

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

CHARAKTERISTIKA JEČNÉHO SLADU POMOCÍ HPLC

KAROLÍNA BENEŠOVÁ, IVO HARTMAN,
SYLVIE BĚLÁKOVÁ a RENATA MIKULÍKOVÁ

*Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno
benesova@beerresearch.cz*

Došlo 4.2.13, přijato 15.4.13.

Klíčová slova: slad, tokoferoly, tokotrienoly, karotenoidy, ergosterol, ječmen jarní

Úvod

Ječmen je po staletí plodinou s mimořádným významem pro výživu lidí i výrobu krmiv pro hospodářská zvířata. Je klíčovou surovinou pro výrobu sladu, piva a whisky. Sladování je biotechnologický proces, spočívající v máčení, klíčení a hvozdnění (sušení) zrna. V jeho průběhu dochází k aktivaci enzymů, odbourání bílkovinné složky, rozkladu uložených polysacharidů na jednoduché zkvasitelné cukry a tvorbě senzory významných látek. Tento proces lze ovlivnit změnou podmínek (obsah vody, doba a teplota klíčení, teplota sušení a podobně)². Slady a sladové mouky jsou považovány za zdravotně významné potravinové doplňky a v současné době se uplatňují i v pekárenství. Neobsahují aditiva, barviva či konzervační látky. Z nutričně prospěšných látek jsou v ječných sladech přítomny zejména β -glukany, polyfenoly, vitamin B a E a karotenoidy¹.

Vitamin E a karotenoidy jsou látky syntetizované všemi vyššími rostlinami a patří k nejdůležitějším přírodním antioxidantům. Dobře známé a popsané jsou jejich příznivé biologické účinky, např. schopnost lapat volné kyslíkové radikály, převádět je na méně reaktivní nebo nereaktivní formy a bránit peroxidaci lipidických řetězců v buněčných membránách. Chrání tak rostliny před oxidačním stresem. V lidském organismu působí proti stárnutí buněk, srdečním a cévním chorobám a jsou prevencí vzniku některých druhů rakoviny^{3,4}. Karotenoidy jsou přírodní rostlinná barviva ze skupiny tetraaterpenoidů, nejčastěji rozdělovaná na karoteny (červená barviva, např. α - a β -karoten, nejvýznamnější provitaminy A) a xantofyly (žlutá barviva, např. lutein), které obsahují v molekule kyslík. Vitamin E se vyskytuje ve formě osmi isomerů: α -, β -, γ - a δ -tokoferol (T) a α -, β -, γ - a δ -tokotrienol (T3). Jsou to deriváty tokochromanolu s postranním isoprenoidním fyty-

lovým hydrofobním řetězcem. Všechny isomery vykazují biologickou aktivitu, která závisí na jejich struktuře a fyziologických faktorech⁵. Ergosterol patří mezi hlavní steroly produkované nižšími i vyššími houbami. Je provitaminem D₂, působením ultrafialového záření přechází na vitamin D₂, který se mění v játrech na aktivní vitamin D. Je složkou buněčných membrán hub, kde má podobnou funkci jako cholesterol v živočišných buňkách. Může být přítomen na všech úrovních potravního řetězce, od krmiva či suroviny až po finální výrobek. Ergosterol se nevyskytuje v buňkách rostlin nebo živočichů, proto je prakticky možné spojit jeho nálezy s přítomností plísní ve zkoumaném vzorku⁶.

