

## Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí

### *Monitoring of Changes of Ferulic Acid Content in Brewing Materials Using the UPLC with PDA Detector*

SYLVIE BĚLÁKOVÁ, KAROLÍNA BENEŠOVÁ, RENATA MIKULÍKOVÁ, ZDENĚK SVOBODA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Česká republika  
Research Institute of Brewing and Malting, Malting Institute Brno, Mostecká 7, 614 00 Brno, Czech Republic  
e-mail: belakova@brno.beerresearch.cz

**Běláková, S. – Benešová, K. – Mikulíková, M. – Svoboda, Z.: Sledování změn obsahu ferulové kyseliny v pivovarských surovinách metodou UPLC s PDA detekcí.** Kvasny Prum. 56, 2010, č. 6, s. 266–269.

Práce se zabývá sledováním změn obsahu ferulové kyseliny v řadě ječmen-slad-sladina. Bylo analyzováno 21 vzorků odrůd ječmene, které pocházely ze 4 rozdílných lokalit. Ferulová kyselina byla ze vzorků ječmene a sladu po homogenizaci uvolněna alkalickou hydrolyzou a extrakt byl po úpravě pH přečištěn pomocí SPE. Pro analytické stanovení kyseliny ferulové v pivovarských surovinách byla použita optimalizovaná a validovaná ultrarychlá kapalinová chromatografie (UPLC-PDA). Obsah ferulové kyseliny v ječmeni se pohyboval v rozmezí 639,0 až 1555,8 mg.kg<sup>-1</sup>, ve sladu 1441,7 až 2174,6 mg.kg<sup>-1</sup> a ve sladince 3,91 až 9,09 mg.l<sup>-1</sup>.

**Běláková, S. – Benešová, K. – Mikulíková, M. – Svoboda, Z.: Monitoring of changes of ferulic acid content in brewing materials using the UPLC method with PDA detector.** Kvasny Prum. 56, 2010, No. 6, p. 266–269.

This study focused on monitoring of the changes in ferulic acid content in the series barley – malt – wort. Twenty-one samples of barley varieties from four different localities were analyzed.

Alcalic hydrolysis was used to release ferulic acid from the homogenized barley and malt samples. After adjusting pH, the extract was purified using the SPE.

The optimized and validated Ultra Performance Liquid Chromatography with PDA detector (UPLC – PDA) was used for the analytical determination of ferulic acid in brewing materials. Ferulic acid content moved in the range of 639.0 to 1555.8 mg.kg<sup>-1</sup> in barley, 1441.7 to 2174.6 mg.kg<sup>-1</sup> in malt and 3.91 to 9.09 mg.l<sup>-1</sup> in wort.

**Běláková S. – Benešová K. – Mikulíková, M. – Svoboda, Z.: Verfolgung der Gehaltsänderung an Ferulasäure in den Brauerostoffen durch die Methode UPLC mit der PDA Detektion.** Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 6, S. 266–269.

Der Artikel befasst sich mit der Gehaltsänderung an Ferulasäure in der Produktionsreihe Gerste – Malz – Würze. Es wurden 21 Gerstenmuster aus vier verschiedenen Lokalitäten analysiert. Nach einer Homogenisierung wurde durch die alkalische Hydrolyse die Ferulasäure aus den Gersten- und Malzmustern freigesetzt und der Extrakt nach der pH Wert Steuerung durch die SPE gereinigt. Für die analytische Bestimmung der Ferulasäure wurde eine optimalisierte und validierte Ultraschnellflüssigkeitschromatographie (UPLC-PDA) angewandt. Der Gehalt an Ferulasäure in der Gerste lag im Bereich von 639.0 bis zu 1555.8 mg.kg<sup>-1</sup>, im Malz von 1 441.7 bis zu 2 174.6 mg.kg<sup>-1</sup> und in der Würze von 3.91 bis zu 9.09 mg.l<sup>-1</sup>.

