí, využívající povrchu uhlíkového

mikrovlákna jako pracovní elektrody, a vyřešit problém pasivace uvedené elektrody způsobený adsorpcí produktů oxidace piva.

- Srovnat navrženou metodu s jinými elektrochemickými metodami.
- Stanovit TAC vybraných reálných vzorků piva pomocí této metody. Jako srovnávací metoda byla použita EPR metoda využívající volného radikálu DPPH.
- Pokusit se o identifikaci snadno oxidovatelných (polyfenolických) látek obsažených v pivu, které nejvýrazněji přispívají k elektrochemické odezvě.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Složení a charakteristika piva

Pivo lze nejjednodušeji charakterizovat jako nápoj obsahující alkohol, extrakty a oxid uhličitý. Je vyráběno z ječmenného sladu, surového chmele nebo jiných chmelových produktů. Mezi další důležité prvky patří pivovarnická voda a svrchní nebo spodní kvasící droždí. K výrobě se používají výhradně výše zmíněné ingredience, které jsou během procesu vaření převedeny na zkvasitelný výrobek.

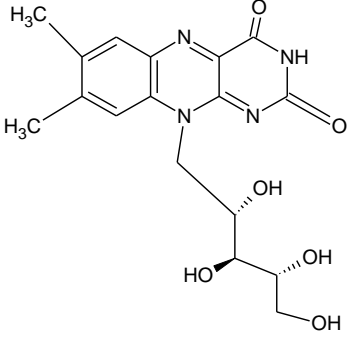
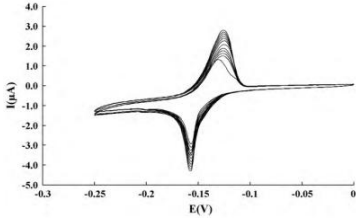
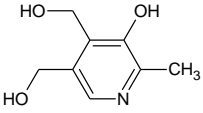
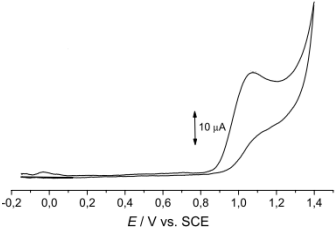
Prvotním krokem celé technologie je sladování. Dochází ke kontrolované přeměně obilí (ječmene) na slad. Technologie zahrnuje tři základní kroky: máčení (snaha zvýšit obsah vody), klíčení (vývoj kořínků a stříšky na klíčku) a posledním krokem je sušení (snížení obsahu vody a pozastavení procesu vegetace rostliny). Výrobní proces zahrnuje tyto výrobní úseky: šrotování, vystírání, rmutování, scezování, chmelovar, chlazení, kvašení, dozrávání a filtrace. Během šrotování jsou odsáty nečistoty a slupky zrn by měly zůstat co nejméně poškozeny (budou sloužit jako filtr v dalších krocích). Následné přímé míchání vody a sladu se nazývá vystírání. Vzniká hustá kaše tzv. vystírka nebo také rmut. Během rmutování enzymatický komplex štěpí složité polysacharidy na cukry, které lze dále kvasit. Následuje scezování, při kterém se oddělí kapalná část rmutu od sladových zbytků, kterým se říká mláto. Chmelovar lze rozdělit na dva kroky: tepelná reakce a odpařování. Povaří se sladina s chmelem a dojde ke tvorbě horké mladiny (hořké látky přejdou do výsledného roztoku). Mladina je poté ochlazená cca na 8°C. Následuje mohutné kvašení mladiny při cca 11°C. Cukry se mění na oxid uhličitý a alkohol. Na křemelinovém filtru se poté odfiltrují kvasinky. Jsou možné nepatrné úpravy např.: sladovnický ječmen, který může být kombinován s pšeničným sladem s cílem dosažení lepší chuti piva. Dále se mohou zapojit nesladové doplňky i jiný materiál obohacený o extrakty. Pravidla a množství přísad těchto látek se liší podle země a geografických oblastí¹.

Jednou ze základních vlastností piva je jeho přirozená schopnost vytvářet pěnu. Oxid uhličitý, který se uvolňuje při stáčení, je zodpovědný za stabilitu pěny. Stabilizační účinky jsou připisovány proteinům, glykoproteinům, tříslovině, b-glukanům, a isohumulonovému komplexu. Destabilizace je vyvolána mastnými kyselinami, glyceridy a ethanolem (více jak 7-8 obj.%).

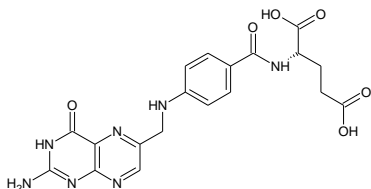
Za barvu piva mohou oxidační reakce při výrobě mladiny, druh sladu nebo chemické změny vyvolané během rmutování a chmelovaru. Snížení pH při fermentaci a filtraci způsobí, že barva piva je světlejší¹.

2.2. Fyziologie a toxikologie piva

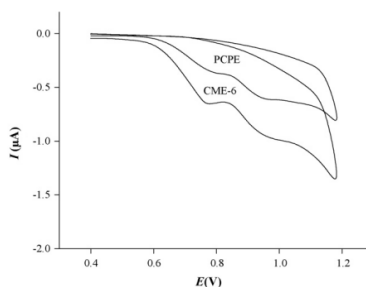
Díky svému vysokému energetickému obsahu je pivo kategorizováno jako jídlo a působí jako stimulant. Tento fakt reflektuje standardní definice¹. Kalorickou hodnotu piva lze vypočítat z koncentrace proteinů, sacharidů a alkoholů. Pivo s obsahem 10 - 14% extraktů původní mladiny má orientační kalorickou hodnotu 1500 - 2100 kJ/l (hrubý odhad se získá vynásobením extraktů původní mladiny v % faktorem 150). Z nutričního hlediska jsou důležité aminokyseliny a vitamíny. Jeden litr piva obsahuje přibližně 40 µg thiaminu, 400 µg riboflavinu, 7500 µg niacinu, 650 µg pyridoxinu, 1500 µg kyseliny pantotenové a 800 µg kyseliny listové. Látky, které byly studovány elektrochemicky, nalezneme v Tab. 1. Pivo má též vysoký obsah vody a koncentraci minerálů (celkem 1000 mg/l, skládá se z: 20 - 30 mg/l sodíku, 500 mg/l draslíku, 30 mg/l vápníků, 300 mg/l fosforu a 100 mg/l hořčíku). Nápoj vykazuje mnoho dalších vlastností a účinků. Oxid uhličitý (4 - 8 g/l) a organické kyseliny (600 mg/l) mají uvolňující, uklidňující a zároveň povzbuzující účinky. Dietní účinek piva je založen v první řadě na nízké koncentraci sodíku. Vzhledem k faktu, že neobsahuje tuky, bude pozitivně podporovat močení. Díky přítomnosti alkoholu, oxidu uhličitého, hořkých kyselin a nízkému pH, nemohou v pivu přežít patogenní a toxické bakterie a tak škodit lidskému organismu¹.

název a vzorec	elektrochemie	citace
<p style="text-align: center;"><u>riboflavin</u></p> 	<p>CV: na CILE (carbon ionic liquid electrode): (carbon paste electrode) sledujeme jeden anodický pík $E_{pa} = -125\text{mV}$ a jeden katodický pík $E_{pk} = -155\text{mV}$, na CV voltamogramu se neobjevily adsorpční před- a postvlny, jednalo se o reverzibilní redukci zahrnující dva elektrony a dva protony</p>  <p>CV: v neutrálním prostředí: quasireverzibilní redukční děj, jeden elektron a jeden proton, jeden katodický a jeden anodický pík $E_{pk} = -0,82\text{V}$ a $E_{pa} = -0,55\text{V}$. Když reakci obrátíme vzniklé produkty následně mohou oxidovat, irreverzibilní děj, jeden elektron, jeden anodický pík $E = -1,3\text{V}$</p>	<p>2</p> <hr/> <p>3</p>
<p style="text-align: center;"><u>pyridoxin</u></p> 	<p>CV: irreverzibilní oxidace na nemodifikované CPE (carbon paste electrode), $E_{pa} = 1,05\text{V}$</p> 	<p>4</p>

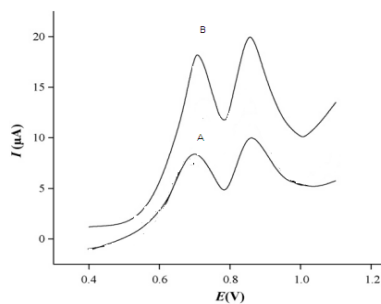
kyselina listová



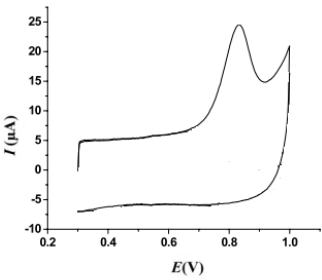
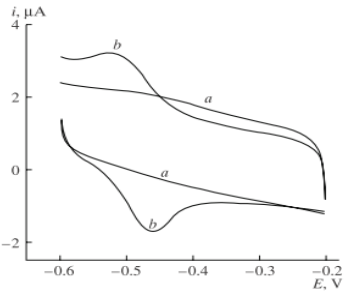
CV: irreversibilní oxidace na PCPE (plain carbon paste electrode), pozorujeme dva anodické píky $E_{pa1}=+0,77V$ a $E_{pa2}=+0,91V$. Dva stejné anodické píky sledujeme na CME-6 (p-tert-butyl-calix[6]arene modified electrode), ale píky mají lepší morfologii a větší výšky. $E_{pa1}=+0,77V$ a $E_{pa2}=+0,91V$.



DPV: na PCPE (křivka A) a CME-6 (křivka B): dva anodické píky $E_{pa}=+0,71V$ a $E_{pa}=+0,86V$



CV na MWNTs/Au (multi-walled carbon nanotube)/ modifikovaná zlatá elektroda: jede anodický pík $E_{pa} = 0,83V$ a závisí na pH a čase
MWNTs/Au má katalytický efekt na oxidaci

		
	<p>CV: na MWCNT (carbon nanotube modified electrode)/GCE (křivky b) nebo jen na GCE (křivky a): jeden anodický pík $E_{pa} = -0,53V$, jeden katodický pík $E_{pk} = -0,45V$</p> 	7

Tab. 1 Elektrochemické vlastnosti vybraných vitamínů obsažených v pivu (všechna elektrochemická měření byla prováděna proti SCE, pokud není uvedeno jinak). Použité voltamogramy byly převzaty z příslušných publikací.

2.3. ROS, antioxidanty a polyfenolové látky

Nejčastějšími indikátory a spouštěči poškození lidské tkáně, buněk nebo buněčných struktur, jsou reakce volných radikálů s biomolekulami. Zmíněné volné radikály jsou součástí větší skupiny zvané ROS (reaktivní formy kyslíku). Jsou vedlejším produktem při biochemických reakcích. Jedním ze zástupců účinných látek, které jsou součástí obrany proti ROS, jsou tzv. antioxidanty. Jsou to přírodní nebo syntetické látky, z hlediska nejobecnější definice. Lze je též popsat pomocí definice dle Halliwella, která je označuje jako látky, které zamezí ROS⁸.

Podle výše zmíněného pohledu, antioxidanty dělíme na dvě základní větve. Na látky, které brání vzniku řetězových radikálových reakcí,

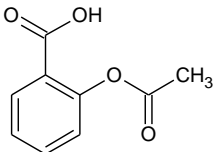
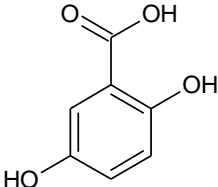
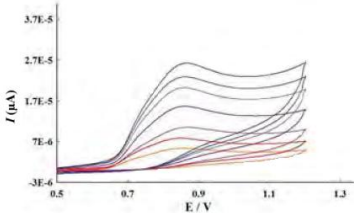
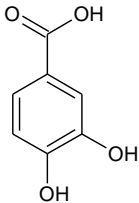
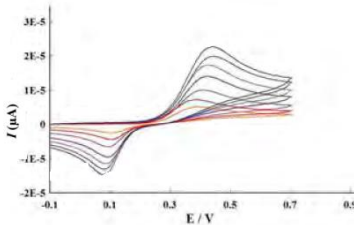
tzv. preventivní antioxidanty. Příkladem mohou být enzymy jako je katalasa peroxidasy nebo EDTA chelátory přechodných kovů nebo proteiny vázané kovy (ferritin). Druhou větví jsou antioxidanty, které přerušují průběh řetězové radikálové reakce a zahrnují velkou skupinu látek, jako jsou fenoly, heterocykly atd. K poškození lidské tkáně může docházet v okamžiku, kdy dojde k vyčerpání antioxidantů. Tento stav nazýváme oxidační stres. Antioxidační kapacita se dá poté označit za parametr pro odolnost tkáně vůči oxidačnímu stresu⁹.

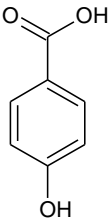
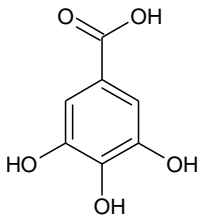
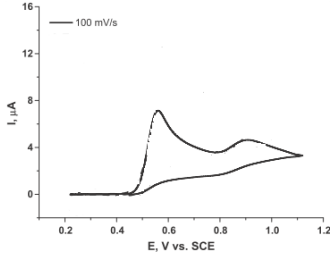
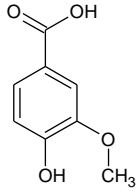
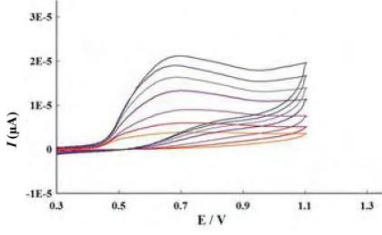
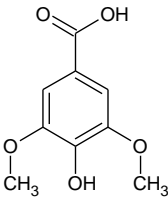
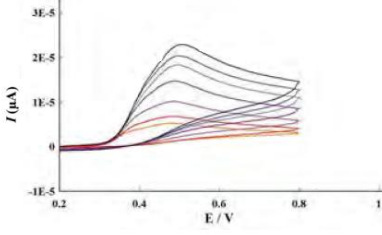
Jedním z významných antioxidačních systémů jsou i polyfenolové sloučeniny, které ze 70 % až 80 % pochází ze sladu a 20 % až 30 % z chmelu. Jako antioxidanty mohou účinkovat třemi způsoby. V první řadě jako lapače volných radikálů, dále pak jsou schopny inhibovat aktivitu lipoxygenáz a v konečném důsledku působí jako chelatační činidla. Polyfenoly reagují s volnými radikály za vzniku fenoxyl radikálů, které jsou relativně stabilní v důsledku delokalizace¹⁰.

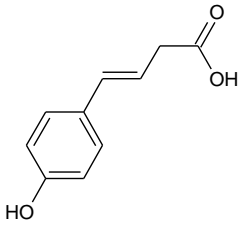
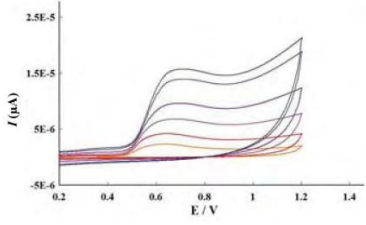
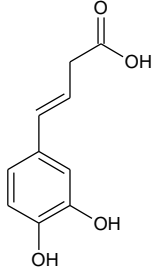
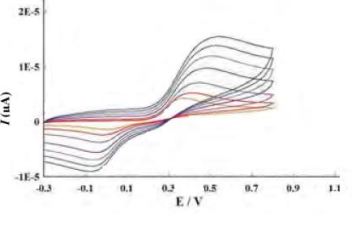
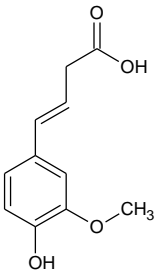
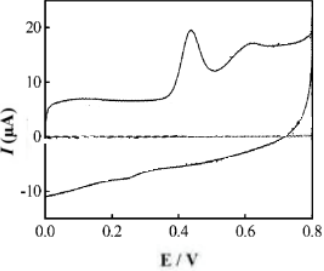
Polyfenoly, součástí přírodních antioxidantů, patří mezi složky, které mají vztah ke stabilitě piva. Podílejí se na chemicko - fyzikální stabilitě, na tvorbě pěny a mají pozitivní účinek proti stárnutí a oxidaci piva. Řada těchto látek má kromě silných antioxidačních účinků i antikarcinogenní, protimikrobiální a protitrombózní vlastnosti. Pivo má schopnost zvyšovat hladinu antioxidantů v těle, a tak zabránit oxidacím volnými radikály, které jsou nežádoucí¹¹.

Přírodní antioxidanty zahrnují i dvě velké skupiny látek, kterými jsou fenolické látky a flavonoidy. Můžeme je většinou nalézt v částech těl rostlin, kořenech nebo plodech. Tyto látky mají vlastnost ovlivnit barvu, chuť nebo vůni výsledného produktu. Rozdělujeme je do dvou větších skupin (Tab. 2) a jednu menší podskupinu. První skupina zahrnující deriváty kyseliny benzoové (kyselina gallová, kyselina protokatechová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina vanilová a kyselina syringová). Druhou skupinu představují deriváty kyseliny skořicové (kyselina p-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová). Monomery flavanu ((+)-katechin, (-)-epikatechin jsou zástupci poslední menší skupiny. Existuje

mnohem více látek, které se dají zahrnout do této velké skupiny přírodních antioxidantů např.: rutin, kyselina salicylová, vanilin nebo kvercetin (Tab. 3)¹².