Všechny uvedené látky jsou rozpustné v tucích, termolabilní a světlocitlivé. Jednou z nejčastěji využívaných metod pro jejich stanovení je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V literatuře je popsána řada HPLC metod v separačních systémech normálních nebo obrácených (reverzních) fází. Pro stanovení ergosterolu, α -tokoferolu a karotenoidů v systému reverzních fází je nejčastěji využívána nejběžnější stacionární fáze (SP) na bázi silikagelu s oktadecylovou modifikací (C18) (např. cit.⁷). Stacionární fáze s modifikací triakontyl (C30) silikagel byla původně vyvinuta pro rozlišení polohových a geometrických isomerů karotenoidů⁸ a později se začala používat i pro další látky. Všechny 8 isomerů vitamínu E je možno běžně rozdělit v systému normálních fází⁹. Pro analýzy v systémech reverzních fází se většinou používají různé modifikace kolon se stacionární fází C18, kde nelze za běžných podmínek v rozumném čase rozdělit β - a γ -isomer a je tedy možné stanovit pouze jejich sumu¹⁰. Jako mobilní fáze se používají acetonitril, methanol nebo jejich směsi s nízkým obsahem vody. Rozdělení čtyř tokoferolů v reverzním systému bylo popsáno pouze na méně běžných stacionárních fázích. Pentafluorofenyl silikagel (PFPS)¹¹ s mobilní fází methanol:H₂O (92:8), oktadekanoil polyvinyl alkohol (ODPVA)¹² s mobilní fází ACN:H₂O (85:15) a SG-Cholesterolic¹³ s mobilní fází 100 % methanolu rozdělí analyty v elučním pořadí δ -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol a α -tokoferol. V případě stacionární fáze triakontyl silikagel (C30)¹⁴ se 100 % methanolu a nejnověji vyvinuté Sil-poly-(ODA-alt-OMI)¹⁵ s mobilní fází methanol:H₂O (90:10) je eluční pořadí tokoferolů δ -tokoferol, γ -tokoferol, β -tokoferol a α -tokoferol.

Cílem naší práce bylo provést charakteristiku ječného sladu z hlediska obsahu zdravotně významných látek, vitamínu E a karotenoidů a ergosterolu jako markeru houbové kontaminace. Stanovení těchto látek zahrnovalo přípravu a zmydelnění vzorku, extrakci tukového podílu organickým rozpouštědlem a vlastní stanovení kapalinovou chromatografií v reverzním módu. K tomuto účelu jsme vyvinuli novou analytickou metodu. K separaci jsme použili kolonu nejnovější generace Ascentis[®] Express RP-amide¹⁶ s pev-

ným jádrem, vyrobenou novou technologií. Tato kolona vykazuje vysokou separační účinnost a dochází k výraznému zkrácení analýzy bez vysokého zpětného tlaku. Podle našeho nejlepšího vědomí nebyla separace tokoferolů a tokotrienolů na této stacionární fázi doposud popsána.

Experimentální část

Vzorky

Pro sladování byla použita bezpluchá odrůda ječmene AF Lucius ze sklizně roku 2011. Byly sladovány vzorky ječmene o hmotnosti 500 g v laboratorní mikroskladovně ve třech opakováních. Teplota vody a vzduchu v průběhu vzdušných přestávek i teplota klíčení byla v prvním pokusu 14 °C, ve druhém pokusu 18 °C. Délka sladování (máčení a klíčení) v obou pokusech byla celkem 4, 5 a 6 dní. Hvozďení probíhalo na jednolískovém, elektricky vyhřívaném hvozďě 1 × 22 hodin, při teplotě předsoušení 55 °C po dobu 12 hodin a při dotahovací teplotě 80 °C po dobu 4 hodin.

