

## VYUŽITÍ COULOMETRICKÉHO DETEKTORU COULARRAY PRO ANALÝZU PŘÍRODNÍCH ANTIOXIDANTŮ

VERONIKA ŠKEŘIKOVÁ\*, LUCIE GRYNOVÁ  
a PAVEL JANDERA

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice*

*Veronika.Skerikova@seznam.cz*

Došlo 30.5. 2003, přepracováno 13.1.04, přijato 27.1.04.

Klíčová slova: přírodní antioxidanty, CoulArray detektor, kapalinová chromatografie, elektrochemická detekce, pivo

### Úvod

#### Přírodní antioxidanty

Přírodní antioxidanty tvoří velmi rozmanitou skupinu látek. Do této velké skupiny patří i fenolické látky a flavonoidy. Vyskytují se ve všech částech rostlin, kořeny počinaje a plody konče<sup>1</sup>. Tyto látky ovlivňují charakteristické vlastnosti, barvu, vůni a chuť. Při zpracování rostlin se tyto látky mohou dostávat do potravin. Můžeme je tedy nalézt v dřevních, čajích, šťávách, džusech, ale i v pivu a vínu. Velmi významný je vliv přírodních antioxidantů na lidské zdraví, který je dán schopností antioxidantů eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Antioxidanty inhibují oxidaci lipidů tím, že reagují s hydroperoxidovým volným radikálem na málo reaktivní hydroperoxid a přerušují tak řetězovou radikálovou reakci<sup>2</sup>. Tyto látky příznivě ovlivňují i procesy regulace tlaku krve a hladiny glukosy v krvi a mají i vlastnosti protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé<sup>3</sup>.

Předkládaná práce je zaměřena hlavně na fenolické látky a flavonoidy. Tyto látky lze rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou deriváty kyseliny benzoové (kyselina gallová, kyselina protokatechuová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilová, kyselina syringová), druhou skupinou jsou deriváty kyseliny skořicové (kyselina kávová, kyselina kumarová, kyselina ferulová, kyselina sinapová) a třetí skupinu tvoří monomery flavanu ((+)-katechin, (-)-epikatechin). Sledovány jsou i některé další látky, například vanilin, kyselina salicylová, rutin, kvercetin, kyselina 4-hydroxyfenyloctová a kyselina chlorogenová.

\* Veronika Škeříková získala 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Pardubicích 28. 1. 2003.

Analýza těchto látek se provádí vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s coulometrickou detekcí, což je v současné době jedna z nejcitlivějších metod pro stanovení těchto látek<sup>4-9</sup>. K separaci se využívá systému obrácených fází, kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární rozpouštědlo. Vodivost mobilní fáze se zvyšuje přidávkou soli.

#### CoulArray detektor

Při coulometrické detekci dochází na průtočných elektrodách z pórovitého grafitu teoreticky ke 100 % přeměně elektroaktivní látky. Signál detektoru je stabilní i tehdy, když je téměř 95 % povrchu elektrody deaktivováno reakčními produkty. Při kvantitativním průběhu reakce lze k odhadu plochy piku použít Faradayova zákona. V současné době se stále více používá CoulArray detektor<sup>4</sup> s 8–32 sériově zapojenými průtočnými celami. Na celý jsou vloženy rozdílné potenciály a každá cela poskytuje samostatný signál. Cela detektoru obsahuje tři elektrody. Pracovní elektroda je zpravidla vyrobena z pórovitého grafitu. Referenční elektroda je hydrogenpaladiová. Pomocná elektroda je uhlíková<sup>10</sup>.

Velkou výhodou CoulArray detektoru je jeho citlivost, selektivita, možnost práce s gradientovou elucí a využití poměru signálů z cel s různými vloženými potenciály k identifikaci látek. Při jeho použití často není třeba izolovat látky z kapalných matric, například nápojů, což je činnost velmi pracná a časově náročná<sup>11,12</sup>. Meze detekce CoulArray detektoru se pohybují řádově až v  $\text{mg.l}^{-1}$  v závislosti na typu sledované elektroaktivní látky.