Polyfenolické látky		
název a vzorec	elektrochemie	citace
<i>deriváty kyseliny benzoové</i>		
<p><u>kyseliny salicylová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický pík $E_{pa} = 0,94V$ (vs. Ag/AgCl)</p>	13
<p><u>kyselina m-hydroxybenzoová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický $E_{pa} 0,83V$ (vs. Ag/AgCl), jedná se o ireversibilní oxidační děj</p> 	13
<p><u>kyselina protokatechová</u></p> 	<p>CV na GCE (ECE mechanismus): jeden anodický a jeden katodický pík, z rozdílu maximálních hodnot katodického a anodického píku vyplývá, že se jedná o ireversibilní děj. $E_{pa} = 0,41V$ a $E_{pk}=0,1$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13

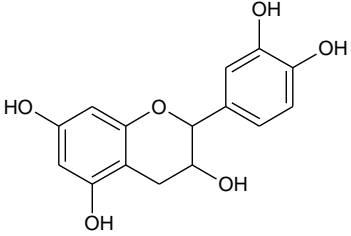
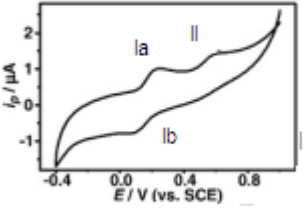
<p><u>kyselina p-hydroxybenzoová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický pík $E_{pa} = 0,87V$ (vs. Ag/AgCl), jedná se irreversibilní oxidační děj</p>	13
<p><u>kyselina gallová</u></p> 	<p>CV na GCE: reverzibilní oxidace ve vodném roztoku fosfátového pufru (PBS pH1,55): dva anodické píky $E_{pa1}=5,0$ a $E_{pa2}=6,6$.</p> 	14
<p><u>kyselina vanilinová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický pík $E_{pa} = 0,73V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13
<p><u>kyselina syringová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický pík $E_{pa} = 0,49V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13

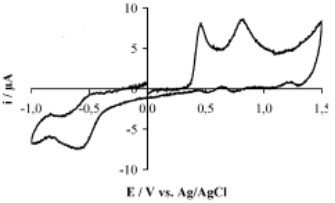
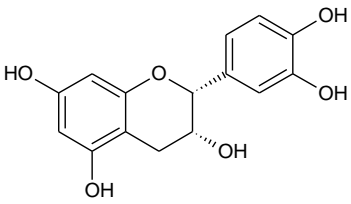
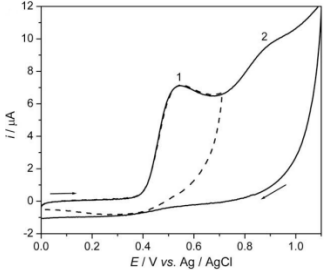
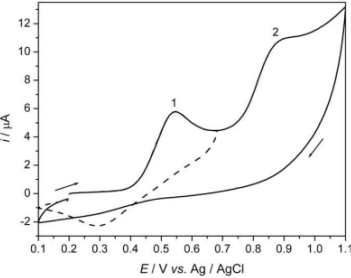
<i>deriváty kyseliny skořicové</i>		
<p><u>kyselina p-kumarová</u></p> 	<p>CV na GCE (EC mechanismus): jeden anodický pík $E_{pa} = 0,67V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13
<p><u>kyselina kávová</u></p> 	<p>CV na GCE (ECE mechanismus): irreverzibilní jeden anodický pík a jeden katodický pík, $E_{pa} = 0,45V$ a $E_{pk}=0,02V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13
<p><u>kyselina ferulová</u></p> 	<p>CV na DDAB/Nafion/CPE (didodecyldimethylammonium bromide/Nafion composite film-modified/carbon paste electrode): jeden velmi dobře definovaný anodický pík $E_p=+0,44V$ v roztoku acetátového pufru (pH 5,5)</p> 	15

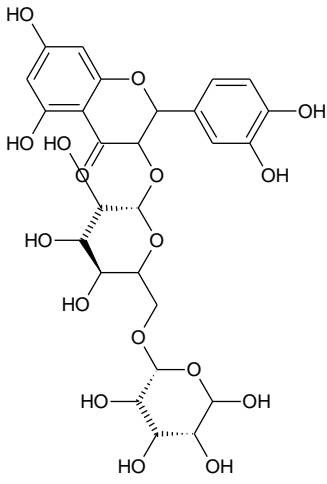
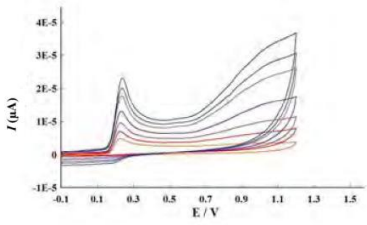
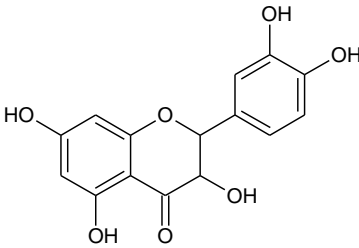
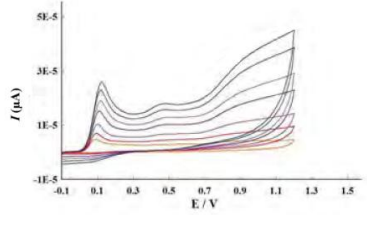
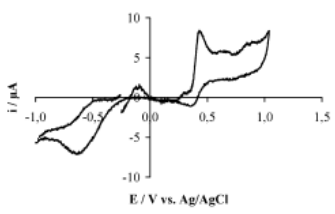
Tab. 2: Elektrochemické vlastnosti vybraných polyfenolických látek (všechna elektrochemická měření jsou prováděna proti SCE, pokud není uvedeno jinak). Použité voltamogramy byly převzaty z příslušných publikací.

2.4. Flavonoidy piva

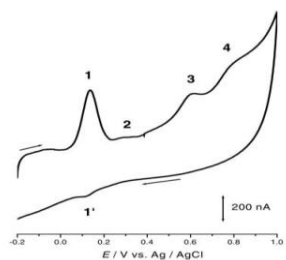
Na základě mnoha studií bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolických látek přítomných v pivu, jsou flavonoidy. Jsou součástí rostlinných fenolů, které ve svých molekulách sdílí dvě benzoová jádra spojená řetězcem tří uhlíků (C₆-C₃-C₆). Dají se dále dělit do čtyř podskupin: flavanoly, chalkony, anthokyanidiny a poslední podskupinu tvoří flavonoly. Hlavními složkami chmele, které spadají mezi flavonoidy (Tab. 3) jsou katechin, epikatechin a polymery proanthokyanidiny, flavonyly rutin, kvercetin a kempferol^{11,16}.

Složky chmele		
název a vzorec	elektrochemie	citace
<p><u>katechin</u></p> 	<p>CV a DPV: na SWTS-CTAB/GCE (single-walled carbon nanotubes - cetylramethylammonium bromide/ modified glassy carbon electrodes): reverzibilní děj, jeden anodický pík $E_{pa}=0,151V$ (viz. křivka Ia) a jeden katodický pík $E_{pk}=0,198V$ (viz. křivka Ib) ($\Delta E_p=47mV$) a jeden irreverzibilní anodický pík $E_{pa}=0,527V$ (viz. křivka II).</p>  <p>SWNTs - umožňuje zvýšit pracovní plochu elektrody a urychlit přenos elektronů</p>	17

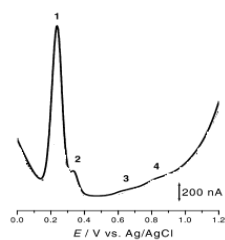
	<p>LC/EC/ESI-MS/MS - irreversibilní oxidace, dva anodické píky $E_{pa1}=0,46V$ a $E_{pa2}=0,81V$(vs. Ag/AgCl), jako elektrochemická detekce v systému byla použita byla použita CV na GCE</p> 	18
<p><u>epikatechin</u></p> 	<p>CV a SWV: oxidace (-)-epicatechinu a (-)-epicatechin gallate na GCE</p> <p>SWV: (-)-epicatechin gallatu, dva anodické píky $E_{pa1}=0,458V$ a $E_{pa2}=0,871V$ (vs. Ag/AgCl), quasireversibilní reakce</p>  <p>CV: (-)-epicatechin, jeden anodický pík $E_{pa}=0,536V$ a jeden katodický pík $E_{pk}=0,0313V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	19

<p style="text-align: center;"><u>rutin</u></p> 	<p>CV na GCE: dva anodické píky $E_{pa1}=0,23V$ a $E_{pa2}= 0,95V$, jeden katodický pík $E_{pk}=0,21V$ (vs. Ag/AgCl)</p> 	13
<p style="text-align: center;"><u>quercetin</u></p> 	<p>CV na GCE: tři anodické píky $E_{pa}=0,10V$, $E_{pa}=0,47V$, $E_{pa}=0,85V$ a jeden katodický pík $E_{pk}=0,08V$ (vs. Ag/AgCl).</p> 	13
	<p>LC/EC/ESI-MS/MS - irreversibilní oxidace, jeden anodický pík $E_{pa}=0,43V$(vs. Ag/AgCl), jako detekční systém byla použita CV na GCE</p> 	18
	<p>CV: irreversibilní oxidace na GCE, čtyři anodické píky $E_{pa1}=0,15V$, $E_{pa2}=0,30V$, $E_{pa3}=0,60V$, $E_{pa4}=0,80V$ a jeden katodický pík $E_{pk}=0,1V$ (vs. Ag/AgCl) Tyto čtyři píky odpovídají OH skupinám na molekule</p>	20

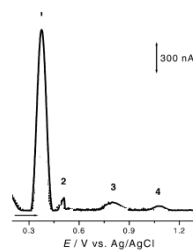
quercetinu



PDV: čtyři srovnatelné anodické píky jako u CV (vs. Ag/AgCl), projev silné adsorpce na povrchu elektrody

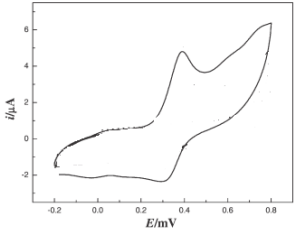
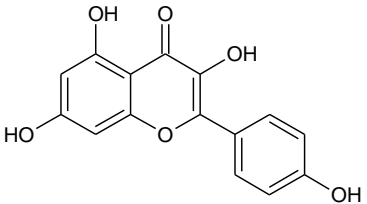
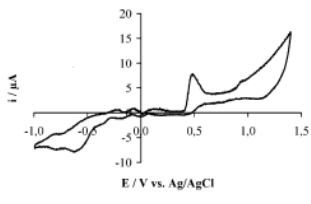
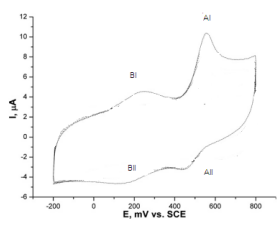


SWV: čtyři srovnatelné anodické píky jako u CV(vs Ag/AgCl), silná adsorpce na povrchu



CV na PFC (plastic carbon electrode) (EC mechanismus) :anodický pík $E_{pa}=0,06V$ a katodický pík $E_{pk}=-0,02V$ (vs. Ag/AgCl) v neutrálním prostředí

21

	<p>GC/Nafion-CNT (glass carbon modificate with carbon nanotubes and Nafion) na GCE: reversibilní oxidace $E_{pa}=0,35V$, dvou-elektronový děj a dvou-protonový děj</p> 	22
<p><u>kaempferol</u></p> 	<p>LC/EC/ESI-MS/MS - irreversibilní oxidace, anodický pík $E_{pa} = 0,48V$(vs. Ag/AgCl), jako EC byla použita CV, na GCE,</p> 	18
	<p>CV: na PGE (pyrolytický grafit), DMSO (Dimethylsulfoxide) jako aprotické rozpouštědlo na stimulaci prostředí: - jeden anodický pík $E_{pa_1}=520m$ (viz. obrázek AI) a jeden katodický pík $E_{pk_1}=450mV$ (viz.Obr. AII). Pokud zvýšíme koncentraci keampferolu, vidíme jeden anodický pík $E_{pa_2}=250 mV$ (viz. Obr. BI) a jeden katodický pík $E_{pk_2}=160mV$ (viz. Obr. BII).</p> 	23

Tab. 3: Elektrochemické vlastnosti vybraných hlavních složek chmele (všechna elektrochemická měření jsou prováděna proti SCE, pokud není uvedeno jinak). Použité voltamogramy byly převzaty z příslušných publikací.

2.4.1. Prenylflavanoidy

Jak již bylo zmíněno, řada polyfenolů se do piva dostává ze sladu, chmele nebo chmelových výrobků. Z chmele se do piva mohou navíc dostat i prenylflavonoidy. Přírodní látky, nacházející se převážně ve chmelu (cca 5 %) Podle taxonomie spadají do chalkonové řady polyfenolů. Tato skupina látek se stala předmětem lékařského výzkumu díky svým bioaktivním účinkům. Mezi nejdůležitější zástupce můžeme zahrnout xanthohumol, desmethylxanthohumol, isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin. Vykazují protirakovinné, protizánětlivé, estrogenní a antimikrobiální účinky. Vstupují do biochemických reakcí, odbourávají xenobiotika a napomáhají k jejich odstraňování z organismu. V závislosti na odrůdě, zralosti chmele, podmínkách při skladování a způsobu zpracování po sklizni se odvíjí obsah a složení prenylflavonoidů. Téměř 80 až 90 % celkových prenylflavonoidů, je tvořeno xanthohumolem. Během výroby piva se xanthohumol izomeruje na isoxanthohumol. Ten představuje nejdůležitější prenylflavonoid v pivu. Dále je ve chmelu zastoupen desmethylxanthohumol v rozmezí 2 - 5 % a xanthohumol C v množství 1 - 2 %. Stejně tak se desmethylxanthohumol izomeruje na 8-prenylnaringenin a 6-prenylnaringenin. V sortimentu českých chmelů se obsah xanthohumol pohybuje v rozmezí 0,25 až 1,1 % hm. a desmethylxanthohumol se vyskytuje v rozmezí 0,05 až 0,25 % hm.^{11,16,24}.

Během výroby piva dochází k velkým ztrátám prenylflavonoidů. Po sledování obsahu isoxanthohumolu v meziproduktech a konečném produktu bylo zjištěno, že největší ztráty nastávají při chlazení mladiny, kvašení a filtraci piva²⁴.

2.5. Iso- α -hořké kyseliny

Existuje mnoho kritérií piva, které mohou ovlivnit jeho kvalitu i jeho oblíbenost. Jednou z nich je hořkost. Typická hořkost piva je způsobena skupinou látek, kterou nazýváme iso- α -hořké kyseliny (mají původ ve chmelu). Tyto látky se v průběhu varného procesu přesouvají do mladiny a následně do hotového piva. Kyseliny jsou zodpovědné za 70 % hořkosti piva. V současnosti se ve výrobě používají průmyslově upravené výrobky,

nebo látky obsahující chemicky modifikované analogy iso- α -hořkých kyselin. Důvod tohoto použití spočívá v technologických a ekonomických aspektech, ale také v chemicko-fyzikálních vlastnostech látek. Prekurzorem těchto kyselin jsou α -hořké kyseliny, jejichž obsah se pohybuje v rozmezí 3 - 10 % hm. Jednotlivé homology se od sebe liší postranními acylovými řetězci. Humulon, kohumulon a adhumulon jsou dominantní isomery ve chmelu. Během chmelovaru se α -hořké kyseliny isomerují na iso- α -hořké kyseliny. Díky této reakci vznikají dva geometrické isomery, jejichž poměr v pivu je téměř neměnný²⁵.

2.6. Antioxidační kapacita a metody stanovení

U vzorku, který obsahuje velké množství antioxidantů, je obtížné stanovovat jednotlivé látky, a proto se zavedl pojem tzv. celková antioxidační kapacita (Total Antioxidant Capacity - TAC). Existuje celá řada používaných metod. Některé jsou založeny na použití činidla poskytujícího s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty a intenzita zabarvení je měřena spektrofotometricky. Jiné metody zase sledují změny fyzikálních vlastností. Celková antioxidační kapacita TAC v mmol/l se vypočítá podle rovnice (1)²⁶:

$$TAC = \frac{A_{st} - A_{kontr.vz.}}{(\Delta A_{kontr.vz.} - \Delta A_{st})} \times (\Delta A_{kontr.vz.} - \Delta A_{vz.}) \quad \text{mmol/l}_{vzorku} \quad [1]$$

$$\Delta A_{kontr.vz.} = \Delta A1_{kontr.vz.} - \Delta A2_{kontr.vz.}$$

$$\Delta A_{st} = \Delta A1_{st} - \Delta A2_{st.}$$

$$\Delta A_{vz.} = \Delta A1_{vz.} - \Delta A2_{vz.}$$

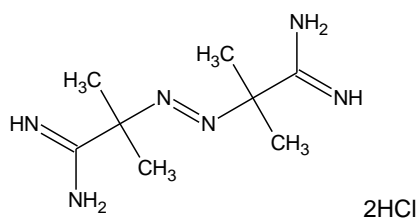
TRAP hodnota, rovnice (2), je považována v pivovarnictví za indikátor antioxidačního účinků převážně pro polyfenolické látky²⁶.

$$TRAP(mM) = \frac{A_{vz.} - A_{blanc}}{A_{st.} - A_{black}} \times C_{st.} \quad [2]$$

Mezi ty nejznámější a nejvíce používané metody patří metoda ORAC TEAC, FRAP a DPPH.