Standardy, chemikálie a příprava roztoků

Ke stanovení byly použity standardy α -tokoferolu čistoty $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, Německo), β -, γ -, δ -tokoferolu (čistota neuvedená, Calbiochem Chemicals, USA), α -, γ -, δ -tokotrienolu (čistoty $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 65\%$), luteinu, čistoty $\geq 75\%$ a β -karotenu, čistoty $\geq 97\%$, ergosterolu čistoty $\geq 95\%$, tetrahydrofuran, methyl-*tert*-butyl ether (MTBE), acetonitril a methanol pro HPLC (vše Sigma-Aldrich, Německo), dále nedenaturovaný ethanol čistoty 99,8 %, bezvodý síran sodný čistoty $\geq 99\%$, stabilizovaný diethylether čistoty $\geq 99\%$, kyselina askorbová p. a., hydroxid draselný p. a. (vše Lach-Ner, Česká republika) a dusík čistoty 5,5 ECD (Siad, Česká republika). Standardy tokoferolů byly rozpuštěny v methanolu o přibližné koncentraci 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a jejich přesná koncentrace byla stanovena spektrofotometricky dle ČSN 12822 (cit.¹⁷). Standardy α -, γ - a δ -tokotrienolů byly rozpuštěny v methanolu o přesných koncentracích 1,25–4,0 mg ml^{-1} . Z uvedených roztoků byl připraven zásobní roztok směsného standardu, ze kterého byla postupným ředěním připravena pětibodová kalibrační křivka. Standard luteinu byl rozpuštěn ve směsi MTBE a methanolu (250 $\mu\text{g ml}^{-1}$), standard β -karotenu v tetrahydrofuranu (300 $\mu\text{g ml}^{-1}$), standard ergosterolu v methanolu (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Pětibodové kalibrační křivky byly připraveny postupným ředěním zásobních roztoků. Koncentrace jednotlivých látek byly voleny tak, aby odpovídaly předpokládaným koncentracím ve vzorcích sladu. Rozsahy koncentrací pro kalibraci v $\mu\text{g ml}^{-1}$ byly následující: α -tokoferol 0,72–28,69, β -tokoferol 0,05–1,75, γ -tokoferol 0,18–7,24, δ -tokoferol 0,02–0,94, α -tokotrienol 1,5–90, γ -tokotrienol 0, 25–15, δ -tokotrienol 0,125–7,5, lutein 0,5–10,0, β -karoten 0,03–6,0, ergosterol 2,0–40,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Příprava vzorků

Vzorek sladu byl homogenizován na sladovém mlýnku. Ke 2 g vzorku bylo přidáno 50 ml ethanolu a 100 mg kyseliny askorbové. Po 10 min bylo přidáno 10 ml 50% vodného roztoku KOH, vzorek byl vyfoukán dusíkem z tlakové láhve, zazátkován a ponechán v inerti atmosféře při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 24 hodin.

Zmýdelněné vzorky byly poté extrahovány do 2×50 ml diethyletheru. Spojené etherové extrakty byly promyty deionizovanou vodou, po oddělení vodné fáze byly vysušeny přefiltrováním přes vrstvu bezvodého síranu sodného a zbytek rozpouštědla byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparky byly rozpuštěny ve 2×2 ml methanolu a po přefiltrování přes 0,2 μm nylonový filtr byly přímo analyzovány. Každý vzorek byl připravován dvakrát.

Přístroje a chromatografická analýza

Chromatografické analýzy byly provedeny na přístroji HPLC Ultimate 3000 (Dionex, USA). Systém je vybaven kvartérním gradientovým čerpadlem s integrovaným vakuovým odplyňovačem, automatickým dávkovačem vzorků s nástřikovým blokem Rheodyne, programovatelným termostatem kolon a dvěma programovatelnými detektory, detektorem s diodovým polem a za ním připojeným čtyřkanálovým fluorescenčním detektorem. Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit program Chromeleon. Analýzy byly provedeny na koloně Ascentis[®] Express RP-Amide (150 × 3 mm s velikostí částic 2,7 μm), mobilní fázi byl 100% acetonitril při průtoku 0,75 ml min^{-1} . Teplota kolony byla 30 °C, objem nástřiku 5 μl . Pro ergosterol a karotenoidy byl použit detektor diodového pole při 282 nm, resp. 450 nm a pro tokoferoly a tokotrienoly fluorescenční detektor s excitační a emisní vlnovou délkou 290 nm a 330 nm.