### Experimentální část

#### Přístrojové vybavení a chemikálie

Analýza byla prováděna na koloně Zorbax SB C18 –  $2,1 \times 150$  mm s částicemi  $5 \mu\text{m}$ . Mobilní fáze byla čerpána pumpami ESA model 582 a Shimadzu LC-10AD PV. Objem dávkovací smyčky byl  $20 \mu\text{l}$ . Detekce byla prováděna na CoulArray detektoru, model 5600A (ESA, Chelmsford, USA) s osmi elektrochemickými celami.

Acetonitril (LiChrosolv Gradient grade, Merck), octan amonný (p.a., Lachema Brno), 98% mravenčí kyselina (p.a., Lachema Brno), kyselina gallová (kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová, VÚPS, Praha), kyselina protokatechuová (kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, VÚPS, Praha), kyselina 4-hydroxyfenyloctová (Aldrich), kyselina *p*-hydroxybenzoová (kyselina 4-hydroxybenzoová, VÚPS, Praha), kyselina vanilová (kyselina 4-hydroxy-3-methoxybenzoová, Fluka), (+)-katechin (trans-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan, Fluka), kyselina kávová (kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propenová, VÚPS, Praha), kyselina chlo-

rogenová (kyselina 3-*O*-(3-(3,4-dihydroxyfenyl)propenoyl)-*D*-quinová, Fluka), kyselina syringová (kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoová, VÚPS, Praha), kyselina salicylová (kyselina 2-hydroxybenzoová, VÚPS, Praha), vanilin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, VÚPS, Praha), kyselina *p*-kumarová (kyselina trans-3-(4-hydroxyfenyl)propenová, VÚPS, Praha), (-)-epikatechin (cis-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan, Fluka), kyselina ferulová (kyselina 3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)propenová, VÚPS, Praha), kyselina sinapová (kyselina 3-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyfenyl)propenová, VÚPS, Praha), rutin trihydrát (Kvercetin-3-rutinosid, Fluka).

#### Seznam vzorků

Byly analyzovány následující druhy zahraničních piv: Heineken, Heineken Brauwerijen B.V., Amstřdam; Stella Artois, Interbrew Belgium, Brussel, Belgie; Amstel, Heineken a.s., Slovensko; Radeberger Pilsner; BIT burger Premium Pils, Bitburger Privatbrauerei Th. Simon GmbH, Bitburg/Eifel; Kronenbourg 1664, Brasseries Kronenbourg, Strasbourg, Francie; BUD Budweiser, Bivra Peroni Ind. Roma, Itálie; Paulaner Premium Pils, Brauerei, Mnichov, Německo; Zipfer – original, premium, Brauerei Zipf, Rakousko; Tuborg – premium, Copenhagen, Dánsko; Veltins, Brauerei C and A Veltins GmbH and Co; Warsteiner – premium, verum, Warsteiner Brauerei Haus, Warstein, Německo; Löwenbräu – premium, Löwenbräu A.G., Mnichov, Německo.

Dále byly analyzovány tyto druhy českých piv: Budweiser Bürgerbräu, Budějovický městský pivovar a.s.; Bohemia Regent – světlý ležák premium, pivovar Regent, Třeboň; Pilsner Urquell, pivovar Plzeň; Ostravar original premium, Pražské pivovary a.s., Praha; Bernard, Rodinný pivovar Bernard a.s., Humpolec; Samson – premium, Budějovický městský pivovar; Březňák, pivovar Vyškov; Gambrinus – premium, pivovar Pilsner, Plzeň; Herold, pivovar Herold, Březnice; Platan jedenáct, Městský pivovar Platan, Protivín; Platan Premium, Městský pivovar Platan, Protivín; Hostan Premium, pivovar Hostan, Znojmo; Zubr premium, Pivovar Přerov; Litovel premium, Pivovar Litovel a.s., Litovel; Staropramen Ležák, Pražské pivovary a.s., Praha; Krušovice Imperial, Královský pivovar Krušovice; Radegast premium, Pivovar Radegast a.s., Nošovice; Prezident Chodovar, Rodinný pivovar v Chodové Plané; Starobrno, Pivovar Starobrno, Brno.