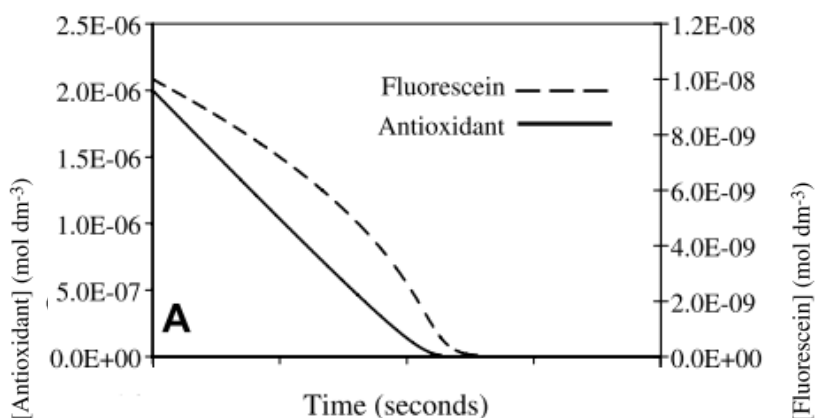
Metoda ORAC

Základem ORAC metody (Oxygen-radical absorbing capacity) je indikátorový protein β -fykoerythrin (β -PE), dále pak zdroj peroxylových radikálů 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) (Obr. 1). Lze použít i jiné radikálové zdroje, jako je např. TROLOX nebo fluorescein. Zmíněný β -PE je schopen fluorescence, peroxidací β -PE peroxylovým radikálem odvozeným od AAPH vzniká nefluorescentní produkt. Termolýzou AAPH se spustí generování peroxylových radikálů a dojde k poklesu fluorescence, který se sleduje až do úplného vyhasnutí. Přítomnost antioxidantů v reakčním systému pokles fluorescence zpomaluje^{27,28,29}.



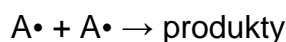
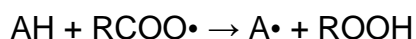
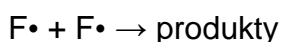
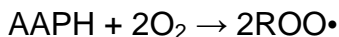
Obr. 1: Strukturní vzorec AAPH

Jednotka ORAC se používá jako srovnávací měřítko a odpovídá ploše mezi křivkou vzorku radikálu (Troloxu, fluorescein) a vzorku obsahujícího antioxidant (viz Obr. 2)³⁰.



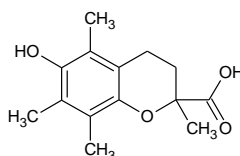
Obr. 2: Simulace křivky fluoresceinu a vzorku obsahujícím antioxidant³⁰

ORAC zkouška zahrnuje níže uvedené reakce. Schéma popisuje reakce mezi peroxylovým radikálem (RCOO•) s fluoresceinem (FH) a antioxidantem (AH). Toto reakční schéma je zobrazeno na Obr. 2³⁰.



Metoda TEAC

Nejčastěji používaná metoda ke stanovování celkové antioxidační kapacity je TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Odpovídá antioxidační aktivitě vzorku vztažené ke standardní látce Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 karboxylová kyselina) - viz Obr. 3, syntetický rozpustný analog vitamínu E. TEAC je metodou založenou na zhášení uměle připraveného syntetického stabilního radikálového kationtu ABTS⁺ s antioxidanty ve vzorku. Přítomné antioxidanty způsobí zpětnou konverzi radikálu na neutrální bezbarvou formu a zpomalení reakce^{31,26,29}.

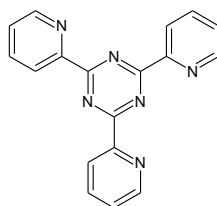


Obr. 3: Trolox strukturální vzorec

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Využívá se přítomnost antioxidantů ve vzorku a jejich schopnost redukovat železité komplexy. Dochází k zastavení peroxidace, dokud přítomné antioxidanty zcela nevymizí. Mezi zmíněné železité komplexy patří bezbarvý Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) (Obr. 4). Je schopen

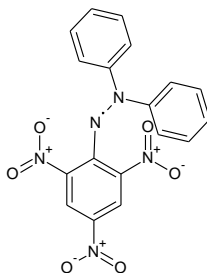
po redukcí na Fe^{2+} -TPTZ tvořit fialové produkty. Barevné změny se zachycují spektrofotometricky (593 nm) ^{29,31}.



Obr. 4: Strukturní vzorec TPTZ''

Metoda DPPH

Představuje jednu ze základních metod na posouzení antiradikálové aktivity u čistých látek a směsí. Princip metody spočívá v reakci vzorku, obsahujícího antioxidanty, se stabilním radikálem DPPH [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl] (Obr. 5). DPPH je schopen silné absorpce v UV/Vis oblasti při vlnové délce 517 nm. Během reakce dojde k redukcí radikálu za tvorby DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Dochází k postupnému odbourávání fialového barvy DPPH vlivem antioxidačních látek ^{26,29,31,32,33}.



Obr.5: Strukturní vzorec DPPH

Antioxidační vlastnosti chmele či piva byly testovány chmelařským institutem v Žatci, pomocí dvou metod. U této metody je měřen úbytek koncentrace stabilního volného radikálu DPPH během reakce s antioxidanty obsaženými ve vzorku. Reakce byla sledována dvěma metodami: spektrofotometricky nebo pomocí ESR (elektronová spinová rezonanční spektrometrie). ESR je nejvíce používanou metodou a spolehlivou metodou na analýzu piva. Níže jsou jednotlivé zkoušky uvedeny podrobněji ³⁴:

1. Spektrofotometrické stanovení s DPPH

Princip testování je založen na reakci barevného radikálu DPPH se vzorkem, který obsahuje antioxidační látky. Nepárový elektron hydrazylového dusíku je odpovědný za modré zbarvení radikálu. Konkrétní reakce způsobí postupné odbarvování reakční směsi a dojde ke snížení absorbance analyzovaného roztoku (525 nm). Redukční aktivita vzorku (RA) představuje rozdíl absorbance na počátku měření a po uplynutí 10 minut a vypočte se podle rovnice (3)³⁴:

$$RA_{DPPH} = A_{\text{čidlo}} + A_{\text{sep.vz.}} - A_{\text{vzorek}} \quad [3]$$

2. ESR - DPPH - Stanovení redukční aktivity s DPPH

Základem chemické zkoušky je reakce stabilního radikálu DPPH s antioxidanty obsaženými v analyzovaném vzorku, přitom se měří časový průběh reakce. Pomocí ESR se stanovuje koncentrace radikálu. Měřena je energie, která je vyzářena během změny spinu u nepárovaného elektronu, vloženého v magnetickém poli. Výsledek analýzy odpovídá procentuálnímu úbytku hodnoty DPPH na počátku měřené reakce³⁴.

Antioxidanty spadají mezi látky vhodně stanovitelné též elektrochemicky, protože snadno podléhají redoxním reakcím. Rozlišujeme tzv. přímé metody stanovení. Jednou z možných metod je cyklická voltametrie na pevné elektrodě. Předpokládáme, že výsledky cyklické voltametrie vzorku, obsahujícího antioxidanty (jako je výška a poloha píku), budou v korelaci s hodnotami TAC. Podle výšky píku lze určit množství antioxidantu ve vzorku. TAC hodnota bude vyšší, pokud se látky budou snáze oxidovat³⁵.

Dalším typem jsou nepřímé elektrochemické metody, které využívají elektrochemickou generaci činidla. Většinou se ke generaci využívá chlor

a brom. Takto vzniklé činidlo reaguje s antioxidanty přítomnými ve vzorku. Příkladem nepřímého stanovení je coulometrická titrace. Tato metoda byla úspěšně odzkoušena na vzorcích vína. Halogeny (chlor, brom) byly generovány v acetonitrilu při konstantním proudu 5,0 mA^{36,37}.

2.7. Metody stanovení ostatních látek obsažených v pivu

Pivo je složitá matrice, která obsahuje, kromě výše diskutovaných polyfenolických látek nebo vitamínů, i velké množství dalších organických i anorganických molekul (viz. Tab. 4.), které lze stanovit pomocí běžně používaných a známých metod.

metoda	detekované látky	citace
HS-GC	acetaldehyd, 4-Mei, těkavé látky	38
CE	aminokyseliny, hořké kyseliny, sacharidy, peptidy, fenolické kyseliny, bílkoviny, vitamíny	39
	oxid uhličitý, ethanol, anorganické a organické soli	40
CZE-DAD	nearomatické organické soli, alkoholy, purin, pyrimidin, aminy, flavanoidy	41
CE-LED	riboflavin	42
HPLC-DAD	XN, IXN, 8PN	43
HPLC-ECD	flavonoidy, tříslovina, katechiny	44
RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS	proanthocynidiny, thiolysis, procyanidin B3	45
HPLC-UV	aldehydy - acetaldehyd, methylpropanal, furfural	46
HPLC-MS/MS	xanthohumol, isoxanthohumol, 6-geranylneringenin, 6- a 8- prenylnaingenins, desmethylxanthohumol,	47
HPLC-UV	xanthohumol	47
FA-AAS	stopová množství železa, mědi, manganu	48
ICP-AES	stopová množství kovů, zbytkový obsah uhlíku (RCC), volné železo	48
ETA-AAS	stopová množství mědi	49

Voltametrie	volný a celkový obsah oxidu siřičitého, acetaldehyd v oxidu siřičitém	50
TLS	zkouška poklesu fluorescence čerstvých vzorků	51
PSA, ASV	celkový obsah kovů, volné železo	52
TLC Fluorimetrie CE-UV LC-MS	4-Mei	53
2D-NMR	2_butanol, adenin, uridin, xantin, tyrosin, prolin, tyrosol, isopropanol, jantarová a mléčná kyselina,	39
LC-PDA-ESI-MS (UV)	kyselina gallová, katechin, epikatechin, rutin, quercetin	54
NIR PDW	obsah ethanolu, kyslíku,	55
FT-IR IEC	aminokyseliny, bílkoviny, proteiny šřavelan	56,57
Filtrace	mykotoxiny - ochratoxin A, fumonisin B1 a B2	58
MEKC - HPLC	iso- α kyseliny	59
Fluorescence s chemometrickou analýzou	riboflavin	60
N-way PLS nebo PLS multivariáční kalibrace	riboflavin, aminokyseliny	60
HPLC ZE	šřavelan	61

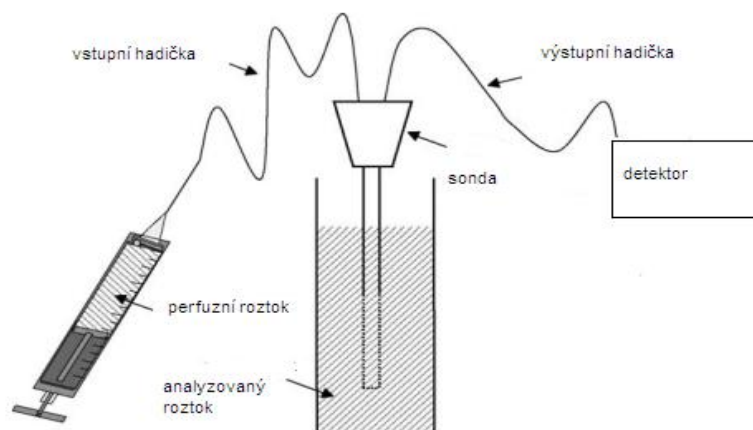
Tab 4. Výčet dalších organických a anorganických sloučenin obsažených v pivu a jejich metody stanovení.

2.8. Mikrodialýza s amperometrickou detekcí

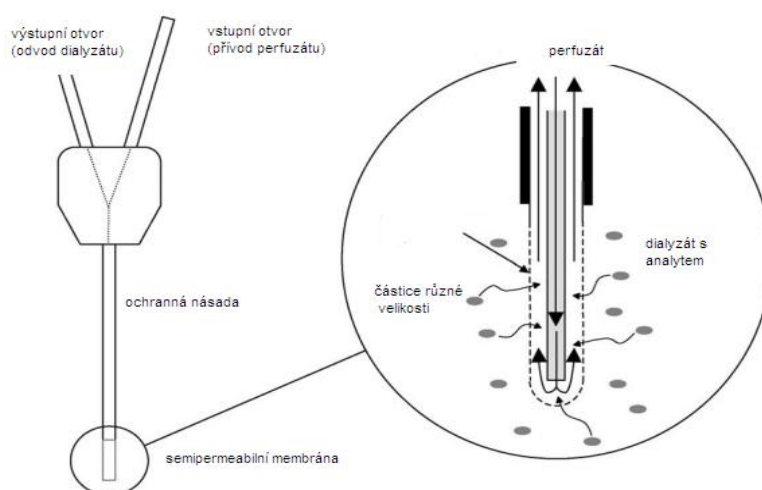
Pojem mikrodialýza (Obr. 6) a její historie sahá až do počátku roku 1960, kdy se objevily první kanyly, dialyzační vaky nebo dialyzátory, které se používaly na studium živočišné tkáně. Je to tedy metoda, která se hojně využívá v lékařství nebo lékařské biochemii. Mikrodialýza se dá zahrnout do skupiny metod dělení směsí známé jako membránové separace, stejně jako dialýza nebo elektrodialýza. Dělení probíhá díky rozdílnému pohybu složek směsi v průběhu transportu přes překážku, kterou je selektivně propustná membrána. Princip metody je založen na odběru rozpustných molekul z intersticiálního roztoku (tekutiny) pomocí semipermeabilní membrány, která je na špičce mikrodialyzační sondy (Obr. 7) připojené výstupní a vstupní trubičkou. Mikrodialyzační sonda je neustále promývána tzv. efluentem, kterým je zpravidla pufrovaný fyziologický roztok. Nízkomolekulární rozpuštěné látky mohou, po vložení do konkrétního analyzovaného roztoku, pronikat přes polopropustnou membránu dovnitř sondy. Toto pronikání je realizováno difúzí. Je možný i opačný proces, kdy je do efluentu přidána nízkomolekulární látka, která difunduje ven ze sondy. Směr, kterým bude analyt pronikat, určuje koncentrační gradient dané látky. Účinnost analýzy, extrakce, je závislá na rychlosti průtoku⁶².

Membrány se vyrábějí z organických polymerů. V současné době se využívá mikroporézní uhlík (duté vlákno). Podmínkou je možnost zhotovit tenkou folii propustnou pro určité typy látek a naopak. Tento fakt je řízen velikostí pórů membrány⁶³.

Velikou výhodou analýzy je potřeba velmi malého množství vzorku.



Obr. 6. Schéma mikrodialyzačního měření⁶².



Obr. 7: Schéma mikrodialyzační sondy. Semipermeabilní membrána na špičce sondy umožňuje výměnu rozpustných molekul mezi sondou a okolním vzorkem⁶².

Jako detekční systém byla použita amperometrie. Metoda, při které se analyt stanoví z velikosti proudu, který prochází pracovní elektrodou za konstantního potenciálu. Tento potenciál se obvykle volí tak, aby elektrodou procházel limitní proud analytu. Je měřen proud, který protéká článkem v závislosti na čase. Velikost tohoto proudu je přímo úměrná koncentraci v přítomnosti měřeného analytu^{62,63}.

polyfenolová látká	český ležák (mg/l)	české výčepní (mg/l)	dominantní potenciál (Epa) (mV)
Gallová kyselina	0,104	0,106	60
Protokatechová kyselina	0,170	0,116	120
p-Hydroxybenzoová kyselina	6,15	7,66	720
Kvercetin	0,104	0,108	120
Rutin	1,254	0,606	180 (780)
Sinapová kyselina	0,603	0,566	-
Ferulová kyselina	3,75	2,75	360
p-Kumarová kyselina	0,987	0,686	540
Vanilin	0,030	0,142	300
Vanilová kyselina	0,921	0,568	480
Epikatechin	0,425	0,463	-
Syringová kyselina	0,154	0,152	360
Kávoá kyselina	0,153	0,150	120
Katechin	1,50	1,72	480
Salicylová kyselina	-	-	720

Tab. 5.: Vybrané polyfenolické látky a jejich odhadový výskyt v 1 litru piva a informace o dominantním potenciálu při kterém se oxidují^{65,65}.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

- NaCl (chlorid sodný) - Lachema n. p. Brno, závod Neratovice, Chemapol Praha, Česká Republika
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného) p. a. - Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, Česká Republika
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného) p. a. - Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, Česká republika
- $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ (kyselina gallová) (97 %) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (katechin) (98 %) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (kyselina askorbová) p. a. - Penta, výrobní divize Chrudim, Česká Republika
- $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ (DPPH, 2,2-diphenyl-1-pikryl-hydrazyl) - Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- CH_3COOH (methanol) p. a. – Penta (divize Chrudim, Ing. Petr Švec)

Reálné vzorky piva:

značka piva	obsah alkoholu	expirační doba	pH
Litovel classic	4,2 % obj.	5. 5. 2013	4,6
Litovel moravan	4,6 %obj.	5. 7. 2013	4,7
Staropramen ležák nefiltrovaný	5,0 % obj.	18. 9. 2013	4,5
Bráník	4,8 % obj.	12. 7. 2013	4,5
Zubr	4,1 % obj.	17. 5. 2013	4,7

Klasik	3,8 % obj.	4. 9. 2013	4,6
Krušovice	5,0 % obj.	10. 6. 2013	4,8
Kozel	4,0% obj.	19. 8. 2013	5
Kozel černý	3,8 % obj.	25. 9. 2013	4,7
Plzeň	4,4 % obj.	28. 9. 2013	4,9



3.2. Příprava roztoků

Všechny roztoky byly připravovány za použití vysoce čisté vody z Millipore systému ($15 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Zásobní roztok PBS pufru

Fosfátový pufr s přídavkem chloridu sodného, (phosphate buffered saline, PBS) byl připravován navážením 17,907 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 1,375 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ a 40 g NaCl a rozpuštěním uvedených solí ve 400 ml deionizované vody. Pro úplné rozpuštění látek byl použit ultrazvuk. Z takto připraveného koncentrátu se připravil 10x zředěný PBS pufr o pH 7,4, se kterým se dále pracovalo.