Výsledky a diskuse

Chromatografické stanovení

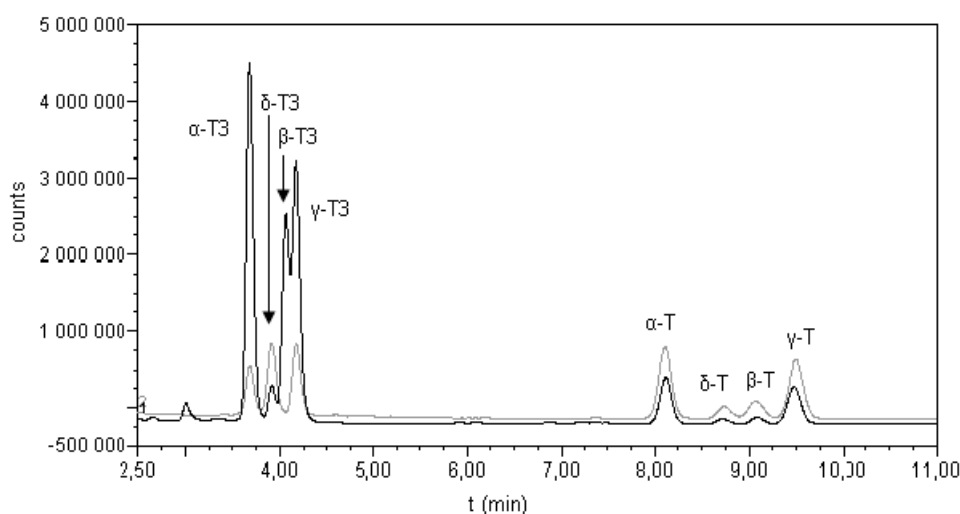
Jednotlivé isomery vitamínu E jsou v tradičním systému s oktadecylovou stacionární fází a mobilní fází acetonitril (methanol) separovány v pořadí, v jakém roste jejich hydrofobita. Eluční pořadí je následující: δ -tokotrienol, β - + γ -tokotrienol, α -tokotrienol, δ -tokoferol, β - + γ -tokoferol a α -tokoferol. Skupina méně hydrofobních nenasycených tokotrienolů je tak separována před nasycenými tokoferoly¹⁸. Tato skutečnost byla popsána i pro systémy se stacionární fází ODPVA a s mobilní fází ACN:H₂O 70:30, kde eluční pořadí analytů bylo δ -, β -, γ - a α -tokotrienol a δ -, β -, γ - a α -tokoferol¹⁸, a triakontyl silikagel s mobilní fází 100% methanolu, kde je eluční pořadí analytů δ -, γ -, β - a α -tokotrienol a δ -, γ -, β - a α -tokoferol¹⁹.

Eluční pořadí jednotlivých isomerů vitamínu E v našich experimentálních podmínkách se stacionární fází RP-

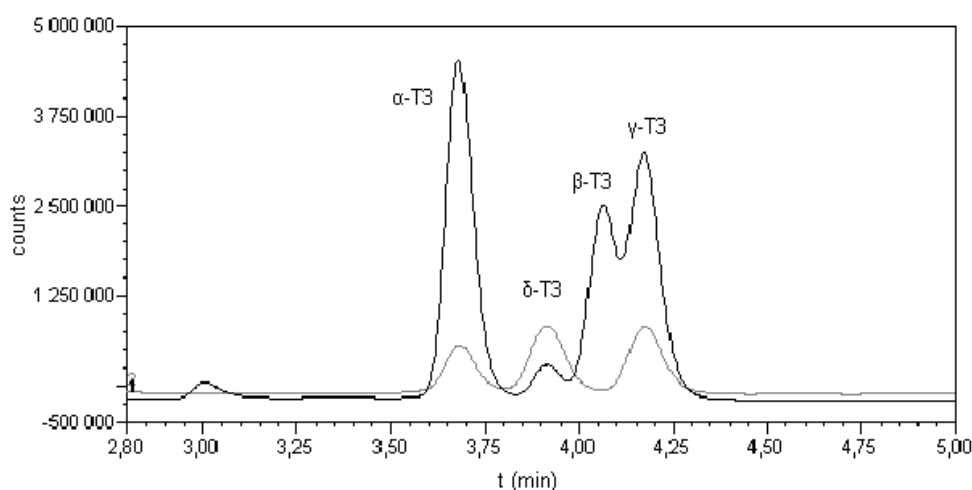
amide a mobilní fázi 100% acetonitrilu bylo následující: α -tokotrienol, δ -tokotrienol, β -tokotrienol a γ -tokotrienol a α -tokoferol, δ -tokoferol, β -tokoferol a γ -tokoferol (obr. 1). Pořadí píků je tedy odlišné od všech dosud popsaných separací v systému reverzních fází, kdy byly rozděleny 4, resp. všech 8 isomerů vitamínu E (cit.^{11–15,18,19}). Pík β -tokotrienolu (standard nebyl k dispozici) byl identifikován na základě jeho přítomnosti ve vzorku ječného sladu (obr. 1, 2). Tokotrienoly za uvedených experimentálních podmínek nešlo rozdělit až na základní linii. Byly zkoušeny binární (acetonitril/methanol, acetonitril/voda) i ternární (acetonitril/methanol/voda, acetonitril/methanol/dichlormethan) mobilní fáze. Obecně přidání i malého procenta jiného rozpouštědla do mobilní fáze způsobilo zvýšení