**Klíčová slova:** ferulová kyselina, UPLC-PDA, ječmen, slad, sladina

**Keywords:** ferulic acid, UPLC-PDA, barley, malt, wort

## 1 ÚVOD

Rostlinné polyfenoly jsou amorfní látky, které jsou obsaženy v nej-různějších částech rostliny – v kůře, dřevě, listech, plodech i kořenech. Společným rysem polyfenolů je, že obsahují jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami [1, 2]. Polyfenolové látky, které jsou obsaženy v pivovarských surovinách a v pivu, se významně uplatňují v procesu zajištění a udržení kvality a stability piva. Tyto látky díky svým antioxidačním schopnostem ovlivňují senzorické vlastnosti a celkovou trvanlivost piva, hrají důležitou roli v technologii jeho výroby a v konečném stadiu pak přispívají k zdravotně pozitivnímu hodnocení piva jako zdroje přírodních antioxidantů.

Polyfenoly vyskytující se v pivovarnickém procesu lze rozdělit do dvou velkých skupin. Do první skupiny patří flavonoidy, které se dále dělí na flavany, antokyany a flavonoly. Druhou skupinu tvoří fenolické kyseliny zahrnující deriváty benzoové kyseliny (salicylová kyselina, gentisová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, protocatechová kyselina, gallová kyselina, vanilová kyselina a syringová kyselina) a deriváty skořicové kyseliny (p-kumarová kyselina, kávová kyselina, ferulová kyselina a sinapová kyselina) [1].

Ferulová kyselina (4-hydroxy-3-methoxyskořicová) patří mezi hlavní vázané nízkomolekulární fenolové kyseliny v znu ječmene a vyskytuje se především v jeho vnějších vrstvách. V průběhu sladování se její obsah zvyšuje až dvojnásobně. Velký význam má antioxidační aktivita ferulové kyseliny v ječmeni a biochemickém procesu výroby piva. Spolu s ostatními polyfenolickými látkami se podílí na stabilitě a zachování kvalitativních znaků piva [1, 3].

## 1 INTRODUCTION

Plant polyphenols are amorphous substances that are spread in various parts of plants – bark, wood, leaves, fruits and roots. Polyphenols contain one or more aromatic nuclei with attached hydroxylated groups [1, 2]. Polyphenol substances contained in brewing materials and beer play an important role in the process of ensuring and maintaining beer quality and stability. These substances, due to their antioxidant properties, affect sensory characters and total beer shelf life, they are significant in beer production technology and in a final phase they contribute to a positive evaluation of beer as a source of natural antioxidants.

Polyphenols occurring in the brewing process can be split into two big groups. The first one comprises flavonoids which are further classified into flavans, anthocyanins and flavonols. The second group is formed by phenolic acids comprising derivatives of benzoic acid (salicylic, gentisic, p-hydroxybenzoic, protocatechuic, gallic, vanillic, and syringic acids) and derivatives of cinnamic acid (p-coumaric, caffeic, ferulic and sinapic acids) [1]. Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic) belongs to bound low-molecular weight phenolic acids in a barley grain, it occurs especially in its outer layers. During malting content of ferulic acid rises even twice. Its antioxidant activity plays an important role in barley and biochemical process of beer production. Together with other polyphenolic substances it contributes to beer stability and helps maintain beer quality characters [1, 3].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Chemikálie

Standard ferulové kyseliny, čistota 99% (Fluka); hydroxid sodný, (Merck); kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich); kyselina fosforečná (Fluka); dihydrogenfosforečnan sodný (Fluka); acetonitril CHROMASOLV pro HPLC gradient grade (Sigma-Aldrich); methanol G CHROMASOLV gradient grade, ACS (Sigma-Aldrich).

### 2.2 Analyzované vzorky

#### Ječmen

Celková ferulová kyselina byla stanovena v 21 odrůdách ječmene (Tolar, Jersey, Malz, Prestige, Diplom, Calgary, Bojos, Radegast, Sebastian, Braemar, Xanadu, Blaník, Poet, Westminster, Aksamit, Spilka, Beatrix, Orthega, Bolina, Pribina, a Tocada) ze sklizně z roku 2006. Vzorky pocházely ze 4 pěstebních lokalit – Lednice, Věrovany, Čáslav a Hradec nad Svitavou.

#### Slad

Slady byly připraveny v mikroskladovně Sladařského ústavu VÚPS v Brně obvyklým způsobem dle metodiky EBC [5].