Zásobní roztoky standardních látek

Jako standardní látky byly vybrány kyselina gallová, katechin (fenolické látky) a kyselina askorbová (antioxidant, který není derivátem fenolu). Kyselina gallová je používána při stanovení celkového obsahu polyfenolů a obdobných látek ve víně metodou Folin-Ciocalteu⁶⁶. Katechin je používán při stanovení obsahu antioxidantů ve víně metodou TRAP⁶⁷. Zásobní roztoky o koncentracích 0,0005 mol/l byly připravovány v PBS pufru. Pro úplné rozpuštění jednotlivých navážek byly připravované zásobní roztoky krátce vloženy do ultrazvuku.

MeOH roztok radikálu DPPH

Bylo připraveno 25 ml MeOH roztoku DPPH, rozpuštěním práškového radikálu v methanolu, o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Takto připravený roztok byl ponechán půl hodiny ve tmě.

Pracovní vzorky piva pro EPR měření

Vzorky piva byly ředěny v poměru 1:5 do 350 μ l mikrotitračních jamiček, zásobním roztokem PBS pufru (pH 7,4).

Příprava měřených vzorků pro EPR

Do připravených eppendorfek se postupně napipetovalo 650 μ l zásobního MeOH roztoku DPPH, 250 μ l zásobního roztoku PBS pufru (pH 7,4) a 100 μ l připravených zředěných pracovních vzorků piva. Tento roztok byl vpraven do speciálních křemených kapilárek a utěsněn.

Mobilní fáze pro HPLC měření

Jako mobilní fáze byla zvolena směs: 15 % (v/v) acetonitril v 50 mM vodném roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (fosfátový pufr), jehož pH bylo před smícháním upraveno kyselinou fosforečnou na 2,5.

3.3. Použité přístroje a pomůcky

Při návrhu amperometrické metody spojené s mikrodialýzou byly použity tyto přístroje a pomůcky:

- isokratická pumpa Pye-Unicam Philips (model PU4015)
- microdialyzační sonda MAB - MAB 11.8.10, 6kDa pokrytá polyethylen-sulfonovou membránou. Aktivní měřicí délka odpovídá cca 10 mm, vnější průměr je 0,5 mm (Microbiotech/se AB, Stockholm, Sweden). Samotná MAB sonda je propojena trubičkami (PEEK - Polyether ether ketone).
- Elektrochemická stanice - (Nanoampere, L-Chem, Czech Republic): CFE pretreatment i amperometrické zkoušky

Při měření CV a HPLC s amperometrickou detekcí byly použity tyto přístroje a pomůcky:

- elektroda ze skelného uhlíku - pracovní elektroda na CV měření
- argentchloridová elektroda - referentní elektroda na CV měření, ED. Spol. s.r.o., uchovávána v roztoku KCl, $c = 3,0 \text{ mol/l}$
- alumina $0,05 \mu\text{m}$ Buchler, USA – roztok na leštění pracovní elektrody
- předkolona C18 na HPLC měření
- kolona C8 na HPLC měření

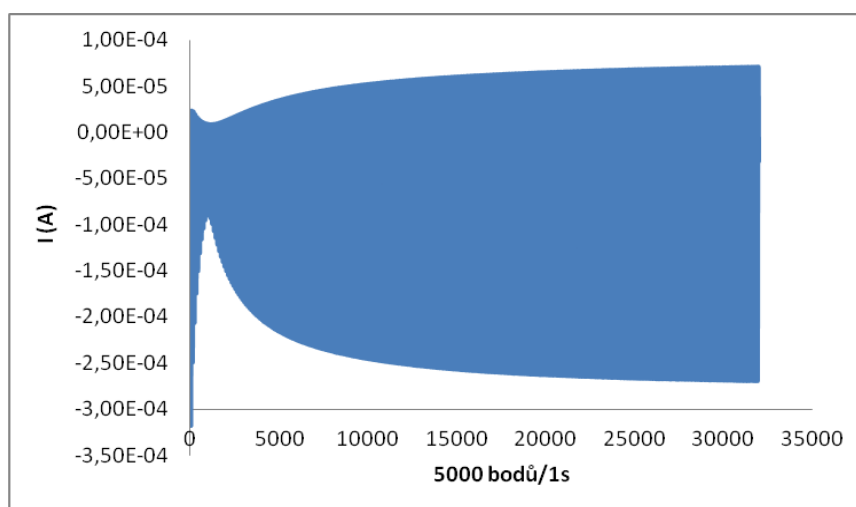
3.3.1. Elektrody - mikrodialýza s amperometrickou detekcí

Všechna elektrochemická měření byla uskutečněna pomocí tří-elektrodového zapojení za pokojové teploty.

Pracovní elektroda

Materiálem pracovní elektrody bylo uhlíkové vlákno na bázi polyakrylonitrilu ($7\text{-}8 \mu\text{m}$ Courtaulds XA-S, typ α , Courtaulds, UK) získané od distributora (Havel Composites Inc, Česká republika). Elektrody z tohoto materiálu (Carbon fiber electrode - CFE) byly připravovány následujícím postupem: vlákno se přilepí za pomoci vodivého epoxidového lepidla

(Epotek H20E, Polytec, Germany), které se nanese na měděný drát. Vzniklý spoj se tvrdí při cca 150°C po dobu cca 10 minut. Vláknem s takto připojeným měděným kontaktem je vsazeno do skleněné kapiláry - cca 10 mm a nechá se vyčnívat ze zúženého konce kapiláry. Oba konce jsou utěsněny pomocí epoxidové pryskyřice (CHS Epoxy 1200, Sindat Pilsen, Czech Republic). Před samotným měřením se vnější část vlákna seřízne na délku cca 5 mm a tento konec je krátce sonifikován v roztoku dichlormethanu. Tím dojde k odstranění případných mastnot na povrchu CFE. Takto připravená CFE se podrobí tzv. pretreatmentu⁶⁸, tj. cyklování elektrody v 1% roztoku (w/w) NaCl mezi 0 a 2,9 V proti argentchloridové elektrodě (Ag / AgCl) po dobu 20 s, při frekvenci sinusové vlny 50 Hz, následuje 5 s při konstantním potenciálu -0.8 V a 5 s při potenciálu 1.5 V (Obr. 8).



Obr. 8.: Závislost proudu na čase při průběhu pretreatment na uhlíkovém

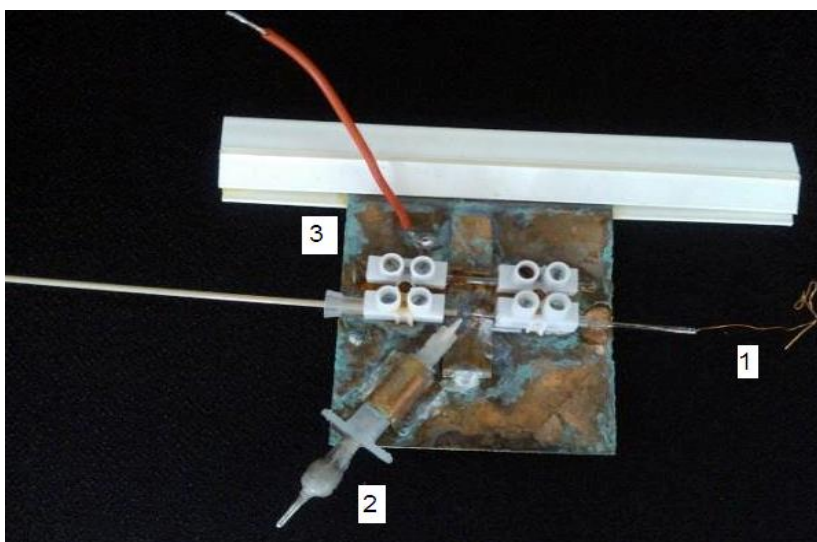
Referentní elektroda

Referentní mini-elektroda Ag / AgCl - L-Chem, Czech Republic), byla umístěna v těsné blízkosti konce křemenné kapiláry.

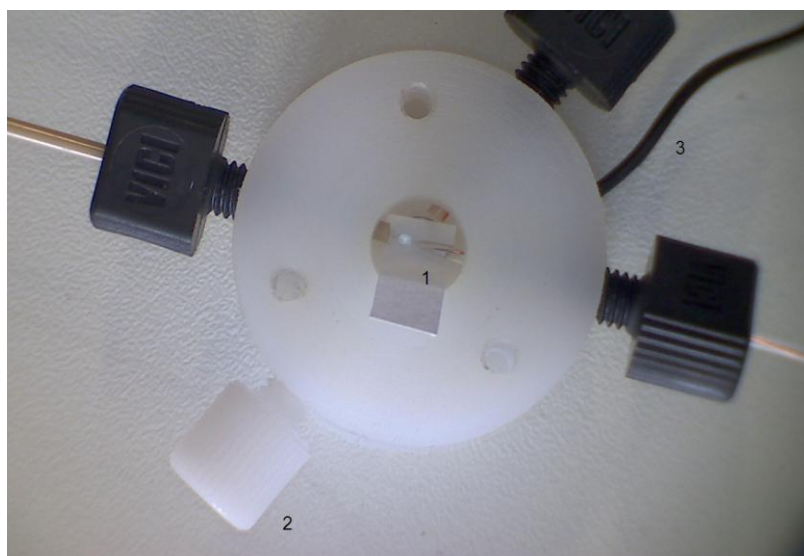
Pomocná elektroda

Cuprexitivová destička, tj. měděná folie s velkým povrchem.

Uvedené elektrody byly součástí detektoru, jehož důležitým rysem bylo umístění pracovní elektrody. Uhlíkové vlákno bylo přímo vloženo do ústí křemenné kapiláry (vnitřní průměr 50 μm) nebo obdobné kapiláry z materiálu PEEK. Detektor byl proveden ve dvou variantách, otevřené (Obr. 9) a uzavřené (Obr. 10).



Obr. 9.: Otevřená varianta amperometrického detektoru na bázi CFE vlákna vloženého do křemenné kapiláry (1), s přístupem pro referentní minielektrodu Ag / AgCl (2) a měděnou fólií pomocné elektrody (3).



Obr. 10.: Uzavřená varianta amperometrického detektoru na bázi CFE vlákna vloženého do kapiláry (1), výstupu pro možné připojení referentní elektrody Ag / AgCl (2) a pomocné elektrody (3).

EPR měření za pomoci DPPH radikálu byla prováděna na přístroji MiniScope MS200. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí programu Analysis2.02. Čas jednotlivých dílčích měření trval 120 s, BO. field nastaveno na 3353.

Coulometrická měření byla uskutečněna na elektrochemickém průtokovém přístroji Eca Flow 120 GLP (Istran, Bratislava). Analyzátor byl řízen počítačem a pomocí programu Eca-titr. Pracovalo se za pomoci kompaktní průtokové měřící cely, jejíž součástí byla pracovní elektroda z porézního uhlíku E53C, nasycená referentní argentochloridová elektroda a platinová pomocná elektroda.

Na odhad antioxidační kapacity pomocí cyklické voltametrie byl použit přístroj Cell Stand. CS2 + HCH Instruments, Inc., USA a pracovalo se při tříelektrodovém zapojení. Výsledky se vyhodnotily pomocí programu CHI 660C Elektrochemical WorkStation.

HPLC systém, který se využil na pokus o identifikaci přítomných polyfenolických látek ve vzorcích piva, sestával z vysokotlaké pumpy LC-10AD (SHIMADZU GmbH, Japan), degasérové jednotky DGU-14A (SHIMADZU GmbH, Japan), jako chromatografická kolona byla použita EC 250 / 2 NUCLEODUR C8 Gravity 5 μm , 250 x 2,1 mm I. D. (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), potenciostat COULOCHEM Model 5100 A (ESA Inc, MA Chelmsford, USA). Nástřiky jednotlivých vzorků byly prováděny 25 μl mikrostříkačkou (Hamilton, Reno, USA) přes manuální nástřikový ventil se smyčkou 20 μl (Rheodyne, Cotati, USA). Veškeré kapiláry, těsnění, spojky a ferulky byly vyrobeny z polymerního materiálu PEEK. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 200 μl / min., dialyzátu piva bylo 10 μl , nástřiková smyčka 20 μl . Separace byla prováděna na koloně C8 250 x 2,1 mm. K detekci přítomných snadno oxidovatelných látek byla použita cela s pracovní elektrodou z uhlíkového vlákna zapojená ve dvouelektrodovém zapojení. Potenciál na pracovní elektrodě byl nastaven na 1400 mV. Citlivost byla nastavena na 10 nA/V.

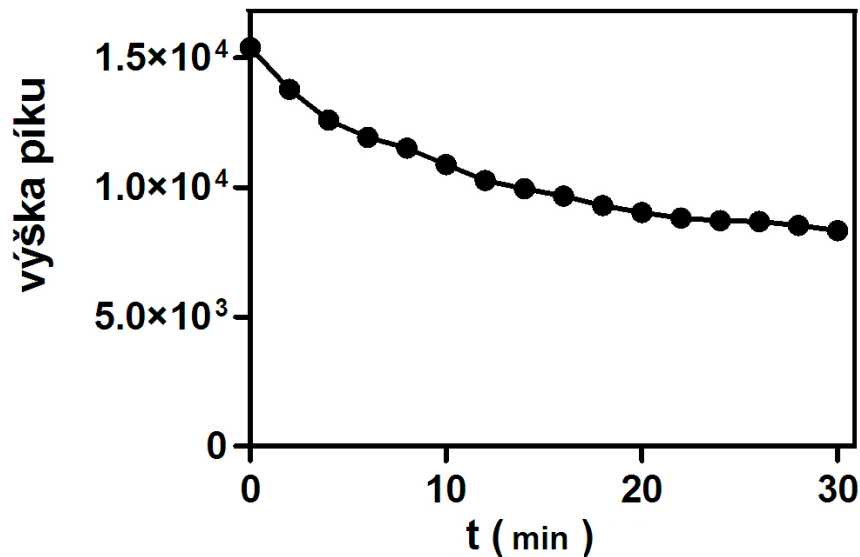
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. EPR metoda s DPPH radikálem

Jako srovnávací metoda byla zvolena odzkoušená a často používaná EPR metoda se stabilním volným radikálem DPPH.

Stanovení vhodných měřících podmínek

Pro úvodní experiment s měřením DPPH metodou bylo vybráno pivo kozel, které bylo desetkrát zředěno PBS puforem. Reakční směs byla rychle připravena smícháním 650 μl MeOH roztoku DPPH, 250 μl PBS pufru a 100 μl zředěného piva a měřena EPR spektra v intervalu dvou minut po dobu třiceti minut (viz. Obr 11.).



Obr. 11.: Závislost výšky píku vzorku piva měřeného EPR metodou za pomoci DPPH radikálu v závislosti na čase.

Z Obr. 11 vyplývá, že potřebný čas pro reakci DPPH s antioxidanty obsaženými v pivu je 30 minut. Poté byla proměřena sada vybraných deseti

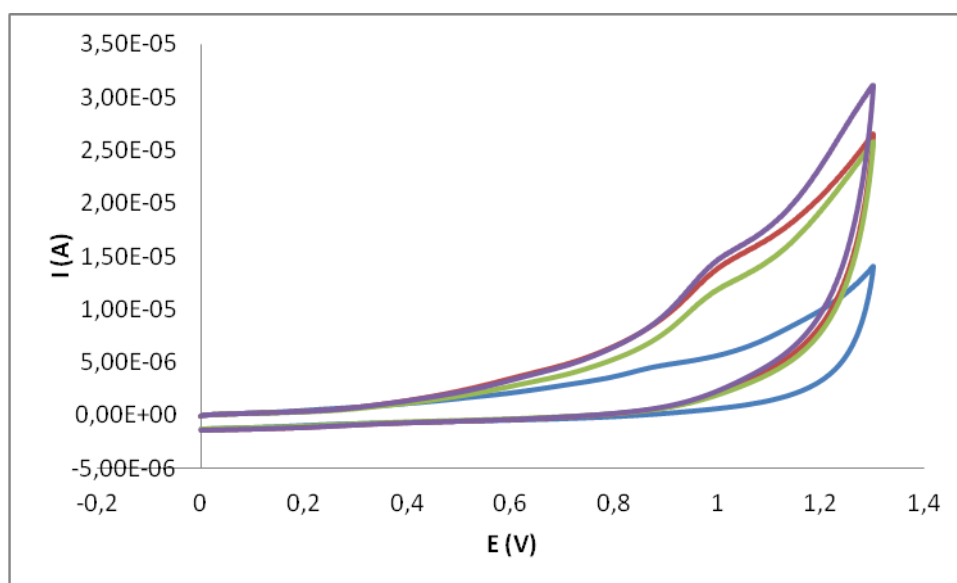
piv českých značek o různé stupňovitosti, obsahu alkoholu apod. Reakční směs o stejném složení jako v úvodním experimentu byla nadávkována do EPR kapiláry, ponechána reagovat 30 minut a poté bylo změřeno EPR spektrum. Jako srovnávací vzorek byla použita směs MeOH roztoku DPPH (650 μ l), PBS pufr pH 7,4 (350 μ l) a kyseliny gallové (výsledná koncentrace činila 0,0005 mol/l. Výsledky stanovení antioxidační kapacity piv stanovené DPPH metodou a vyjádřené jako ekvivalentní koncentrace kyseliny gallové jsou uvedeny v Tab. 6.

standardní roztok DPPH ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l)	
značka piva	TAC hodnota (mmol/l)
kozel černý	0,310
plzeň	0,274
litovel classic	0,168
zubr	0,198
staropramen nefiltrovaný	0,156
krušovice	0,138
litovel moravan	0,153
kozel	0,137
braník	0,108
klasik	0,061

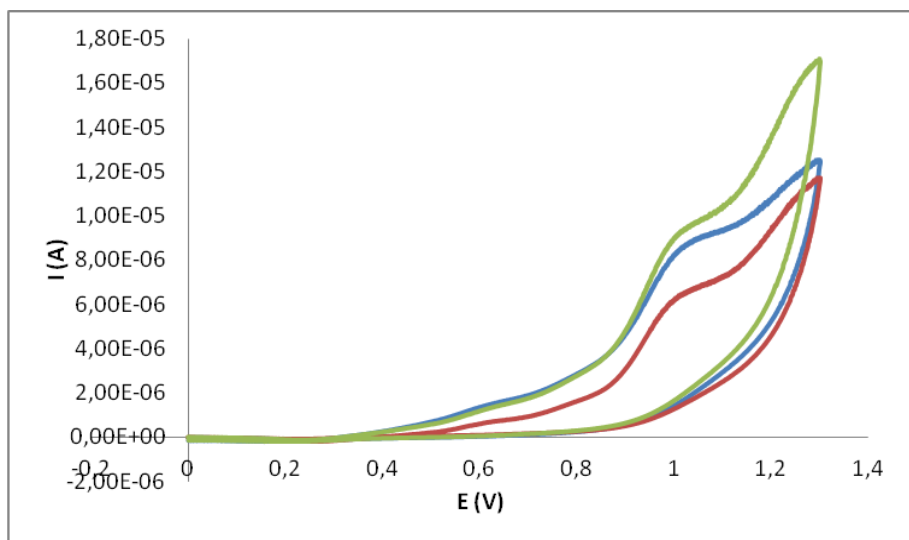
Tab. 6.: Stanovení celkového množství snadno oxidovatelných látek v pivu EPR metodou s DPPH radikálem přepočtené na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

4.2. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je další metoda, která se používá na odhad antioxidační kapacity různých vzorků, ať už potravin, metoda je často využívána pro analýzu vín⁶⁹, tak i pro vzorky zajímavé z hlediska klinické praxe. Přestože pivo vykazuje CV odezvu, metoda není používána z důvodu absence rozlišeného píku při nízkých potenciálech kolem 0,5 V vs. Ag / AgCl (Obr. 12). Přesto lze TAC vyhodnotit např. metodou Q_{500} , viz. Tab. 7 (Obr. 13). Měřená byla opět stejná řada piv řaděná v poměru 1:1 PBS pufr (pH 7,4). Jako základní elektrolyt byl zvolen PBS pufr (pH 7,4). Pracovní elektroda byla elektroda ze skelného uhlíku, jejíž povrch byl před každým scanem leštěn roztokem aluminy. Rychlost scanu byla nastavena na 100 mV/s.