retenčního času α -isomerů a jejich splývání s píky ostatních tokoferolů (tokotrienolů), separace se tedy podstatně zhoršila. Jako optimální mobilní fáze byl nakonec ponechán 100% acetonitril. Dále byl testován vliv teploty kolony. Separace byla zkoušena při teplotách kolony 25, 30, 35 a 40 °C. Nejlepšího rozlišení δ - a β -isomerů bylo dosaženo při teplotě 25 °C, velmi dobré separace bylo dosaženo i při 30 °C a tato teplota byla z důvodu práce v neklimatizované laboratoři vybrána jako optimální pro analýzu vzorků. Postupné zvyšování teploty kolony sice snižovalo zpětný tlak a zkracovalo dobu analýzy, ale rovněž způsobilo zhoršení rozlišení δ - a β -isomerů vitamínu E.

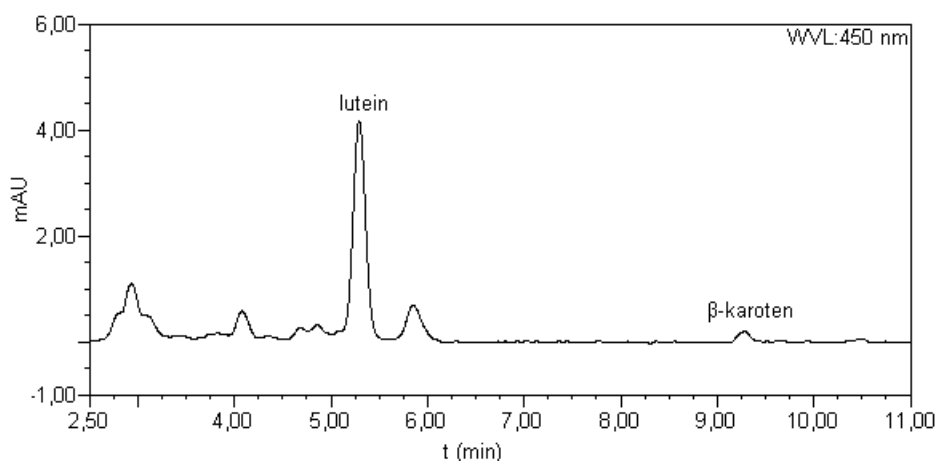
Kolona Ascentis® Express RP-Amide rozdělí ve 100% acetonitrilu běžné karotenoidy v pořadí asthaxantin,



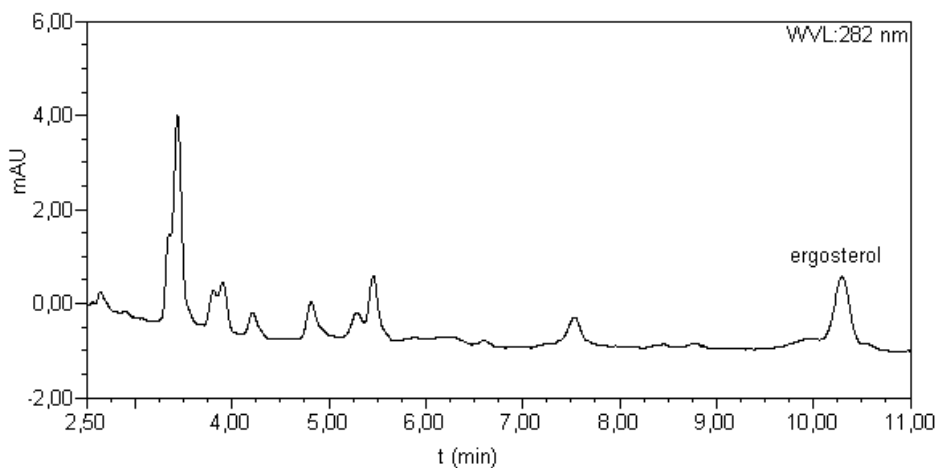
Obr. 1. **Chromatogram vitamínu E.** Standard α -, δ -, γ -T3 a α -, δ -, β - γ - T (šedý chromatogram) a reálný vzorek ječného sladu (černý chromatogram). Ascentis® Express RP-Amide, 100% ACN, 0,750 ml min⁻¹, fluorimetrická detekce, excitační vlnová délka 290, emisní 330 nm