#### Pracovní podmínky

Pro analýzu látek metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi byla použita gradientová eluce dvousložkovou mobilní fází. Složkou A byl 5 mM octan amonný o pH 3,15 s 3 % acetonitrilu. Složkou B byl 5 mM octan amonný o pH 3,15 s 50 % acetonitrilu. Hodnota pH byla upravena přidávkem mravenčí kyseliny. Optimalizovaný gradient: 100 % A 0–30 min, 4 % B 30–35 min, 10–14 % B 35–50 min, 14–30 % B

50–65 min, 50 % B 65–75 min, 60 % B 75–85 min. Průtok mobilní fáze byl 0,23 ml.min<sup>-1</sup>. Na celý bylo vloženo napětí 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 a 900 mV. Kolona i detektor byly temperovány na 36 °C.

#### Příprava standardních roztoků a kalibračních roztoků

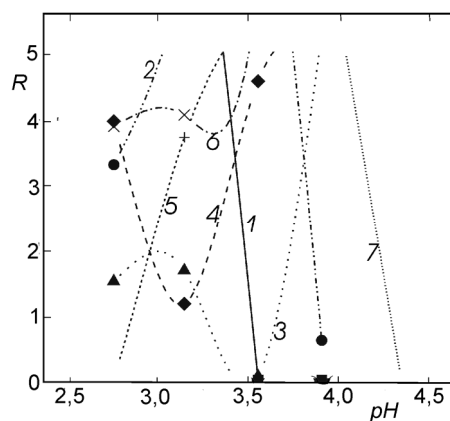
Byl připraven zásobní roztok směsi standardů o koncentraci 1 mg.l<sup>-1</sup> zředěním vodných roztoků jednotlivých standardů o koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup>. Postupným ředěním této směsi byly připraveny roztoky kalibrační řady v rozmezí koncentrací 1.10<sup>-3</sup>–1 mg.l<sup>-1</sup>. Všechny kalibrační roztoky byly doplňovány v odměrné baňce po rysku mobilní fází A (5 mM octan amonný s 3 % acetonitrilu) a filtrovány přes filtr s póry 0,2 μm. Roztoky byly uchovávány v lednici.

#### Úprava vzorku

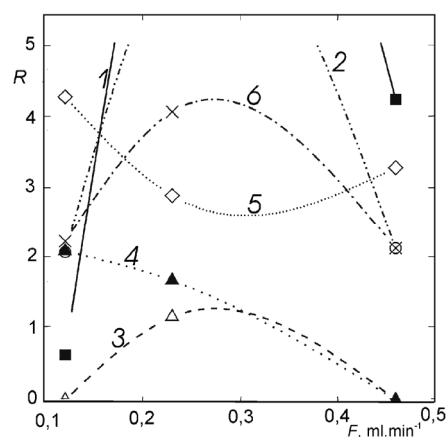
Úprava vzorku k analýze byla velmi jednoduchá. Vzorek byl odvdzdušněn na ultrazvukové lázni a zředěn mobilní fází A v poměru 1 : 4. Před analýzou byl zfiltrován přes filtr s póry 0,2 μm pro odstranění tuhých částic.

#### Výsledky a diskuse

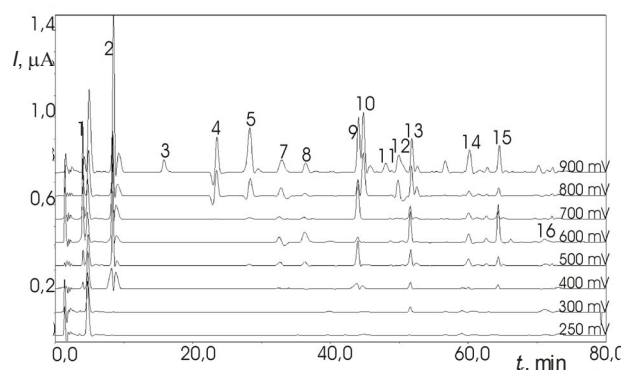
Analýza přírodních antioxydantů byla prováděna vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi ve spojení s CoulArray detektorem. Nejprve bylo optimalizováno pH a průtok mobilní fáze. Z experimentálních retenčních dat v mobilních fázích s pH