Obr. 12: Voltamogramy tří vybraných značek piva (braník, klasik, kozel) ve srovnání se voltamogramem základního elektrolytu (PBS pufr - červená křivka)



Obr 13: Voltamogramy tří vybraných piv (braník, klasik, kozel) uvedte, která to byla, po odečtení odezvy základního elektrolytu (pufru).

značka piva	Q_{500} (C)	Q_{800} (C)	Q_{1300} (C)
kozel černý	$1,06 \cdot 10^{-4}$	$5,36 \cdot 10^{-4}$	$3,08 \cdot 10^{-3}$
plzeň	$5,06 \cdot 10^{-5}$	$4,08 \cdot 10^{-4}$	$3,01 \cdot 10^{-3}$
litovel classic	$2,56 \cdot 10^{-5}$	$3,09 \cdot 10^{-4}$	$2,63 \cdot 10^{-3}$
zubr	$2,49 \cdot 10^{-5}$	$2,79 \cdot 10^{-4}$	$2,46 \cdot 10^{-3}$
staropramen nefiltrovaný	$2,46 \cdot 10^{-5}$	$2,72 \cdot 10^{-4}$	$2,32 \cdot 10^{-3}$
krušovice	$2,23 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-4}$	$2,31 \cdot 10^{-3}$
litovel moravan	$1,74 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,28 \cdot 10^{-3}$
kozel	$1,39 \cdot 10^{-5}$	$1,85 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-3}$
braník	$1,15 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$
klasik	$3,80 \cdot 10^{-6}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$8,32 \cdot 10^{-4}$

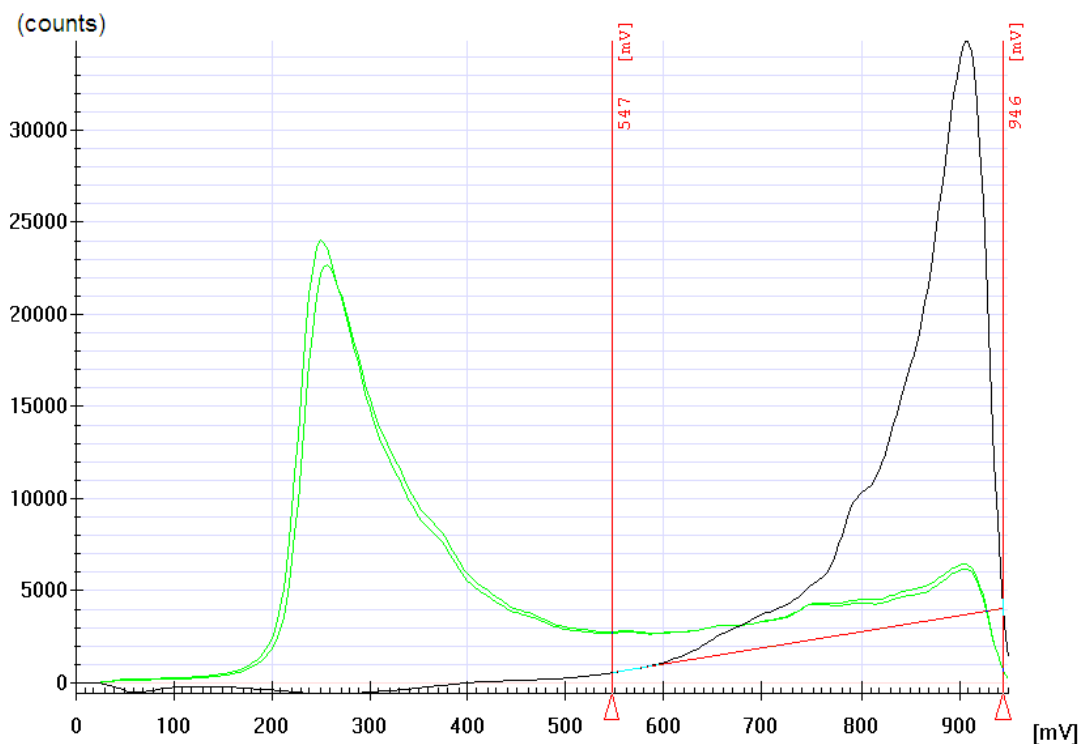
Tab. 7: Vyhodnocení TAC z CV měření metodou Q_{500} , Q_{800} a Q_{1300} deseti vybraných značek piva.

4.3. Průtoková coulometrie - EcaFlow

Jako další srovnávací metoda byla zvolena galvanostatická průtoková coulometrie. Typický výstup z této analýzy lze vidět na Obr. 14. Průtoková coulometrie se běžně používá na stanovení antioxidační kapacity mnoha potravin, ale jak se ukázalo, pro analýzu piva není vhodná, protože látky obsažené v pivu inaktivují elektrodu - tzv. electrode fouling effect.

Měření bylo prováděno za počátečního potenciálu 0 mV a konečného potenciálu 600 - 1200 mV. Jako nejvhodnější konstantní proud (z hlediska doby analýzy, která činila cca 5 minut) vyšla hodnota 100 μ A a optimální potenciál regenerace -750 mV. Rychlost průtoku byla 5,8 ml/min a na každé měření bylo nadávkováno 3 ml vzorku.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že při opakovaném měření se látky obsažené v pivu adsorbují na povrch pracovní elektrody, povrch elektrody se tzv. fouluje. Tento vliv lze vyčíst z výsledků shrnutých v Tab. 8. Při prvním měření standardu kyseliny gallové, nebyla analýza zatížena vlivem naadsorbovaných látek, protože byla použita nová elektroda. Poté následovala první analýza piva a druhé měření standardu. Zde už pozorujeme pokles celkové plochy pod křivkou standardu. Každým dalším měřením piva se tato odezva snižovala. Na základě naší analýzy jsme pomocí jedné elektrody byli schopni změřit čtyři vzorky piva. Poté by musela být elektroda vyměněna za novou, což by bylo ekonomicky nevýhodné. Metoda galvanostatické průtokové coulometrie tedy není vhodnou metodou na stanovení obsahu polyfenolů v pivu.



Obr. 14. Typický záznam galvanostatické průtokové coulometrie kyseliny gallové (zelený pík) a vzorku piva (černý pík)

vzorek	plocha pod křivkou	směrodatná odchylka	přepočtené množství kyseliny gallové (c = 0,5 mmol/l)
kyselina gallová	116,7	5,2	
klassik	54,59	5,42	0,233
kyselina gallová	76,63	6,5	-
zubr	89,4	32	0,583
kyselina gallová	52,7	9,3	-
krušovice	288	43	2,732
kyselina gallová	21,2	8,8	-
staropramen nefiltrovaný	343	104	8,089

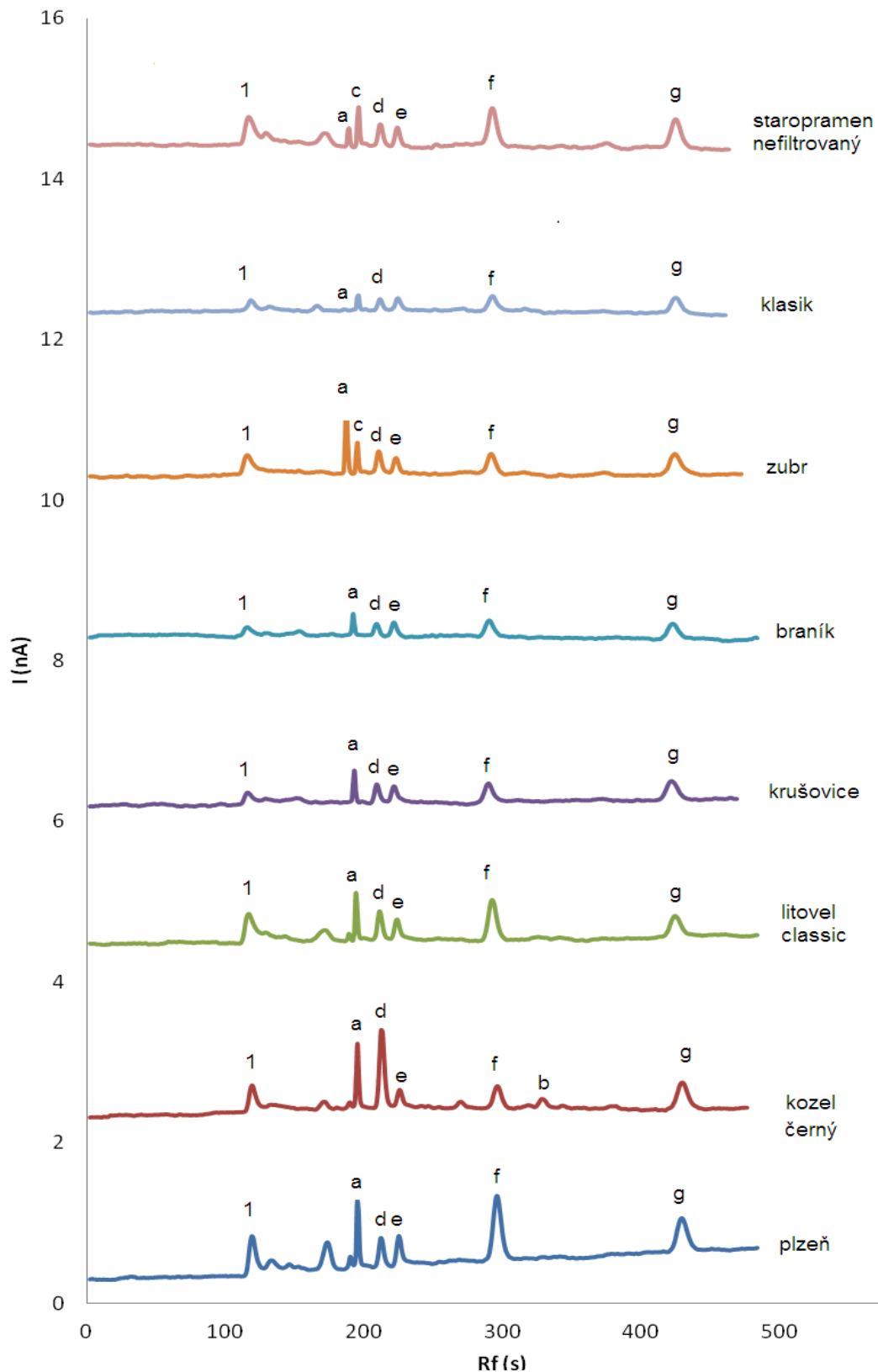
Tab. 8: Stanovení celkové antioxidační kapacity průtokovou galvanostatickou coulometrií při konstantním proud 100 μ A a přepočteno na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

4.4. HPLC s elektrochemickou detekcí

HPLC metoda je běžně používanou metodou na identifikaci látek obsažených v analyzovaných směsích. V této práci byla použita na identifikaci možných přítomných polyfenolických látek ve vzorcích piva. Na jednotlivé analýzy byly použity připravené dialyzáty piv, připravené ponořením mikrodialyzační sondy do vzorku piva. Sonda byla protékána stejnou mobilní fází, jaká byla dále použita pro HPLC experiment (viz. str. 36). Průtok sondou činil 7 μ l/min. Na základě informací o retenčních časech vybraných polyfenolických látek jsme se pokusili identifikovat píky přítomné v naměřených chromatogramech piv (Obr. 15). Podařilo se nám určit, že všechna piva obsahují příslušné množství kyseliny gallové a pivo značky kozel černý navíc i kyselinu chlorogenovou (Tab. 9). Při potenciálu 1400 mV se kromě těchto dvou látek oxidovala i řada jiných látek. Podle chromatogramů standardních polyfenolů by se mohlo jednat o kyselinu protokatechovou, kyselinu p-hydroxybenzoovou, rutin, kvercetin, katechin a kyselinu kávovou, ale jejich charakteristické retenční časy neodpovídají žádnému z našich píků. Na identifikaci se stále pracuje.

značka piva	kyselina gallová			kyselina chlorogenová		
	Rf (min)	výška píku (mV)	plocha píku (mV)	Rf (min)	výška píku (mV)	plocha píku (mV)
kozel černý	3,8	103,4	226,3	6,52	10,5	78,5
plzeň	3,8	100	216	-	-	-
litovel	3,9	87	197,5	-	-	-
zubr	3,8	67	147	-	-	-
staropramen nefiltrovaný	3,8	51,9	113,96	-	-	-
krušovice	3,7	58,25	119,7	-	-	-
litovel moravan	3,8	47,7	105	-	-	-
kozel	3,8	24	48,5	-	-	-
braník	3,8	29,2	63,3	-	-	--
klasik	3,8	21,5	42,8	-	-	-

Tab. 9: Výsledky analýzy přítomných polyfenolických látek v deseti vybraných značkách piva pomocí HPLC metody s elektrochemickou detekcí.

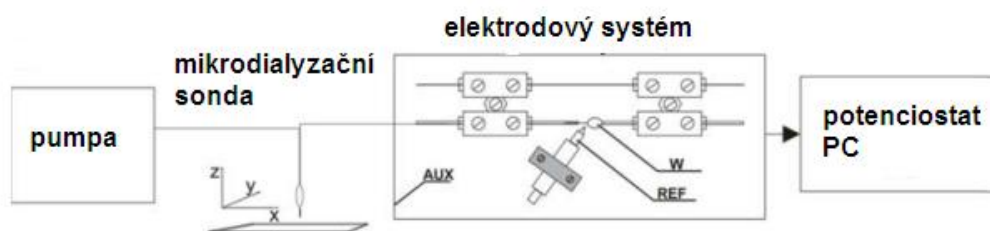


Obr. 15: Chromatogramy vybraných značek piva po přečištění mikrodialýzou měřené při potenciálu 1400 mV: 1 je t_M (mrtvý čas), pík a odpovídá kyselině gallové, pík b je identifikován jako kyselina chlorogenová, pík d je kyselina protokatechová. Zbylé píky e, f a g se nám bohužel nepodařilo zatím identifikovat.

4.5. Návrh amperometrické metody kombinované s mikrodialýzou pro stanovení obsahu snadno oxidovatelných látek v pivu

Popis systému

Měřicí systém kombinuje mikrodialýzu s elektrochemickým detekčním systémem. HPLC pumpa pumpuje mobilní fázi, za kterou jsme si zvolili PBS pufr (pH 7,4) přes mikrodialyzační sondu, jejíž membrána je propustná pro nízkomolekulární látky obsažené v analyzovaném vzorku (pivu či roztoku standardu). K výstupu sondy je připojen elektrochemický detektor, obsahující uhlíkové vlákno jako pracovní elektrodu. Potenciostat vkládá na elektrodu potřebný pracovní potenciál a snímá proud, jehož velikost je úměrná koncentraci snadno oxidovatelných látek v okolí pracovní elektrody. K řízení systému slouží počítač s vyhodnocovacím programem. Schéma uspořádání experimentu lze vidět na Obr. 16.



Obr. 16. Schéma uspořádání používané pro elektrochemické stanovení antioxidační kapacity v pivu

Na začátku každého měření, byl měřicí systém promyt ethanolickým roztokem a poté „zavodněn“ mobilní fází. Během zavodňování byla připojena MAB sonda, která byla ponořena do roztoku PBS. Proces zavodnění a hydratace MAB sondy trval půl hodiny. Průtok mobilní fáze byl 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Na základě série měření se jako nejvhodnější zvolil konstantní pracovní potenciál 800 mV. Poté se k systému připojil detekční systém a bylo spuštěno dílčí měření. Po skončení byl systém opět promýván půl hodiny mobilní fází a poté 40% roztokem ethanolu.