Obr. 2. **Chromatogram vitamínu E.** Standard α -, δ -, γ -T3 (šedý chromatogram) a reálný vzorek ječného sladu (černý chromatogram). Ascentis® Express RP-Amide, 100% ACN, 0,750 ml min⁻¹, fluorimetrická detekce



Obr. 3. Chromatogram reálného vzorku ječného sladu. Ascentis® Express RP-Amide, 100% ACN, 0,750 ml min⁻¹, detekce diodovým polem, 450 nm – karotenoidy



Obr. 4. Chromatogram reálného vzorku ječného sladu. Ascentis® Express RP-Amide, 100% ACN, 0,750 ml min⁻¹, detekce diodovým polem, 282 nm – ergosterol

lutein, zeaxanthin, lycopene, α -karoten a β -karoten²⁰. Ve vzorcích sladu byly identifikovány karotenoidy lutein a β -karoten, což odpovídá našim předchozím výsledkům²¹, a také ergosterol (obr. 3, 4).

Kvalitativně byly porovnány retenční časy a spektra látek ve vzorcích s certifikovanými standardy, kvantifikovány byly metodou externích standardů s využitím kalibračních křivek. Obsah β -tokotrienolu byl určen s využitím standardu γ -tokotrienolu. Aktivita vitamínu E byla potom vyjádřena v mg α -tokoferol-ekvivalentu, což představuje součet obsahu jednotlivých isomerů se zohledněním jejich biologické aktivity. Podle autorů McLaughlina a Weihrauch²² jsou pro α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol, α -tokotrienol, β -tokotrienol a γ -tokotrienol přiřazeny biologické aktivity 1,0; 0,4; 0,1; 0,01; 0,3; 0,05; 0,01.

Výtěžnost metody byla zjištěna metodou přidavku externích standardů. Ke vzorku sladu o známé koncentraci sledovaných látek bylo přidáno známé množství standardů v koncentraci přibližně 3× vyšší, než byla známá koncentrace sledovaných látek v daném vzorku. Stanovení bylo provedeno třikrát. Standardy byly přidány před zmýdelněním vzorků, aby postihovaly celý extrakční krok. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vyjádřeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek šumu základní linie. Parametry metody jsou shrnuty v tab. I. Přesnost metody (opakovatelnost) byla vyjádřena jako hodnota relativní směrodatné odchylky z pěti stanovení téhož vzorku uskutečněných v jednom dni. Z tabulky je zřejmé, že hodnota RSD byla maximálně 6,53 %.

Tabulka I

Parametry metody. Jednotlivé isomery vitamínu E jsou uváděny v elučním pořadí (100% ACN). T – tokoferoly, T3 – tokotrienoly

Isomer	LOD	LOQ	Výtěžnost [%]	RSD [%]
	[mg kg ⁻¹]			
α -T3	0,027	0,090	82,3	5,45
δ -T3	0,008	0,025	98,3	6,53
β -T3				4,47
γ -T3	0,011	0,037	94,1	1,35
α -T	0,038	0,128	79,2	5,8
δ -T	0,007	0,023	98,5	1,47
β -T	0,013	0,044	108,8	0,66
γ -T	0,014	0,047	92,2	1,91
Lutein	0,045	0,151	114,4	4,03
β -caroten	0,077	0,259	88,9	3,62
Ergosterol	0,320	1,065	89,6	2,65