Obr. 1. Závislost rozlišení na pH mobilní fáze. Mobilní fáze A: 5 mM octan amonný + 5% acetonitril, mobilní fáze B: 5 mM octan amonný + 50% acetonitril, gradient: 100% A 0–25 min, 0–55% B 25–70 min, pro dvojice látek se sousedními píky: 1 ■ kyselina 4-hydroxyfenyloctová/ kyselina *p*-hydroxybenzoová, 2 ● kyselina kávová/ kyselina 4-hydroxyfenyloctová, 3 ▲ kyselina vanilová/ kyselina kávová, 4 ♦ katechin/ kyselina vanilová, 5 + kyselina chlorogenová/ katechin, 6 × epikatechin/ kyselina kumarová, 7 □ kyselina sinapová/ kyselina ferulová



Obr. 2. Závislost rozlišení  $R$  na průtoku mobilní fáze  $F$ . Mobilní fáze A: 5 mM octan amonný + 5% acetonitril, mobilní fáze B: 5 mM octan amonný + 50% acetonitril, pro dvojice látek se sousedními píky: 1 ■ kyselina 4-hydroxyfenyloctová/ kyselina  $p$ -hydroxybenzoová, 2 ○ katechin/ kyselina 4-hydroxyfenyloctová, 3 Δ kyselina kávová/ katechin, 4 ▲ kyselina vanilová/ kyselina kávová, 5 ◇ kyselina chlorogenová/ kyselina vanilová, 6 × epikatechin/ kyselina kumarová



Obr. 3. Chromatogram směsi standardních látek o koncentraci  $0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ . Mobilní fáze A: 5 mM octan amonný + 5% acetonitril, mobilní fáze B: 5 mM octan amonný + 50% acetonitril, gradient: podmínky gradientu viz experimentální část, 1 kyselina gallová, 2 kyselina protokatechuová, 3 kyselina  $p$ -hydroxybenzoová, 4 kyselina 4-hydroxyfenyloctová, 5 kyselina vanilová, 7 katechin, 8 kyselina chlorogenová, 9 kyselina syringová, 10 vanilin, 11 kyselina salicylová, 12 kyselina kumarová, 13 epikatechin, 14 kyselina ferulová, 15 kyselina sinapová, 16 rutin,  $I$  odezva,  $t_r$  retenční čas

Tabulka I

Parametry kalibračních závislostí jednotlivých látek, odhad směrodatné odchylky měření, vztažený na průměrnou koncentraci látek, vypočtený z paralelních měření 10 vzorků