Popis experimentu

Podmínky každého měření, jak standardních vzorků, tak poté i vzorků piva, se řídily stejným počátečním postupem, jak bylo uvedeno na str. 49. Jednotlivé vzorky standardů, byly napipetovány na mikrotitrační destičku, kde objem jedné jamičky byl 350 μ l. Mobilní fáze proudila přes vstupní trubičku MAB sondou, postupně přes polopropustnou membránu až k detekčnímu systému. Sonda byla ponořena do analyzovaného roztoku, a po určitém čase začaly přes membránu pronikat nízkomolekulární látky, které byly dále proudem unášeny až k detektoru.

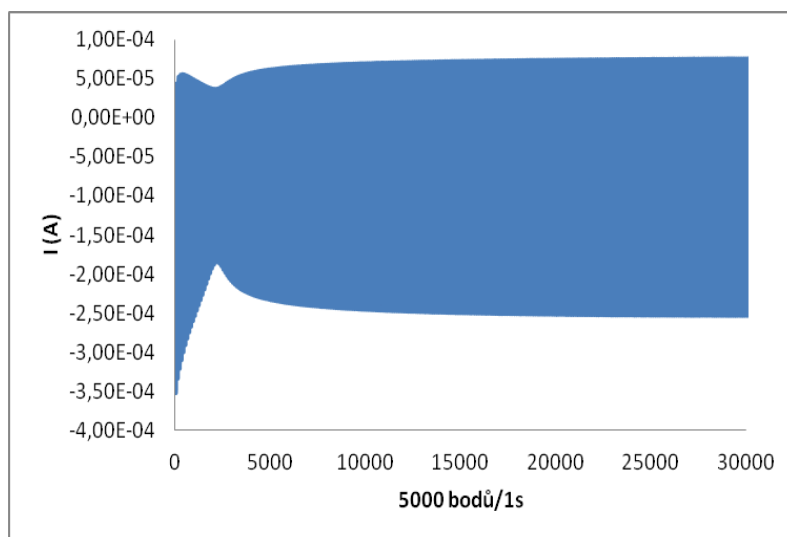
Regenerace elektrody

Pivo je složitá matrice a obsažené látky během měření zůstávají na povrchu pracovní elektrody a tím ji inaktivují, jak bylo pozorováno při měření pomocí galvanostatické coulometrie. Uvedený problém se podařilo vyřešit nalezením vhodného způsobu regenerace elektrody, kterým je krátkodobé (1 s) působení potenciálového programu, identického s první fází pretreatmentu (viz Str. 38, Obr. 17), který je řešen řízenou elektrooxidací / redukcí elektrody (nastavení podmínek viz. Tab. 10). Předpokladem bylo, že při vysokých kladných hodnotách potenciálů dochází ke tvorbě vysoce reaktivních hydroxylových radikálů reakcí (4), které odstraňují adsorbované vrstvy produktů oxidace zapříčiňující inaktivaci elektrody.

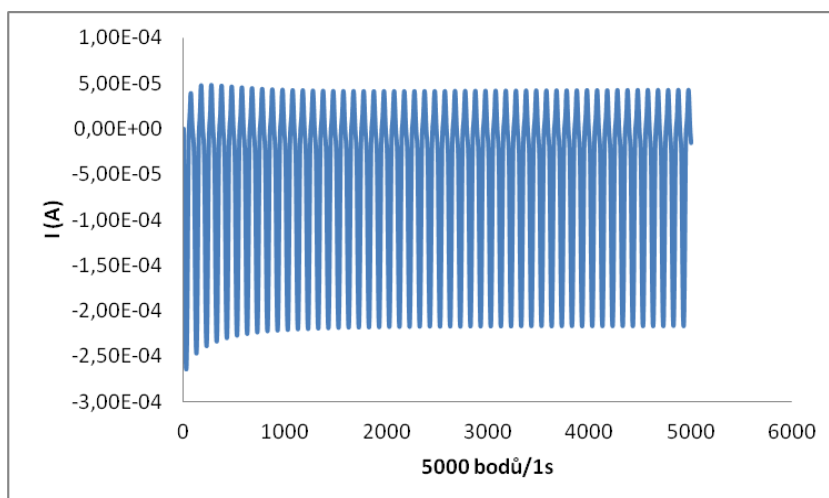


Uvedená reakce probíhá při potenciálech větších než 1,8 V vs. Ag / AgCl na bórem dopované diamantové elektrodě (BDDE) a je často využívána pro regeneraci odezvy elektrochemického stanovení na této elektrodě⁷⁰. Reakce probíhá i na CFE, nicméně OH \cdot reaguje i s vlastním povrchem elektrody. Tento jev vede ke ztenčování vlákna a již byl detailněji studován při předchozí práci naší laboratoře⁶⁸. Kvůli postupnému ztenčování je životnost vlákna prováděním pretreatmentu omezena. Na základě

experimentů bylo zjištěno, že pro vzorky standardů i vzorky piva postačuje doba pretreatmentu 1 s pro 100 % regeneraci odezvy (Obr. 18.), vlákno pak vydrží cca 70 - 75 měřících cyklů, než dojde ke zkreslení výsledků a následně i k destrukci CFE.



Obr. č. 17: Závislost proudu na čase při průběhu pretreatment na uhlíkovém vlákně před začátkem měření.



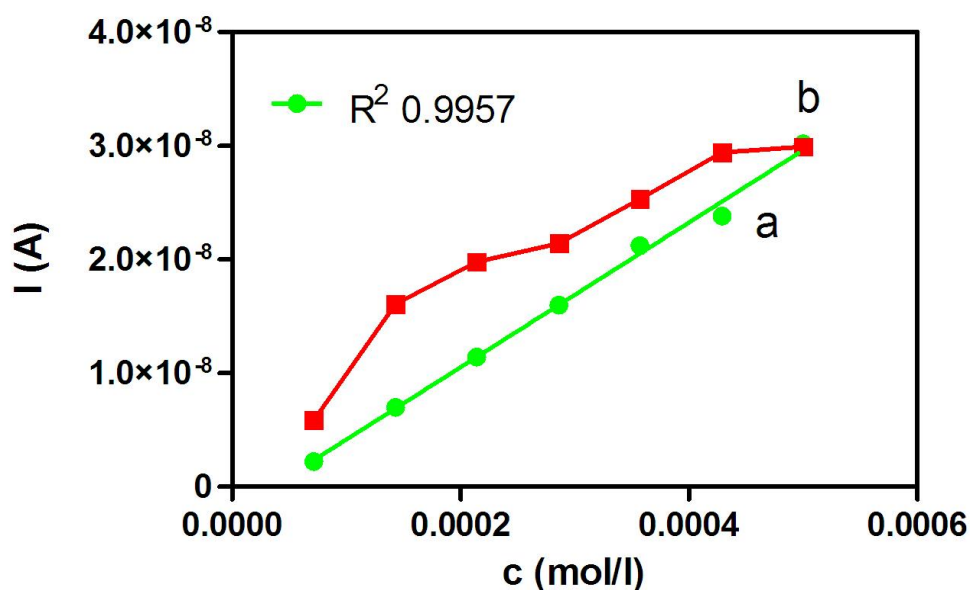
Obr. 18.: Závislost proudu na čase při průběhu pretreatmentu na uhlíkové elektrodě následované po analýze vzorku piva.

podmínky 1		podmínky 2		podmínky 3	
typ signálu	sinusová vlna	-	-	-	-
potenciál 1	2,9 V	potenciál 2	-0,8 V	potenciál 3	1,5 V
frekvence	50 Hz	-		-	-
čas	1 s	čas	0 s	čas	0 s
rozlišení	5000	-	-	-	-

Tab 10.: Nastavení podmínek při preatreatmentu během analýzy piva.

Hydratace sondy

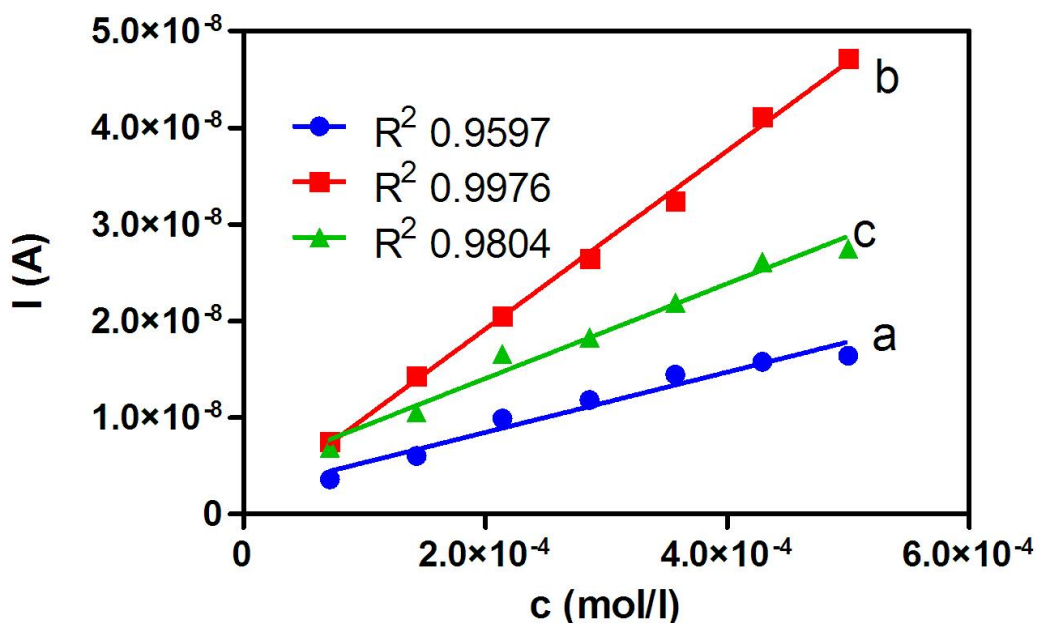
Na základě měření standardních roztoků i vzorků piva, bylo zjištěno, že pro lepší a stabilnější výsledky je za potřeby MAB sondu před vlastním měřením hydratovat v roztoku PBS pufru (pH 7,4). Pro naše měření se jevila dostačující půlhodinová hydratace, aby výsledky byly stabilní. Na Obr. 19. jsou uvedeny výsledky měření kyseliny askorbové pomocí MAB sondy bez a s předchozí hydratací – je evidentní, že po hydrataci sondy se její proudová odezva stabilizuje a je lineární.



Obr. 19.: Závislost stability proudové odezvy MAB sondy na délce hydratace její membrány v PBS pufru. Použit byl vzorek standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentracích v rozmezí $7,14 \cdot 10^{-5}$ mol/l až $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Křivka a -hydratace půl hodiny, křivka b - suchá sonda. MAB sonda (11.8.10, 6kDa, polyethylen-sulfonová membrána, aktivní délka 10 mm, vnější průměr je 0,5 mm), hydratovaná před analýzou půl hodiny v PBS (pH 7,4). Potenciál 800mV, průtok mobilní fáze (PBS pH 7,4) $0,7 \mu\text{l} / \text{min}$, Třielektrodový detekční systém: pracovní elektroda uhlíkové mikrovláknko, referentní minielektroda Ag / AgCl, pomocná elektroda měděný plíšek. 180 s před ponořením MAB sondy do roztoku proběhl pretreatment dlouhý 1 s, poté byla MAB sonda ponechána 120 s v roztoku, následně byla sonda vytažena a po 60 s byl proveden 1s pretreatment. a: $y = 6,364 \cdot 10^{-5} x - 2,211 \cdot 10^{-9}$

Měření standardů

Celkem byly proměřeny kalibrační křivky u tří vybraných standardních látek: kyselina gallová, kyselina askorbová a katechin (viz. Obr. 20). A to v rozmezí koncentrací $7,14 \cdot 10^{-5}$ mol/l až $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l.



Obr. 20: Kalibrační závislost proudové odezvy, vybraných standardů antioxidantů, v závislosti na jejich koncentraci v rozmezí $7,14 \cdot 10^{-5}$ mol/l až $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/l (a - katechin b - kyselina gallová, c - kyselina askorbová). Byly zachovány stejné měřicí podmínky, jako jsou popsány u Obr. 19.

$$a: y = 3,121 \cdot 10^{-5} x + 2,214 \cdot 10^{-9}$$

$$b: y = 9,224 \cdot 10^{-5} x + 7,03 \cdot 10^{-10}$$

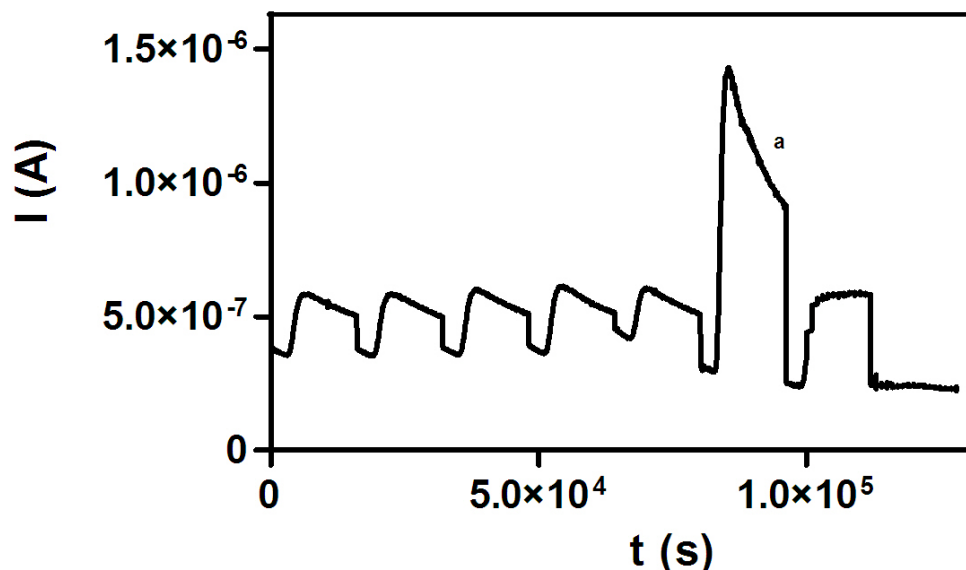
$$c: y = 4,908 \cdot 10^{-5} x + 4,221 \cdot 10^{-9}$$

Výběr vhodných podmínek pro měření vzorků piva

Pivo, jako mnoho dalších nápojů, obsahuje CO_2 , nebo je jím dokonce syceno. Přítomnost CO_2 zásadně ovlivňuje výsledky měření. Na povrchu MAB sondy dochází k vyloučení plynného CO_2 , což zapříčiňuje změnu v kinetice mikrodialýzy (zvýšení recovery). Jedním z možných řešení je odplynění vzorků. V našem případě byl negativní vliv oxidu uhličitého dostačujícím způsobem vyřešen zředěním jednotlivých vzorků piva zásobním roztokem PBS pufru (pH 7,4) v poměru 1:4. S takto zředěnými vzorky se pak dále pracovalo.

Na Obr. 21 je vidět typický amperometrický záznam analyzovaného vzorku piva značky Litovel classic ředěného PBS puftrem v poměru 1:4. U signálu koncentrovaného vzorku piva je názorně vidět inaktivace elektrody

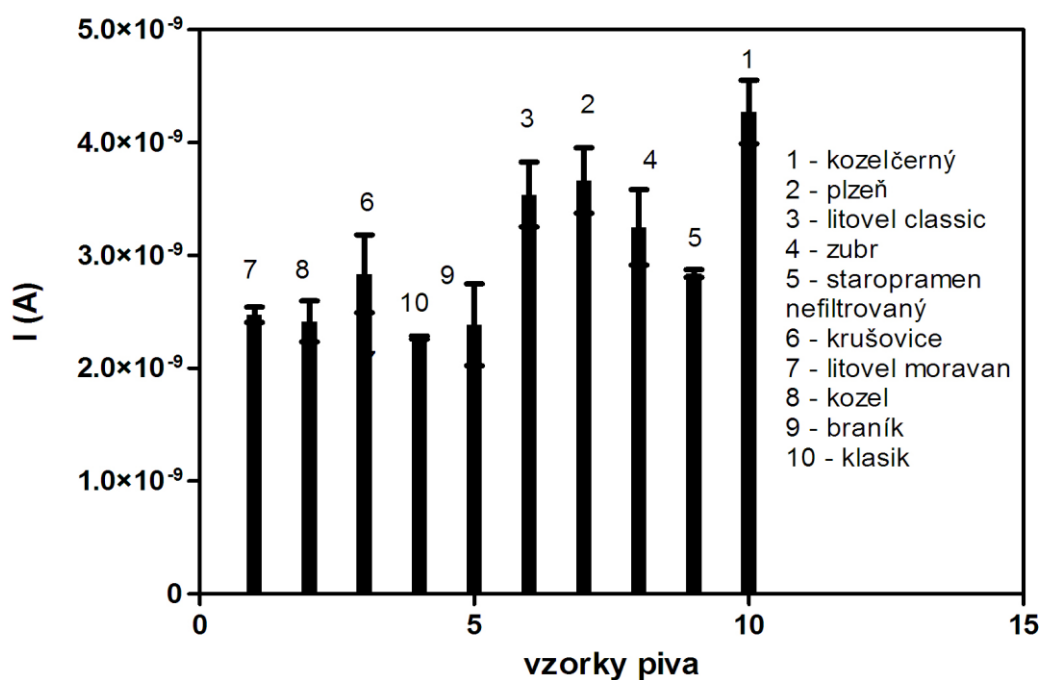
adsorpcí produktů elektrooxidace látek obsažených v pivu (pokles odezvy značený jako úsek a).



Obr. 21.: Amperometrický záznam (závislosti proudu na čase): pětkrát vzorek piva ředěný 1:4 PBS puforem, jeden signál koncentrovaného piva, jeden signál standardního roztoku kyseliny gallové o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a vzorek PBS pufru. Byly zachovány stejné měřicí podmínky, jako jsou popsány u Obr. 19.