Analýza vzorků sladu

Metoda byla aplikována na vzorky sladu vyrobeného z ječmene jarního. Všechny výsledky jsou uváděny v mg kg⁻¹ sušiny²³ a jsou shrnuty v tab. II. Z výsledků je patrné, že jak teplota, tak délka sladování mají jen velmi malý vliv na obsah vitamínu E, jehož aktivita byla v průměru vyšší při teplotě 18 °C. Obsahy jednotlivých isomerů jsou s výjimkou δ -tokoferolu ve sladu nepatrně vyšší, než byly hodnoty v ječmeni dané odrůdy v předchozích letech²⁴. Obsah luteinu a β -karotenu byl pozitivně ovlivněn jak teplotou, tak i délkou sladování. Obsah β -karotenu se s teplotou i délkou sladování zvyšoval, obsah luteinu se při teplotě 14 °C nepatrně snížil, při

Tabulka II

Stanovený obsah tokoferolů, tokotrienolů, karotenoidů a ergosterolu ve sladu. Jednotlivé isomery vitamínu E jsou uváděny v pořadí, ve kterém eluují z kolony. T – tokoferoly, T3 – tokotrienoly

Máčení a klíčení celkem		Obsah ve sladu [mg kg ⁻¹ sušiny]											
teplota [°C]	doba [dny]	α -T3	δ -T3	β -T3	γ -T3	α -T	δ -T	β -T	γ -T	aktivita vit. E	lutein	β -karoten	ergosterol
14	4	19,16	0,56	3,88	3,73	6,52	0,14	0,40	1,49	12,81	1,60	0,30	7,96
	5	17,80	0,52	3,88	3,70	6,07	0,11	0,38	1,33	11,93	1,59	0,51	8,05
	6	19,54	0,54	4,12	4,28	6,83	0,08	0,41	1,47	13,26	1,58	0,80	8,11
Průměr		18,83	0,54	3,96	3,91	6,47	0,11	0,40	1,43	12,67	1,59	0,54	8,04
18	4	22,64	0,58	4,43	4,72	6,86	0,09	0,38	1,50	14,23	1,71	0,91	10,06
	5	21,57	0,54	4,30	4,53	6,98	0,09	0,39	1,52	14,02	1,73	1,12	10,27
	6	17,03	0,52	4,34	4,34	6,45	0,08	0,42	1,52	12,15	1,95	1,44	9,98
Průměr		20,41	0,55	4,36	4,53	6,76	0,09	0,40	1,51	13,47	1,80	1,16	10,10

teplotě 18 °C se rovněž zvyšoval. Celkově byl obsah karotenoidů nižší, než uvádí literatura²¹, kde šlo ovšem o slad vyrobený z pluchatých odrůd ječmene. Výhodou bezpluchých odrůd ječmene je, že při výrobě sladové mouky je zrno zužitkováno bez větších technologických úprav prakticky celé²⁵. Při konzumaci celých obilí je také využito podstatně vyšší podíl cenných látek, které jsou obsaženy hlavně v povrchových vrstvách obilky. Obsah nutričně cenných látek také závisí kromě technologie sladování na konkrétní odrůdě a zejména ročníku pěstování.

Obsah ergosterolu byl v průměru mírně vyšší při teplotě sladování 18 °C, v jednotlivých vzorcích se s dobou sladování výrazně neměnil, z čehož usuzujeme, že v průběhu sladování nedošlo k výraznému rozvoji plísněvé kontaminace. Literatura uvádí obsah ergosterolu ve sladu v širokém rozmezí 2,63–131,1 mg kg⁻¹ (cit.^{26,27}). Hodnoty, které jsme stanovili, patří spíše k nižším, což přisuzujeme způsobu extrakce. Autoři^{26,27} provedli zymedelní vzorku při zvýšené teplotě a extrakci do hexanu, která je pro ergosterol obvykle používána. V tomto srovnání mohla být naše extrakce méně účinná.

Závěr

Byla vyvinuta analytická metoda pro společné stanovení vitamínu E, vybraných karotenoidů a ergosterolu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. K výhodám metody patří zejména jednoduchá mobilní fáze, relativně krátký čas analýzy a rozdělení všech osmi isomerů vitamínu E. Reverzní separační systém se stacionární fází Ascendis® Express RP-amide a mobilní fází tvořenou čistým acetonitrilem může být alternativou k běžně používanému normálnímu systému HPLC. Metoda byla aplikována na vzorky ječného sladu. Ten v současné době získává kromě tradičního využití v pivovarství i další uplatnění v podobě potravinových doplňků. Úpravou sladovacích podmínek je možné obsah nutričně cenných látek významně ovlivnit, což bude předmětem našeho výzkumu v dalších letech.