Látka	$q^a$ [mC]	$k^b$ [ $\text{mg.l}^{-1}.\text{mC}^{-1}$ ]	k.k. <sup>c</sup>	$s_x^d$ [%]
Kyselina gallová	$0,269 \pm 0,252$	$22,39 \pm 5,37 \cdot 10^{-2}$	0,9988	1,407
Kyselina protokatechuová	$0,108 \pm 0,13$	$25,77 \pm 0,259$	0,9998	1,813
PHBA	$-0,109 \pm 0,202$	$6,30 \pm 0,618$	0,9952	1,442
4HPAC	$3,05 \cdot 10^{-2} \pm 0,152$	$19,14 \pm 0,599$	0,9985	1,459
Kyselina vanilová	$-0,420 \pm 0,269$	$22,11 \pm 0,535$	0,9991	1,356
Katechin	$-5,50 \cdot 10^{-2} \pm 0,123$	$10,77 \pm 0,219$	0,9996	1,429
Kyselina kávová	$-6,46 \cdot 10^{-3} \pm 0,112$	$18,67 \pm 0,239$	0,9997	1,600
Kyselina chlorogenová	$-0,665 \pm 0,355$	$13,84 \pm 0,619$	0,998	1,358
Kyselina syringová	$3,24 \cdot 10^{-2} \pm 0,312$	$15,61 \pm 0,607$	0,9977	1,226
Vanilin	$0,104 \pm 0,189$	$16,69 \pm 0,330$	0,9996	1,656
Kyselina salicylová	$-0,141 \pm 7,79 \cdot 10^{-2}$	$6,27 \pm 0,273$	0,9981	1,517
Kyselina kumarová	$-0,433 \pm 8,63 \cdot 10^{-2}$	$13,30 \pm 0,167$	0,9998	1,810
Epikatechin	$-0,311 \pm 0,225$	$14,17 \pm 0,438$	0,9986	1,699
Kyselina ferulová	$-0,388 \pm 0,111$	$10,60 \pm 0,199$	0,9997	1,771
Kyselina sinapová	$-0,108 \pm 0,268$	$16,95 \pm 0,521$	0,9986	1,650
Rutin	$-0,157 \pm 6,60 \cdot 10^{-2}$	$3,43 \pm 0,128$	0,9979	1,676

<sup>a</sup> Úsek, <sup>b</sup> směrnice, <sup>c</sup> korelační koeficient kalibrační přímky z lineární regrese, <sup>d</sup> odhad směrodatné odchylky měření v koncentrační oblasti  $0,5\text{--}1 \text{ mg.l}^{-1}$

## Tabulka II

Meze detekce porovnávaných detektorů.

Kolona Zorbax SB C18 – 2,1 × 150 mm, mobilní fáze: 5 mM octan amonný + 15 % acetonitrilu

Látka	CoulArray [mg.l <sup>-1</sup> ]	COULOCHEM II [mg.l <sup>-1</sup> ]	Fluorescenční det. [mg.l <sup>-1</sup> ]
Gallová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	10
Protokatechuová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-3</sup>	– <sup>a</sup>
<i>p</i> -Hydroxybenzoová kyselina	5.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
4-Hydroxyfenyloctová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Katechin	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	10
Vanilová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	10
Chlorogenová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Káвовá kyselina	5.10 <sup>-2</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Syringová kyselina	5.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	10
Vanilin	5.10 <sup>-3</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	1
Kumarová kyselina	5.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Epikatechin	5.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Salicylová kyselina	1.10 <sup>-2</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	– <sup>a</sup>
Rutin	1.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-2</sup>	10
Sinapová kyselina	1.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-2</sup>	25
Ferulová kyselina	1.10 <sup>-2</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	– <sup>a</sup>

<sup>a</sup> látka nefluoreskuje2,74, 3,14, 3,55, 3,91 a 4,35 bylo vypočteno rozlišení *R* (bezrozměrné), podle rovnice:

$$R = \Delta V_r / \bar{w} \quad (1)$$

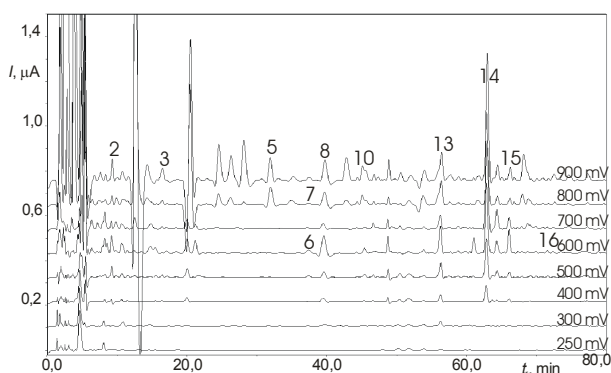
kde  $\Delta V_r$  je rozdíl retenčních objemů dvou sousedních látek a  $w$  je šířka píku v základně (v objemových jednotkách). Hodnoty *R* byly pro jednotlivé látky ve směsi vyneseny do grafu v závislosti na pH mobilní fáze (obr. 1). Z oblasti vymezené křivkami na obr. 1 lze odečíst rozsah pH umožňující dosáhnout požadovaného rozlišení (např. *R*=1) pro dvojice látek, jejichž separace činí problémy. Jako optimální bylo zvoleno pH 3, při němž bylo dosaženo nejvyššího rozlišení testovaných standardních látek. Při tomto pH byl optimalizován průtok mobilní fáze v rozmezí 0,12–0,46 ml.min<sup>-1</sup>. Průtok 0,23 ml.min<sup>-1</sup> poskytuje nejvyšší rozlišení, a proto byl použit pro další práci (obr. 2). K identifikaci antioxidantů v praktických vzorcích byly použity retenční časy a poměry signálů dominantního píku při potenciálu s nejvyšší odezvou a píků na elektrodách s nejbližším nižším (predominantní pík) a s nejbližším vyšším (postdominantní pík) potenciálem. Optimalizované