Výsledky mikrodialýzy s amperometrickou detekcí u deseti zvolených druhů piva

Vzorky byly ředěny PBS puforem v poměru 1:4 a napipetovány do 350 μ l mikrotitračních jamiček, tak aby výšky hladin byly stejné. Vidíme, že nejvyšší proudové odezvy patří pivu značky kozel černý (cca $4,2 \times 10^{-9}$ A) a nejnižší proudové odezvy jsou přiřazeny pivu značky klasik (cca $2,3 \times 10^{-9}$ A) (viz. Obr. 22). U každého vzorku byly změřeny i dva standardy: kyselina gallová a katechin o koncentraci 0,0005 mol/l a poté byly odezvy jednotlivých vzorků piv přepočítány na ekvivalentní koncentrace těchto standardů (viz. Tab. 11).



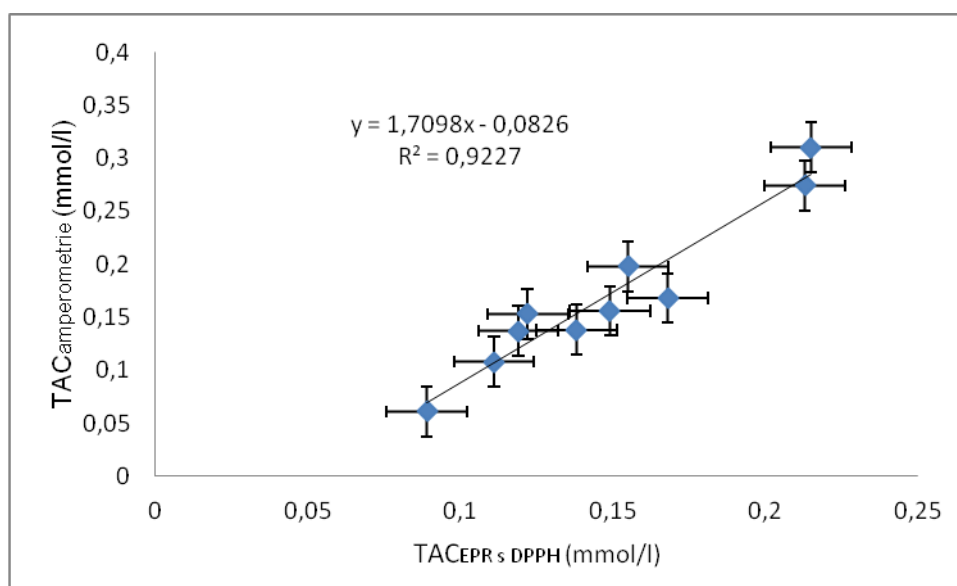
Obr. 22: Závislost proudové odezvy deseti vzorků piva ředěných PBS puřem v poměru 1:4 do 350 μ l mikrotitračních jamiček. Vzorky byly měřeny v tripletech. Byly zachovány stejné měřicí podmínky, jako jsou popsány u Obr. 19.

kyselina gallová (0,0005mmol/l)				katechin (0,0005mmol/l)			
TAC (mmol/l)				TAC (mmol/l)			pH
značka piva	800 mV	1000 mV	1400 mV	800 mV	1000 mV	1400 mV	-
kozel černý	0,215	0,558	0,555	0,103	0,528	0,364	4,7
plzeň	0,213	0,541	0,486	0,102	0,443	0,319	5
litovel classic	0,168	0,501	0,468	0,081	0,223	0,307	4,9
zubr	0,155	0,414	0,305	0,074	0,201	0,200	4,6
staropraven nefiltrovaný	0,149	0,352	0,274	0,071	0,200	0,179	4,5
krušovice	0,138	0,352	0,247	0,072	0,187	0,161	4,6
litovel moravan	0,122	0,239	0,140	0,058	0,152	0,137	4,5
kozel	0,119	0,200	0,108	0,057	0,131	0,101	4,7
braník	0,111	0,167	0,097	0,053	0,113	0,081	4,8
klasik	0,089	0,124	0,065	0,043	0,085	0,073	4,7

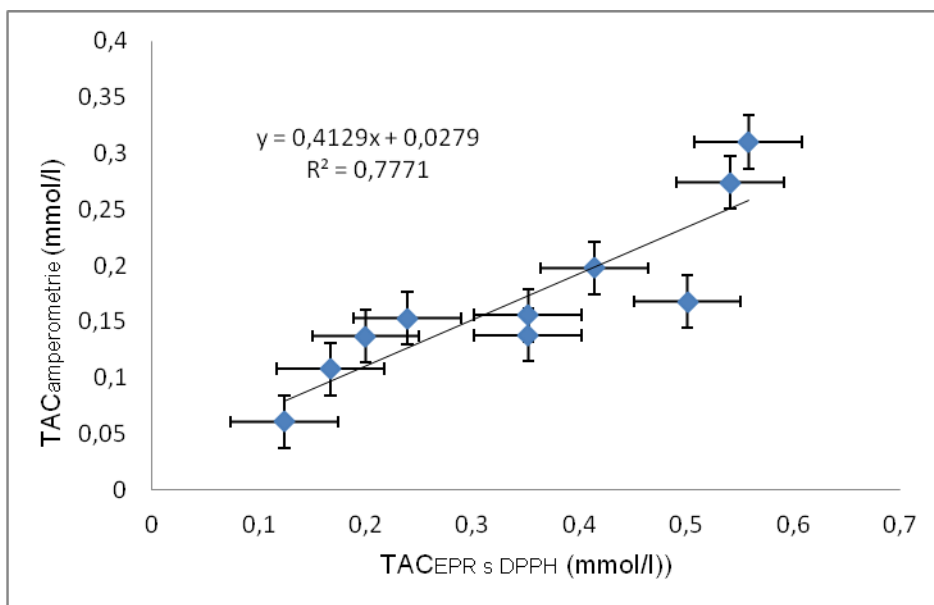
Tab. 11: Stanovení celkového množství snadno oxidovatelných látek v pivu mikrodialýzou ve spojení s amperometrickou detekcí. Výsledky vyjádřeny jako ekvivalentní koncentrace kyseliny gallové.

4.6. Porovnání mikrodialýzy s amperometrickou detekcí s EPR metodou s DPPH radikálem

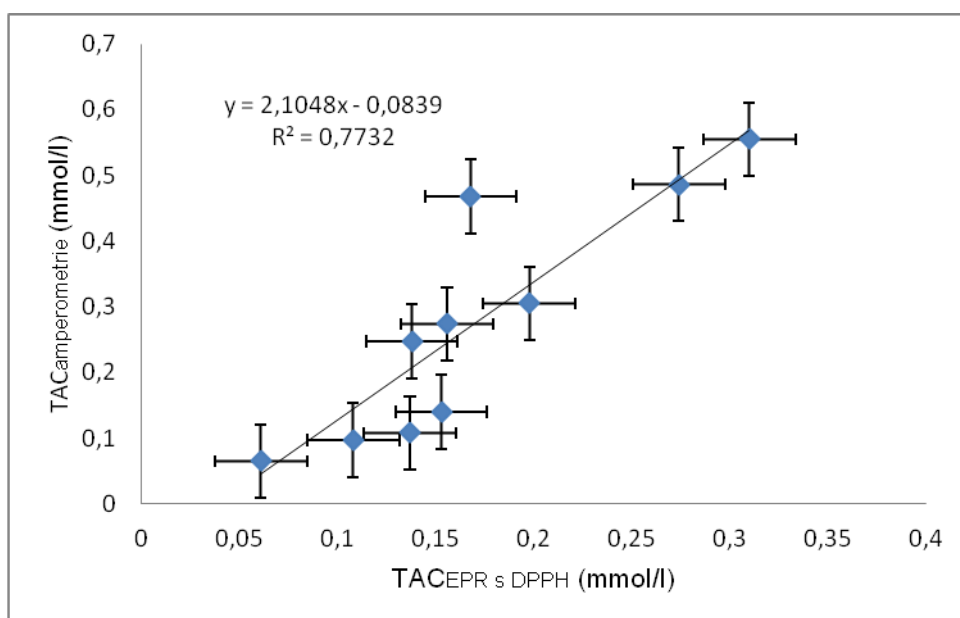
Pomocí korelační analýzy byly porovnány výsledky obsahu snadno oxidovatelných látek v pivu získané amperometrickou detekcí ve spojení s mikrodialýzou a metodou EPR s DPPH radikálem u deseti značek českých piv. Korelační grafy jsou uvedeny na Obr. 23, 24 a 25.



Obr 23.: Korelace mezi výsledky stanovení TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí mikrodialýzy ($TAC_{amperometri}$) při potenciálu 800 mV a TAC stejné sady piv získané metodou EPR s DPPH radikálem ($TAC_{EPR s DPPH}$), stanovené při pH 7,4 PBS pufru, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na litr piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná.



Obr. 24.: Korelace mezi TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí mikrodialýzy ($TAC_{amperometrie}$) při potenciálu 1000 mV a TAC stejné sady piv získané metodou EPR s DPPH radikálem ($TAC_{EPR s DPPH}$), stanovené při pH 7,4 PBS pufru, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na litr piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná

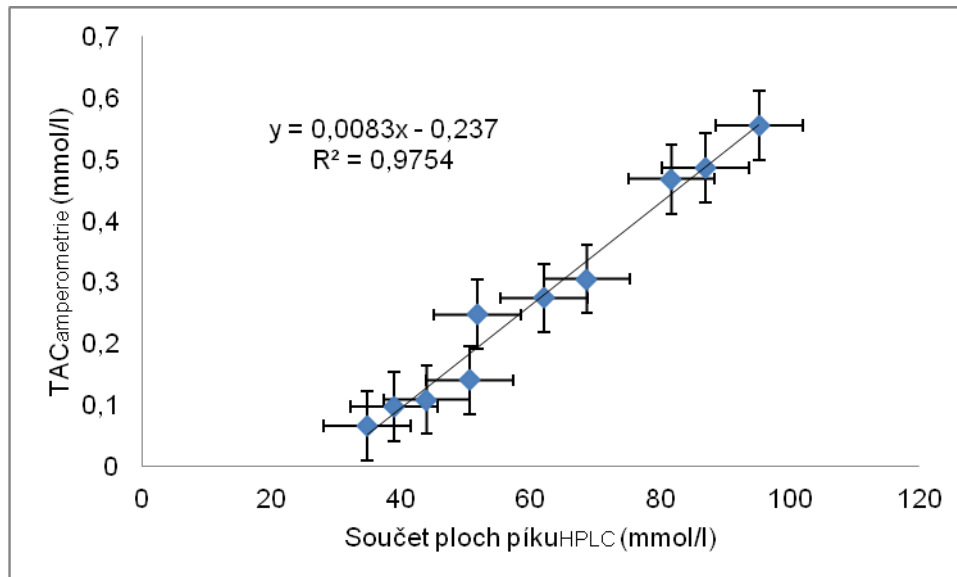


Obr. 25.: Korelace mezi výsledky TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí mikrodialýzy ($TAC_{amperometrie}$) při potenciálu 1400 mV a výsledky TAC stejné sady piv získané metodou EPR s DPPH radikálem ($TAC_{EPR s DPPH}$), stanovené při pH 7,4 PBS pufru, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na litr piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná

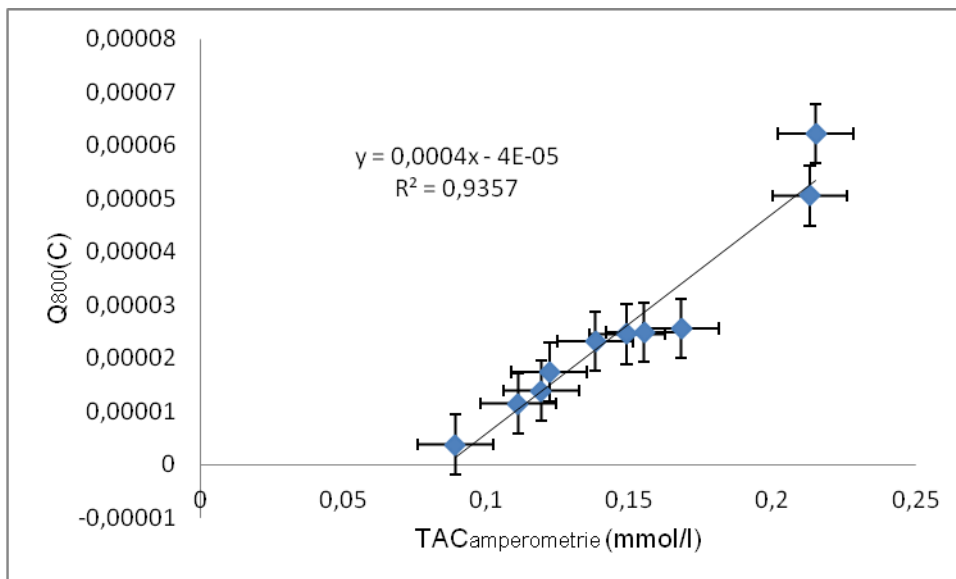
Z předchozích obrázků vyplývá, že TAC získaná mikrodialýzou s amperometrickou detekcí při zvoleném konstantním pracovním potenciálu 800 mV nejlépe koreluje s výsledky TAC získané metodou EPR s radikálem DPPH. Radikál DPPH patrně nereaguje s látkami, které se oxidují při vyšších pracovních potenciálech (1000 mV a 1400 mV).

4.7. Porovnání mikrodialýzy s amperometrickou detekcí s HPLC metodou s amperometrickou detekcí a s CV

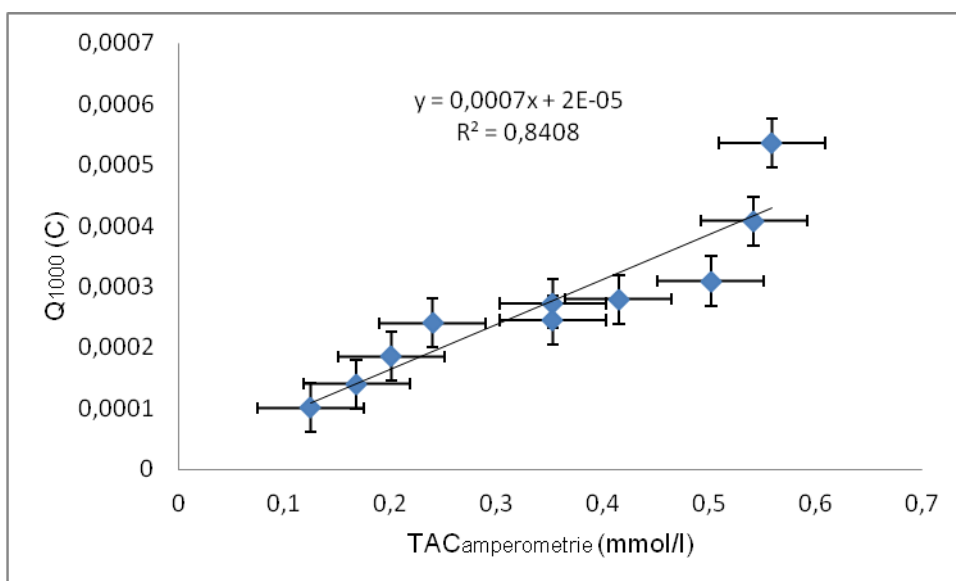
Na základě výsledků z dalších dvou metod: HPLC metoda s amperometrickou detekcí a CV, byly porovnány obsahy snadno oxidovatelných látek u deseti zmíněných značek českých piv. Korelační grafy jsou uvedeny na Obr. 26, 27, 28 a 29. Pro vyhodnocení HPLC měření byl použit součet ploch píků v příslušném chromatogramu.



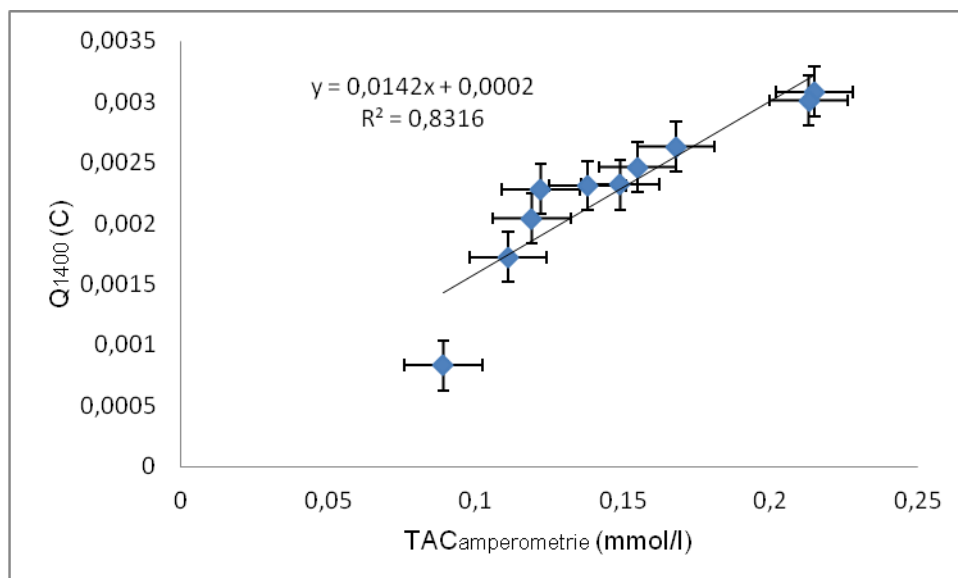
Obr. 26.: Korelace mezi výsledky TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí spojenou s mikrodialýzou ($TAC_{amperometrie}$) při konstantním pracovním potenciálu 1400 mV a výsledky součtu ploch píků příslušných chromatogramů stejné sady piv získané metodou HPLC ve spojení s amperometrickou detekcí při stejné pracovním potenciálu 1400 mV, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na litr piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná.