#### Sladina

Sladina byla připravena tzv. kongresním postupem, což je standardně provedený infuzní rmutovací postup s jemně rozemletým sladem [5].

### 2.3 Příprava standardu

Byl připraven zásobní roztok standardu ferulové kyseliny o koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> v methanolu. Roztok byl uchováván v temnu při 5 °C a je stabilní po dobu 1 týdne. Byla připravena sedmibodová kalibrační křivka o koncentracích 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg.l<sup>-1</sup>. Kalibrační křivka byla lineární v daném rozsahu s regresním koeficientem 0,9984.

### 2.4 Příprava vzorků

#### 2.4.1 Ječmen, slad

K 1 g pomletého vzorku bylo přidáno 30 ml destilované vody. Po homogenizaci byl vzorek hydrolyzován 30 ml 2 mol.l<sup>-1</sup> hydroxidu sodného a třepán 1 hodinu na třepačce. K extraktu bylo přidáno 5,2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a pH bylo upraveno pomocí 6 mol.l<sup>-1</sup> HCl na výslednou hodnotu pH 3. Extrakt byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml. Poté byl převeden do centrifugační zkumavky a odstředován při 4000 min<sup>-1</sup> po dobu 15 minut. 1 ml supernatantu byl přečištěn pomocí SPE extrakce. Kolonka RP-102 Resin byla před použitím kondicionována 5 ml methanolu a poté 5 ml deionizované vody. Na kolonku byl nanesen 1 ml vzorku. Kolonka byla promyta 5 ml vody. Následná eluce byla provedena 1,7 ml methanolu. Přečištěný extrakt byl přefiltrován pomocí teflonového membránového filtru (0,2 µm) a převeden do vialky.

#### 2.4.2 Sladina

1 ml supernatantu, získaného postupem dle 2.4.1., byl přečištěn pomocí SPE extrakce. Kolonka RP-102 Resin byla před použitím kondicionována 5 ml methanolu a poté 5 ml deionizované vody. Na kolonku byl nanesen 1 ml vzorku. Kolonka byla promyta 50 ml deionizované vody. Následná eluce byla provedena 1,7 ml methanolu. Přečištěný extrakt byl přefiltrován pomocí teflonového membránového filtru (0,2 µm) a převeden do vialky.

### 2.5 Analytická metoda

Pro analytické stanovení celkové ferulové kyseliny v pivovarských surovinách (ječmen, slad, sladina) byl použit kapalinový chromatograf UPLC WATERS ACQUITY WATERS 2996 s PDA detektorem. Separace byla provedena na chromatografické koloně ACQUITY UPLC BEH C18. (2,1 mm × 100 mm s velikostí částic 1,7 µm) pomocí gradientové eluce. Mobilní fáze A byla 10 mmol.l<sup>-1</sup> fosfátový pufr upravený kyselinou fosforečnou na pH 3, mobilní fáze B byl acetonitril. Separace byla provedena při 40 °C při průtoku 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Podmínky gradientové eluce byly následující: lineární od 5 do 60% B od 0 do 0,8 min, 60% B od 2 do 2,2 min, lineární od 60 do 5% B od 2,2 do 3 min. UV detekce byla při vlnové délce 300 nm. Délka analýzy byla 5 minut. Opakovatelnost (repeatability) stanovení ferulové kyseliny byla <5 % RSD. Výťažnost SPE se pohybovala mezi 80–90 %.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Chemicals

Ferulic acid standard, purity 99% (Fluka); sodium hydroxide, (Merck); hydrochloric acid (Sigma-Aldrich); phosphoric acid (Fluka); sodium dihydrogen phosphate (Fluka); acetonitrile CHROMASOLV for HPLC gradient grade, (Sigma-Aldrich); methanol G CHROMASOLV gradient grade, ACS (Sigma-Aldrich).

### 2.2 Analyzed samples

#### Barley

Total ferulic acid was determined in samples of 21 barley varieties (Tolar, Jersey, Malz, Prestige, Diplom, Calgary, Bojos, Radegast, Sebastian, Braemar, Xanadu, Blaník, Poet, Westminster, Aksamit, Spilka, Beatrix, Orthega, Bolina, Pribina, and Tocada) from harvest 2006. The samples came from 4 growing localities – Lednice, Věrovany, Čáslav, and Hradec nad Svitavou.