podmínky neumožňovaly dokonalou separaci kyseliny kávové a katechinu. Protože dominantní píky obou látek se nacházejí při různých potenciálech, byly připraveny kalibrační směsi látek bez kyseliny kávové a s kyselinou kávovou a koncentrace kyseliny kávové a katechinu ve vzorcích byly určovány na základě faktorů odezev dominantních píků obou látek v obou kalibračních řadách.

Kalibrační roztoky v rozsahu koncentrací 1.10<sup>-3</sup>–1 mg.l<sup>-1</sup> byly měřeny za podmínek uvedených v experimentální části. Kalibrační křivky v tomto koncentračním rozsahu jsou lineární. Obr. 3 ukazuje chromatogram kalibračního roztoku směsi standardních látek. Pro výpočet parametrů kalibračních závislostí bylo použito statistického programu Adstat (tab. I). Pomocí tohoto programu byly z kalibračních závislostí vypočteny i meze detekce pro jednotlivé látky (tab. II).

Z dat, získaných při opakovaných analýzách i-tého vzorku, byla vypočtena relativní směrodatná odchylka  $s_x$  podle rovnice:

$$s_x = \sqrt{\sum_{j=i}^m R_j^2 / (2 \cdot m)} \quad (2)$$

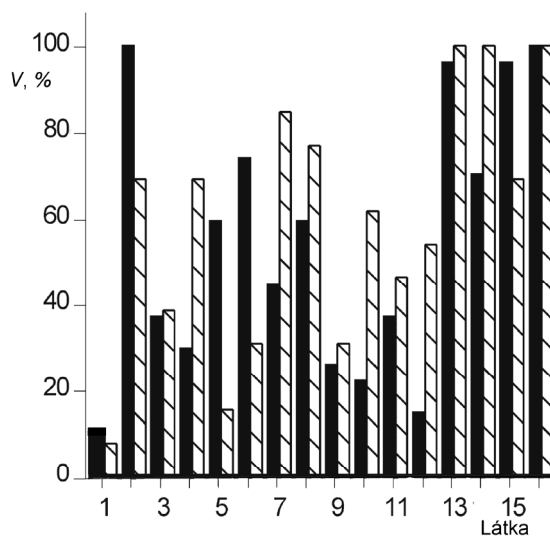


Obr. 4. Chromatogram vzorku piva PLATAN JEDENÁCT, světlý ležák; Mobilní fáze A: 5 mM octan amonný + 5% acetonitril, mobilní fáze B: 5 mM octan amonný + 50% acetonitril, gradient: podmínky gradientu viz experimentální část, 2 kyselina protokatechuová, 3 kyselina *p*-hydroxybenzoová, 5 kyselina vanilová, 6 kyselina kávová, 7 katechin, 8 kyselina chlorogenová, 10 vanilin, 13 epikatechin, 14 kyselina ferulová, 15 kyselina sinapová, 16 rutin, *I* odezva, *t<sub>r</sub>* retenční čas