Obr. 27.: Korelace mezi výsledky stanovení TAC deseti piv CV metodou, vyhodnocenými jako Q_{800} ($Q_{800}(C)$) při konstantním pracovním potenciálu 800 mV a výsledky TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí spojenou s mikrodialýzou ($TAC_{amperometrie}$) při konstantním pracovním potenciálu 800 mV, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na liter piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná.



Obr. 28.: Korelace mezi výsledky stanovení TAC deseti piv CV metodou, vyhodnocenými jako Q_{1000} ($Q_{1000}(C)$) při konstantním pracovním potenciálu 1000 mV a výsledky TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí spojenou s mikrodialýzou ($TAC_{amperometrie}$) při konstantním pracovním potenciálu 1000 mV, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na liter piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná.



Obr. 29.: Korelace mezi výsledky stanovení TAC deseti piv CV metodou, vyhodnocenými jako Q_{1400} ($Q_{1400}(C)$) při konstantním pracovním potenciálu 1400 mV a výsledky TAC deseti piv získané amperometrickou detekcí spojenou s mikrodialýzou ($TAC_{amperometrie}$) při konstantním pracovním potenciálu 1400 mV, vyjádřené v mmol kyseliny gallové na litr piva. Korelace $\alpha = 0,05$ je významná.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout vhodnou elektrochemickou metodu pro stanovení obsahu snadno oxidovatelných látek a polyfenolů obsažených v pivu, která by se vyrovnala standardně používaným metodám. Touto navrhovanou metodou byla mikrodialýza kombinovaná s amperometrickou detekcí. Problém s inaktivací pracovní elektrody byl vyřešen zařazením speciálního regeneračního kroku (jednosekundový pretreatment). Po nalezení vhodných měřicích podmínek (ředění piva, volby mobilní fáze, nastavení průtoku mobilní fáze a hydratace MAB sondy), byla analyzována antioxidační kapacita u sady deseti vybraných českých piv různých značek. Výsledné hodnoty byly vztaženy ke standardním látkám: kyselině gallové a katechinu. Získané výsledky byly porovnány s dalšími čtyřmi metodami - EPR metoda s radikálem DPPH, průtoková coulometrie, cyklická voltametrie a HPLC metoda kombinovaná s amperometrickou detekcí.

Měření a výsledky antioxidační kapacity z mikrodialýzy ukázaly, že navrhovaná metoda je srovnatelně přesná a robustní, jako klasicky používaná metoda EPR s radikálem DPPH. Výhodou naší metody je potřeba malého množství analyzovaného vzorku. Ve srovnání s průtokovou coulometrií, kde na jedno měření přístroj spotřebuje 3 ml analyzovaného vzorku, na mikrodialýzu postačuje pouhých 350 μ l vzorku piva zředěného v poměru 1:4. Navrhovaný systém je sestaven a naprogramován tak, že je plně zautomatizován. Po nadávkování vzorků do mikrotitračních destiček je měření spuštěno a měří bez jakékoli obsluhy až do skončení analýzy.

Z výsledků cyklické voltametrie je zřejmé, že snadno oxidovatelné látky se vyskytují v oblasti potenciálu 800 mV. Tato hodnota byla zvolena jako stabilní pracovní potenciál při amperometrických měřeních.

Z korelačních křivek vyplývá, že námi navrhovaná mikrodialýza s amperometrickou detekcí velmi dobře koreluje s cyklickou voltametrií, HPLC metodou s amperometrickou detekcí i se standardně používanou metodou EPR s radikálem DPPH.

6. SUMMARY

Design of a suitable electrochemical method that could be applied to determine the total antioxidant capacity of beer was the main objective of this work. Through the proposed method was microdialysis combined with amperometric detection. The problem with inactivation of the working electrode was solved by the inclusion of special regeneration step (a one-second pretreatment). After finding a suitable measuring conditions (dilution of beer, choice of mobile phase, setting of the mobile phase flow and hydration of MAB probe), the antioxidant capacity of the selected set of ten different brands of Czech beer was analyzed. The resulting values were related to standard compounds: gallic acid and catechin. The results were compared with four other methods - EPR method with DPPH radical, flow coulometry, cyclic voltammetry and HPLC method combined with amperometric detection.

Measurements and results of microdialysis of antioxidant capacity showed that the proposed method is comparatively robust and accurate as conventional EPR method used with the radical DPPH. The advantage of our method is the need for a small amount of sample for the analysis. In comparison with the flow coulometry, where one measuring device consumes 3 ml of the sample, the microdialysis uses only 350 μ l sample of beer diluted in proportion 1:4. The proposed system is constructed and programmed so that it is fully automated. After dispensing samples into microplates, measurement is started and goes on without any operation needed until the end of analysis.

The results measured by cyclic voltammetry show, that easily oxidizable substances are present in the potential of 800 mV and this value was selected as the stable working potential of the amperometric measurements.

The results of the correlations show that the proposed microdialysis with amperometric detection correlates very well with the standardly used method used EPR with DPPH radical, as well as with cyclic voltammetry and with HPLC method with amperometric detection.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APPH - 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid

ASV - Anodic stripping voltammetry,

CE - Capillary electrophoresis, *kapilární elektroforéza*

CE-LED - Capillary Electrophoresis-Light Emitting Diode;

CILE - Carbon ionic liquid electrode

CV - Cyclic voltammetry, *cyklická voltametrie*

CPE - Carbon paste electrode

CZE-DAD - Capillary zone electrophoresis - diode-array detection

DAD - Diode array detector,

DMSO - Dimethylsulfoxide

DPV - Differential pulse voltammetry, *diferenční pulsní voltametrie*

DPPH - [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl]

EBC - European Brewery Couvention

ECD - Electrochemical detector;

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová

ESR - Electron spin resonance; *elektronová spinová resonance*

ESI⁺-MS/MS - Electrospray ionization-tandem mass spectrometry

EPR - Electron paramagnetic resonance; *elektronová paramagnetická resonance*

ETA-AAS - Electrothermal atomization - Atomic Absorption Spetrometry; *elektrotermická atomizace v v atomové absorpční spektrometrii*

FA-AAS - Flame Atomization - Atomic Absorption Spectrometry; *plamenová atomizace v atomové absorpční spektrometrii*

FRAP - Fluorescence recovery after photobleaching,

FT-IR - Fourier transform-infrared

GC - Gas chromatography; *plynová chromatografie*

GCE - Glassy carbon electrode

GDME - Gas-Diffusion Microextraction;

HPLC - High Performance Liquid Chromatography; *vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

HS-GC - Static headspace gas chromatography;

ICP-AES - Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry; *indukčně vázané plasma v atomové emisní spektrometrii*

IR - Infrared light; *infračervené záření*

LC - Liquid chromatography ; *kapalinová chromatografie*

MS - Mass spectroscopy; *hmotnostní spektroskopie*

MEKC - Micellar Electrokinetic Chromatography;

MWNTs - Multi-walled carbon nanotube

MWCNT/GCE - Carbon nanotube modified electrode/glass carbon electrode;

NMR - Nuclear magnetic resonance; *nukleární magnetická resonance*

NMR-MVA/MVA - Nuclear magnetic resonance - tandem multivariate analysis

ORAC - Oxygen-radical absorbing capacity

PCPE - Plain (unmodified) carbon paste electrode;

PDA - Photo Diode Array

PCE - plastic carbon electrode

PSA - anodic stripping potentiometric

RP-HPLC - Reverse-phase high-performance liquid chromatography

ROS - Reactive oxygen species,

SBSE-LD - Stir bar sorptive-liquid desorption;

SCE - Saturated calomel electrode

SF - Stationary phase; *stacionární fáze*

SWV - Square wave stripping voltammetry;

TAC - Total antioxidant capacity

TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant capacity

TLC - Thin layer chromatography;

UV - Ultraviolet light; *ultrafialové záření*

ZE + PMMA - Zone electrophoresis + poly(methylmethacrylate)

2D J-NMR - two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance

8. POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ Eßlinger H. M., Narziß L.: *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*, str. 1-47, Freiberg/ Sachsen (2009).
- ² Safavi A., Maleki N., Ershadifar H., Tajabadi F.: *Anal. Chim.* 674, 176-181 (2010).
- ³ Sawyer D. T., McCreery R. L.: *Inorg. Chem.* 11, 779-782 (1972).
- ⁴ Teixeira M. F. S., Marino G., Dockal E. R., Cavalheiro E. T. G.: *Anal. Chim. Acta.* 508, 79-85 (2004).
- ⁵ Vaze D. V., Srivastava A. K.: *Electrochim. Acta* 53, 1713-1721 (2007).
- ⁶ Wei S., Zhao F., Xu Z., Zeng B.: *Microchim. Acta* 152, 285-290 (2006).
- ⁷ Jiang X-li., Li R., Li J., He X.: *Russ. J. Electrochem.* 5, 772-777 (2009).
- ⁸ Halliwell B.: *Free Radic. Res.* 9, 1- 32 (1990).
- ⁹ Hrbáč J.: Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007.
- ¹⁰ Nádaský P., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 104, 838-845 (2010).
- ¹¹ Hofta P., Dostálek P., Basařová G.: *Chem. Listy* 98, 825-830 (2004).
- ¹² Škeříková V., Grynová L., Jandera P.: *Chem. Listy* 98, 343-348 (2004).
- ¹³ Simić A., Manojlović D., Šegan D., Todorović M.: *Molecules* 12, 2327-2340 (2007).
- ¹⁴ Abel-Hamid R., Newair E. F.: *J. Electroanal. Chem.* 657, 107-112 (2011).
- ¹⁵ Luo L., Wang X., Li Q., Ding Y., Jia J., Deng D.: *Anal. Sci.* 26, 907-911 (2010).
- ¹⁶ Čepička J., Karabín M.: *Chem. Listy* 96, 90-95 (2002).
- ¹⁷ Yang L-J., Tang Ch., Xiong H-Y., Zhang X-H., Wang S-F.: *Bioelectrochemistry* 75, 158-162 (2009).
- ¹⁸ Zettersten C., Co M., Wende S., Turner Ch., Leif N., Sjoberg P.: *Anal. Chem.* 81, 8968 - 8977 (2009).

- ¹⁹ Novak I., Šeruga M., Komovsky-Lovrić Š.: *J. Electroanal. Chem.* 631, 71 - 75 (2009).
- ²⁰ Brett A. M. O., Ghica M-E.: *Electroanalysis* 15, 1745-1750 (2003).
- ²¹ Yang B., Arai K., Kusu F.: *Anal. Sci.* 17, 987 - 989 (2001).
- ²² Xiao P., Zhao F., Zeng B.: *Microchem. J.* 85, 244 - 249 (2007).
- ²³ Chen G., Ma X., Meng F., Li G.: *Biochemistry* 72, 169 - 173 (2008).
- ²⁴ <http://czhops.cz/index.php/cs/hop-polyphenols>, staženo 17. 11. 2011.
- ²⁵ Karabín M., Brányik T., Kruliš R., Dvořáková M., Dostálek P.: *Chem. Listy* 103, 721-728 (2009).
- ²⁶ Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: *Chem. Listy* 100, 184-189 (2006).
- ²⁷ Ou B. X., Huang D. J., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 3122 (2002).
- ²⁸ Ou B. X., Hampsch-Woodill M., Prior R. L.: *J. Agric. Food. Chem.* 49, 4619 (2001).
- ²⁹ Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174-179 (2004).
- ³⁰ Bishy R. H., Brooke R., Navaratnam S.: *Food Chem.* 108, 1002-1007 (2008).
- ³¹ Fidler M., Kolářová L.: *Chem. Listy* 103, 232-235 (2009).
- ³² Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Yumrutas, O., Sokmen, A.: *Food Chem.* 98, 9-13 (2006).
- ³³ Marinova G., Batchvarov V.: *Bulg. J. Agric. Sci.* 17, 11-24 (2011).
- ³⁴ Mikyška A., Krofta, K.: Projekt 1B44061-Ročníková zpráva, Výzkumný ústav pivovarský a skladařský, a.s., (2004).
- ³⁵ Kilmartin P. A.: *Antioxid. Redox Signal.*, 3, 941 (2001).
- ³⁶ Abdulin I. F., Turova E. N., Ziyatdinova G. K., Budnikov G. K.: *J. Anal. Chem.* 57, 30 (2002).
- ³⁷ Abdullin I. F., Budnikov G. K.: *Zavod. Lab.*, 64, 1 (1998).
- ³⁸ Tian J.: *J. Food Compos. Anal.* 23, 475-479 (2010).

- ³⁹ Khatib A., Wilson G. E., Kim K. H., Lefeber A. W. M., Erkelens C., Choi Y. H., Verpoorte R.: *Anal. Chim. Acta* 559, 264-270 (2006).
- ⁴⁰ Cortacero-Ramirez S., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Romero-Romero M. L., Fernández-Gutiérrez A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 831-837 (2004).
- ⁴¹ Erny G. L., Rodrigues J. E. A., Gil A. M., Barros A. S., Esteves V. I.: *Chromatographia* 70, 1737-1742 (2009).
- ⁴² Su A-K., Chang Y-S., Lin Ch-H.: *Talanta* 64, 970-974 (2004).
- ⁴³ Bernal J., García-Maurino C. M., Reglero G., Marina R. F., Ibanez E.: *Food Anal. Met.* 4, 416 - 423 (2011).
- ⁴⁴ Floridi S., Montanari L., Marconi O., Fantozzi P.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1548-1554 (2003).
- ⁴⁵ Callemien D., Guyot S., Collin S.: *Food Chem.* 110, 1012-1018 (2008).
- ⁴⁶ Goncalves L. M., Magalhaes P. J., Valente I. M., Pacheco J. G., Dostálek P., Sýkora D., Rodrigues J. A., Barros A. A.: *J. Chromatogr. A* 1217, 3717-3722 (2010).
- ⁴⁷ Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L.: *J. Chromatogr. A* 832, 97-107 (1999).
- ⁴⁸ Bellido-Milla D., Onate-Jean A., Palacios-Santander M. J., Palacios-Tejero D., Hernandez-Artiga. P.: *Microchim. Acta* 144, 183-190 (2004).
- ⁴⁹ Llobat-Estelles M., Mauri-Aucejo A. R., Marin-Seaz R.: *Talanta* 68, 1640-1647 (2006).
- ⁵⁰ Almeida P. J., Rodrigues A. A., Guido L. F., Santos J. R., Barros A. A., Fogg A. G.: *Electroanalysis* 15, 5-6 (2003).
- ⁵¹ Sikorska E., Gorecki T., Khmelinskii I. V., Sikorski M., Keukeleire De D.: *Food Chem.* 96, 632-639 (2006).
- ⁵² Sancho D., Blanco C. A., Caballero I., Pascual A.: *J. Sci. Food Agric* 91, 1142-1147 (2011).
- ⁵³ Cunha S. C., Barrado A. I., Faria M. A, Fernandes J. O.: *J. Food Compos. Anal.* 24, 609-614 (2011).

- ⁵⁴ Marova I., Parilova K., Friedl Z., Obruca S., Duronova K.: *Chromatographia* 73, 83-95 (2011).
- ⁵⁵ Engelhard S., Kumke M. U., Lohmannsroben H-G.: *Anal Bioana. I Chem.* 384, 1107-1112 (2006).
- ⁵⁶ Gorinstein S., Caspi A., Pawelzik E., Deldago-Licon E., Libman I., Trakhtenberg S., Weisz M., Martin-Belloso O.: *Nutr. Res.* 21, 1159-1169 (2001).
- ⁵⁷ Gorinstein S., Zemser M., Vargas-Albores F., Ochoa J-L., Paredes-Lopez O., Scheler Ch., Salnikow J., Martin-Belloso O., Trakhtenberg S.: *Food Chem.* 67, 71-78 (1999).
- ⁵⁸ Belajová E., Rauová D., Daško L.: *Eur. Food Res. Technol.* 224, 301-308 (2007).
- ⁵⁹ Villiers De A., Vanhoanacker G., Lynen F., Sandra P.: *Electrophoresis* 25, 664-669 (2004).
- ⁶⁰ Sikorska E., Gliszczynska-Swigio A., Insinska-Rak M., Khmelinskii I., Keukeleire De D., Sikorski M.: *Anal. Chim. Acta.* 613, 207-217 (2008).
- ⁶¹ Masár M., Žúborová M., Kaniansky D., Stanislawski B.: *J. Sep. Sci.* 26, 647-652 (2003).
- ⁶² Müller M.: *Br. Med. J.* 324, 588-591 (2002).
- ⁶³ Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, 106-108, Karolinum Praha (2010).
- ⁶⁴ Kellner V., Čejka P., Marinova G., Bačvarov V., Jurková M., Čulík J., Horák T., Dvořák J., Hašková D.: *Kvasny Prum.* 56, 234-238 (2010).
- ⁶⁵ Achilli G., Cellerino G. P., Gamace P. H.: *J. Chromatogr.* 632, 111-117 (1993).
- ⁶⁶ Jakubec P, Banciřová M., Halouzka V., Lojek A., Ciz M., Denev P., Cibicek N., Vacek J, Vostalova J., Ulrichová J., Hrbáč J.: *J. Agric. Food Chem.* 60, 7836-7843 (2012).
- ⁶⁷ Katalinic V.; Milos M.; Modun D.; Music I.; Boban M.: *Food Chem.* 2004, 86, 593 – 600.

- ⁶⁸ Halouzka V, Hrbac J., Jirovsky D., Riman D., Jakubec P., Bartosova Z., Masek V., Mojzes V., Vacek J.: *Curr. Anal. Chem.* 9, 305-311, (2013).
- ⁶⁹ Kilmartin P. A.; Zou H.; Waterhouse A. L.: *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1957 – 1965.
- ⁷⁰ Enache T. A., Chiorcea-Paquim A. M., Fatibello-Filho O., Oliveira-Brett A. M.: *Electrochem. Commun* 11, 1342 - 1345 (2009).