#### Malt

Malts were prepared in the micromalting house of the Malting Institute of the RIBM using the default EBC method [5].

#### Wort

Wort was prepared by a so-called congress method; it is a standard infusion mashing system with finely milled malt [5].

### 2.3 Standard preparation

The standard stock solution of ferulic acid was prepared (concentration 100mg.l<sup>-1</sup> in methanol). The solution was kept in dark at 5 °C and was stable for 1 week. Linear 7-point calibration curve at concentrations 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg.l<sup>-1</sup> was constructed. Calibration curve was linear in the given scope with the regression coefficient 0.9984.

### 2.4 Sample preparation

#### 2.4.1 Barley, malt

30 ml of distilled water were added to a ground sample (1g). After homogenization the sample was hydrolyzed with 2 mol.l<sup>-1</sup> of sodium hydroxide (30 ml) and shaken on a shaker for 1 hour. 5.2 ml of concentrated hydrochloric acid was added to the extract and pH was adjusted to 3 with 6 mol.l<sup>-1</sup> of HCl. Distilled water was added to the extract to a total volume of 100 ml. Subsequently, the extract was transferred to a centrifugal tube and centrifuged at 4000 min<sup>-1</sup> for 15 minutes. 1ml of supernatant was purified using the SPE. Before the use, the RP-102 Resin column was conditioned with methanol (5ml) and subsequently with deionized water (5ml). The sample (1ml) was transferred to the column. The column was washed with 5 ml of water. Following elution was carried with 1.7 ml of methanol. The purified extract was microfiltered through a teflon membrane filter (0.2 µm) and transferred to a vial.

#### 2.4.2 Wort

1 ml of supernatant, obtained following the procedure 2.4.1., was purified with the SPE extraction. The RP-102 Resin column was before the use conditioned with methanol (5ml) and subsequently with deionized water (5ml). The sample (1ml) was transferred to the column. The column was washed with 50 ml of deionized water. Following elution was carried with 1.7 ml of methanol. The purified extract was microfiltered through a teflon membrane filter (0.2 µm) and transferred to a vial.

### 2.5 Analytical method

Liquid chromatograph UPLC WATERS ACQUITY WATERS 2996 with PDA detector was used for the analytical determination of total ferulic acid in the brewing materials (barley, malt, wort). Separation was performed on the chromatographic column ACQUITY UPLC BEH C18. (2.1 mm × 100 mm, size of particles 1.7 µm) with gradient elution. Mobile phase A was 10 mmol.l<sup>-1</sup> of phosphate buffer acidified with phosphoric acid to pH 3, mobile phase B was acetonitrile. Separation was performed at 40 °C at the flow rate of 0.5 ml.min<sup>-1</sup>. Conditions of the gradient elution: linear from 5 to 60% B from 0 to 0.8 min, 60% B from 2 to 2.2 min, linear from 60 to 5% B from 2.2 to 3 min. The UV detection was carried out at the wavelength of 300 nm. The assay time was 5 minutes. Repeatability for ferulic acid was <5 % RSD. SPE recovery varied between 80–90 %.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Kalibrační křivka pro stanovení celkové ferulové kyseliny u pevných matric byla lineární v rozsahu 170,0 až 2550,0 mg.kg<sup>-1</sup> (koncentrace ferulové kyseliny v reálném vzorku), regresní koeficient byl 0,9981, limit detekce 30 mg.kg<sup>-1</sup>. Kalibrační křivka pro stanovení celkové fe-

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

Calibration curve for the determination of total ferulic acid in solid matrixes was linear in the range of 170 – 2550 mg.kg<sup>-1</sup> (concentration of ferulic acid in a real sample), regression coefficient with correlation factor was 0.9981, detection limit 30 mg.kg<sup>-1</sup>. Calibration

Tab.1 Obsah ferulové kyseliny v ječmeni, sladu a sladině / Ferulic acid content in barley, malt and wort