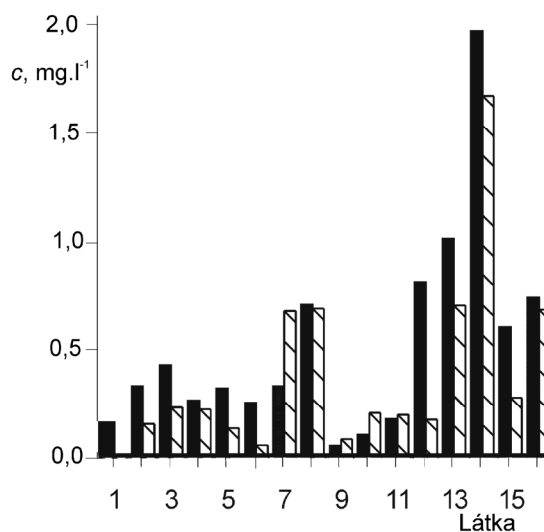
kde  $R_j$  je rozdíl obou paralelních stanovení vzorku a  $m = 10$  je počet opakovaných stanovení. Směrodatné odchylky jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce I.

Citlivost CoulArray detektoru u přírodních antioxidantů byla porovnávána s citlivostí fluorescenčního detektoru a dvouelektrodového coulometrického detektoru (Coulchem II). V tabulce II jsou uvedeny meze detekce na těchto detektorech pro sledované látky. Pro Coulchem II se pohybují řádově v setinách  $\text{mg.l}^{-1}$ , tj. cca o jeden řád výše než pro CoulArray detektor, s výjimkou kyseliny protokatechuové, kyseliny vanilové, vanilinu a kyseliny ferulové, jejichž meze detekce jsou srovnatelné s CoulArray detektorem. Mez detekce fluorescenčního detektoru se pohybuje přibližně o tři až čtyři řády výše než u CoulArray detektoru, některé antioxidanty však přirozenou fluorescencí neposkytují. Interferující látky z matrice pív zvyšovaly šum a snižovaly mez detekce u všech detektorů kromě CoulArray detektoru.

Optimalizovaná metoda analýzy byla použita k analýze obsahu přírodních antioxidantů ve 40 vzorcích pív, z toho 13 zahraničních a 27 českých. K vyhodnocení obsahu sledovaných látek ve vzorcích byla použita metoda kalibrační křivky. Obrázek 4 ukazuje chromatogram vzorku piva Platan 11. Stanovované látky byly identifikovány na základě retenčních časů a potenciálu dominantního píku a pomocí poměru ploch či výšek pre- a postdominantních píků k píků dominantním. Byla porovnána četnost výskytu látek v pivech českých a zahraničních v % celkového počtu pív (obr. 5). V zahraničních pivech se, ve srovnání s českými, častěji vyskytovaly kyselina 4-hydroxyfenyloctová, kyselina vanilová, kyselina chlorogenová, vanilin, kyselina kumarová a kyselina ferulová. V českých pivech pak byla častěji zastoupena kyselina protokatechuová, katechin, kyselina kávová a kyselina sinapová. Četnost výskytu ostatních látek byla srovnatelná. Dále byly porovnávány průměrné koncentrace sledovaných látek



Obr. 5. Četnost výskytu látek v pivech  $V$ , vztažená k celkovému počtu pív; ▨ zahraniční pivo, ■ české pivo, 1 kyselina gallová, 2 kyselina protokatechuová, 3 kyselina *p*-hydroxybenzoová, 4 kyselina 4-hydroxyfenyloctová, 5 kyselina vanilová, 6 kyselina kávová, 7 katechin, 8 kyselina chlorogenová, 9 kyselina syringová, 10 vanilin, 11 kyselina salicylová, 12 kyselina kumarová, 13 epikatechin, 14 kyselina ferulová, 15 kyselina sinapová, 16 rutin