Výsledků bylo dosaženo v rámci projektu NAZV QI111B053 – Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli.

LITERATURA

- Newman R. K., Newman C. W.: *Barley for Food and Health. Science, Technology and Products*. Wiley, New York 2008.
- Vavreinová S., Ouhרבková J., Rysová J., Fiedlerová V., Holasová M., Laknerová I., Winterová R., Prokeš J., Hartman I.: *Úroda* 12, 133 (2011).
- Kritchevsky S. B.: *J. Nutr.* 129, 5 (1999).
- Zingg J.-M.: *Mol. Aspects Med.* 28, 400 (2007).
- Packer L., Fuchs J. (ed.): *Vitamin E in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York 1993.
- Dohnal V., Ježková A., Skládanka S.: *Kontakt* 2, 449 (2008).
- Daood H. G., Korbász M., Hamdan S., Beczner J.: *Chromatographia* 68, S137 (2008).
- Sander L. C., Sharpless K. E., Craft N. E., Wise S. A.: *Anal. Chem.* 66, 1667 (1994).
- Shin T. S., Godber J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 70, 1289 (1993).
- Hosmanová R., Douša M.: *Chem. Listy* 101, 578 (2007).
- Richheimer S. L., Kent M. C., Bernart M. W.: *J. Chromatogr., A* 677, 75 (1994).
- Abidi S. L., Mounts T. L.: *J. Chromatogr., A* 782, 25 (1997).
- Buszewski B., Kowalska S., Krupczyńska K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 35, 89 (2005).
- Strohschein S., Pursch M., Lubda D., Albert K.: *Anal. Chem.* 70, 13 (1998).
- Mallik A. K., Sawada T., Takafuji M., Ihara H.: *Anal. Chem.* 82, 3320 (2010).
- Cunliffe J. M., Maloney T. D.: *J. Sep. Sci.* 30, 3104 (2007).
- ČSN EN 12822: *Potraviny: Stanovení vitamínu E metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie - Stanovení α -, β -, γ - a δ -tokoferolů*. ČNI, Praha 2002.
- Abidi S. L.: *J. Chromatogr., A* 881, 197 (2000).
- Strohschein S., Rentel C., Lacker T., Bayer E., Albert K.: *Anal. Chem.* 71, 1780 (1999).
- Santasaina C. T.: LC-UV analysis of Carotene Compounds on Ascentis™ RP-amide. Application report 294. Sigma-Aldrich 2005. Available online: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/t005294.Par.0001.File.tmp/t005294.pdf. Staženo 4. 2. 2013
- Macuchová S.: *Disertační práce*. Vysoké učení technické, Brno 2010.
- McLaughlin P. J., Weihrauch J. L.: *J. Am. Diet. Assoc.* 75, 647 (1979).
- Metodika zkoušení osiva a sadby ministerstva zemědělství č. 34349/04-17220.
- Benešová K., Pluháčková H., Běláková S., Vaculová K., Mikulíková R., Ehrenbergerová J., Březinová-Belcredi N.: *Chem. Listy* 106, 672 (2012).
- Bhatty R. S.: *Cereal Chem.* 73, 75 (1996).
- Dohnal V., Ježková A., Pavlíková L., Musilek K., Jun D., Kuca K.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 109 (2010).
- Jedličková L., Gadas D., Havlová P., Havel J.: *J. Agr. Food Chem.* 56, 4092 (2008).

K. Benešová, I. Hartman, S. Běláková, and R. Mikulíková (Malting Institute, Brno): Characteristics of Barley Malt by HPLC

A fast and sensitive HPLC for simultaneous determination of vitamin E, carotenoids and ergosterol was elaborated. The method includes alkaline hydrolysis, extraction with an organic solvent, chromatographic separation and detection with a photodiode-array and fluorescence detector. The analytes were separated by HPLC using acetonitrile as a mobile phase. The method was validated and applied to malt analysis.