SKLIZEŇ 2006 / HARVEST 2006							
Lokalita / Locality LEDNICE				Lokalita / Locality ČÁSLAV			
Odrůda / Variety	Ječmen / Barley	Slad / Malt	Sladina / Wort	Odrůda / Variety	Ječmen / Barley	Slad / Malt	Sladina / Wort
	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>		mg.kg <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>
Tolar	905.6	1844.5	7.34	Tolar	977.4	1720.0	6.20
Jersey	826.6	1933.8	7.16	Jersey	890.5	1871.7	7.34
Malz	838.2	1644.8	6.44	Malz	800.3	1649.9	8.35
Prestige	1338.8	1694.6	7.19	Prestige	1141.9	1601.0	6.67
Diplom	864.2	1768.9	7.69	Diplom	1412.6	1751.9	8.14
Calgery	955.5	1826.7	5.84	Calgery	942.8	1680.2	7.83
Bojos	884.4	1683.5	6.13	Bojos	639.0	1445.6	6.14
Radegast	1112.0	1679.3	6.17	Radegast	714.1	1567.4	6.43
Sebastian	1268.1	1772.3	5.99	Sebastian	859.1	1556.9	8.19
Braemar	1330.7	1740.8	7.38	Braemar	798.6	1531.2	8.28
Xanadu	1254.5	1717.9	7.48	Xanadu	668.4	1581.4	6.66
Blaník	1555.8	1665.3	6.66	Blaník	992.0	1490.0	6.74
Poet	1040.1	2004.3	7.70	Poet	821.6	1607.6	6.26
Westminster	900.5	1895.5	6.23	Westminster	791.9	1793.4	8.96
Aksamit	1054.6	1910.0	4.53	Aksamit	741.1	1554.6	6.04
Spilka	1033.7	2041.7	7.12	Spilka	938.8	1745.7	6.94
Beatrix	923.1	1792.7	6.74	Beatrix	813.1	1539.4	8.38
Orthega	1054.9	2101.2	3.91	Orthega	1031.5	1610.4	5.92
Bolina	1090.5	1944.0	9.09	Bolina	794.0	1528.0	6.95
Pribina	1324.3	1850.1	7.99	Pribina	867.6	1601.9	6.00
Tocada	871.6	1965.6	7.14	Tocada	1071.6	1774.4	5.85
Lokalita / Locality VĚROVANY				Lokalita / Locality HRADEC nad SVITAVOU			
Tolar	917.3	2125.4	7.98	Tolar	1153.0	1997.9	6.32
Jersey	944.6	2174.6	5.72	Jersey	936.5	1931.2	6.11
Malz	830.0	1845.9	6.28	Malz	833.2	1825.8	6.79
Prestige	893.9	2174.1	4.48	Prestige	887.7	1643.1	6.92
Diplom	837.6	2065.8	6.60	Diplom	943.0	1759.5	7.55
Calgery	919.4	1696.9	5.36	Calgery	983.2	1635.4	6.04
Bojos	704.6	1643.1	4.74	Bojos	1293.7	1513.9	7.10
Radegast	737.1	1906.7	4.94	Radegast	868.0	1728.1	6.42
Sebastian	839.2	2077.1	6.16	Sebastian	1107.4	1783.3	6.29
Braemar	811.7	1853.4	6.18	Braemar	949.2	2045.1	5.89
Xanadu	678.6	2061.8	6.34	Xanadu	730.7	1710.2	6.12
Blaník	914.0	2019.1	5.73	Blaník	920.4	1738.3	5.22
Poet	891.9	1922.4	6.14	Poet	849.2	1618.3	5.19
Westminster	680.4	1790.0	6.57	Westminster	899.8	1815.6	8.99
Aksamit	691.7	1827.3	4.70	Aksamit	766.6	1700.5	6.16
Spilka	878.5	2036.9	7.61	Spilka	904.6	1671.9	6.09
Beatrix	859.1	1760.3	8.24	Beatrix	1187.1	1507.9	6.93
Orthega	941.5	2009.7	5.12	Orthega	1249.0	1962.5	6.95
Bolina	848.3	1984.4	6.37	Bolina	858.3	1727.2	6.16
Pribina	740.5	1857.0	5.68	Pribina	865.5	1441.7	4.91
Tocada	755.5	1852.2	6.86	Tocada	910.3	1681.8	5.48

rulové kyseliny u kapalných matric byla lineární v rozsahu 1,7 až 25,5 mg.l<sup>-1</sup> (koncentrace ferulové kyseliny v reálném vzorku), regresní koeficient 0,9964, limit detekce 0,5 mg.l<sup>-1</sup>.