Obr. 6. Průměrné koncentrace látek v roztocích pív  $c$ ; ▨ zahraniční pivo, ■ české pivo, 1 kyselina gallová, 2 kyselina protokatechuová, 3 kyselina *p*-hydroxybenzoová, 4 kyselina 4-hydroxyfenyloctová, 5 kyselina vanilová, 6 kyselina kávová, 7 katechin, 8 kyselina chlorogenová, 9 kyselina syringová, 10 vanilin, 11 kyselina salicylová, 12 kyselina kumarová, 13 epikatechin, 14 kyselina ferulová, 15 kyselina sinapová, 16 rutin

v obou typech pív (obr. 6). Ve vyšších koncentracích se v zahraničních pivech vyskytovala jen kyselina vanilová a vanilin. Srovnatelné byly průměrné koncentrace kyseliny 4-hydroxyfenyloctové, kyseliny chlorogenové, kyseliny salicylové a rutinu. Ostatní látky se vyskytovaly ve vyšších koncentracích v českých pivech.

## Závěr

Vysokou účinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s coulometrickou detekcí je velice vhodná metoda pro analýzu přírodních antioxidantů. Ve srovnání s jinými detektory je CoulArray detektor výrazně selektivnější a citlivější a jeho odezva je málo ovlivňována přítomností interferujících látek, takže při jeho použití odpadá zdlouhavá a náročná úprava vzorku. Látky lze identifikovat nejen na základě retenčních časů, ale i na základě poměrů odezvy signálu detektoru při různých vložených potenciálech na elektrody, zejména z poměru ploch pre- a postdominantních piků k ploše piků dominantního.

*Autoři děkují MŠMT za podporu této práce v rámci výzkumného záměru 253 10002 a Ing. V. Kellnerovi, CSc., z Výzkumného ústavu sladařského a pivovarského, Praha, za poskytnutí vzorků pív.*

## LITERATURA

1. Ho C-T., Lee C.Y., Huang M-T.: ACS Symp. Ser. 506, 402 (1992).
2. Pospíšil J.: *Antioxidanty*. Academia, Praha 1968.
3. Gamache P.H., McCabe D., Parvez S., Acworth I. N., v knize: *Progress in HPLC-HPCE: Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC, díl 6*. (Acworth I. N., Naoi M., Parvez S., eds). VS Press, Amsterdam 1997.
4. Acworth I. N., Gamache P. H.: Am. Lab. 5, 33 (1996).
5. Swendsen C.: Analyst 118, 123 (1993).
6. Hayes P. J., Smyth M. R., McMurrough I.: Analyst 112, 1205 (1987).
7. Fleet B., Little C. J.: J. Chromatogr. Sci. 12, 747, (1974).
8. Madigen D., McMurrough I., Smyth M. R.: Analyst 119, 863 (1994).
9. Peyrat-Maillard M. N., Bonnely S., Berset C.: Talanta 51, 709 (2000).
10. ESA, Technical note: *The Working Electrode – díl 1, The Reference Electrode - díl 2*. Esa Inc., Chelmsford 1998.
11. Achilli G., Cellerino G. P., Gamache P.: J. Chromatogr. 632, 111 (1993).
12. Gamache P., Ryan E., Acworth I. N.: J. Chromatogr. 635, 143 (1993).

**V. Škeříková, L. Grynová, and P. Jandera**  
(*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice*): **Using CoulArray Detector for Analysis of Natural Phenolic Compounds**

An HPLC method was developed for the analysis of phenolic compounds and flavonoids using a CoulArray detector with simultaneous recording of current responses of eight electrodes in series, with different applied potentials. The coulometric multielectrode detection offers a higher sensitivity and selectivity of determination compared with the single-electrode coulometric or fluorimetric detection. No special sample pretreatment is necessary and, because of the compatibility of the CoulArray detector with gradient elution, single-run analysis of phenolic antioxidants of different polarities is possible. In addition to the retention times, the ratios of the areas of the predominant and post-dominant peaks to the area of the dominant peak can be used to improve identification of compounds. The method was used for analysis of 40 beer samples. Significant differences between the Czech and foreign beers were found in the occurrence and average concentrations of antioxidants.