Jednotlivé odrůdy ječmene se liší v obsahu ferulové kyseliny. U 21 analyzovaných odrůd ječmene se obsah pohyboval mezi 639,0 až 1555,0 mg.kg<sup>-1</sup> (tab. 1). Největší shody ve všech lokalitách dosáhla odrůda Malz (2,1 % RSD), nejvíce byly výsledky rozptýleny u odrůdy Xanadu (33,9 % RSD). Průměrný obsah ferulové kyseliny v ječmeni byl 935,1 mg.kg<sup>-1</sup> (11,1 % RSD). Rozdíly obsahu ferulové kyseliny mohou být způsobeny především různými povětrnostními podmínkami v pěstebních lokalitách. Ve vzorcích ječmene pocházejících z lokality Lednice byly zjištěny nejvyšší hodnoty. Předpokládá se, že vzrůstající nadmořská výška může mít vliv na poměr volné a vázané ferulové kyseliny v ječmeni ve prospěch volné kyseliny [4, 6, 7].

Ve vzorcích sladů, vyrobených z analyzovaných odrůd ječmenů, se obsah ferulové kyseliny pohyboval mezi 1441,7 až 2174,6 mg.kg<sup>-1</sup> (tab. 1). Vyšší obsah ferulové kyseliny byl způsoben uvolněním vázané ferulové kyseliny z ječmene během sladovacího procesu. Největší shody ve všech lokalitách dosáhla odrůda Westminster (2,7 % RSD), nejvíce byly výsledky rozptýleny u odrůdy Prestige (15,0 % RSD). Průměrný obsah ferulové kyseliny ve sladu byl 1783,5 mg.kg<sup>-1</sup> (9,4 % RSD).

Nárůst obsahu ferulové kyseliny v řadě ječmen – slad se pohyboval od 7 do 164 %. Největší navýšení dosáhla odrůda Aksamit z lokality Věrovany, nejnižší nárůst obsahu ferulové kyseliny byl u odrůdy Blaník z lokality Lednice. Obecně lze říci, že z ječmene s vyšším obsahem ferulové kyseliny byl vyroben slad, kde došlo k menšímu nárůstu obsahu této kyseliny. Patrně to bylo způsobeno poměrem volné a vázané kyseliny v ječmeni.

Ve vzorcích jednotlivých sladin se obsah ferulové kyseliny pohyboval v rozmezí od 3,9 do 9,1 mg.l<sup>-1</sup> (viz tab. 1). Největší shody ve všech lokalitách dosáhla odrůda Diplom (9,6 % RSD), nejvíce byly výsledky rozptýleny u odrůdy Orthega (23,5 % RSD). Průměrný obsah kyseliny ferulové ve sladině byl 6,6 mg.l<sup>-1</sup> (14,9 % RSD).

## 4 ZÁVĚR

Byla zavedena nová metoda na stanovení ferulové kyseliny v pivovarských surovinách pomocí UPLC-PDA. Obsah kyseliny ferulové v ječmeni se pohyboval v rozmezí 639,0 až 1555,0 mg.kg<sup>-1</sup>, ve sladu 1441,7 až 2174,6 mg.kg<sup>-1</sup> a ve sladině 3,91 až 9,09 mg.l<sup>-1</sup>.

Obsah ferulové kyseliny ve sladu byl vždy vyšší než obsah v ječmeni. Z ječmenů s vyšším obsahem ferulové kyseliny byly vyrobeny slady, kde došlo k menšímu nárůstu obsahu této kyseliny.

## PODĚKOVÁNÍ

Výsledky uvedené v této práci byly získány v rámci projektu NAZV QH91053.

*Recenzovaný článek / Reviewed paper*

*Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 11. 2009*

*Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 1. 2010*

curve for wort samples was linear within 1.7 – 25.5 mg.l<sup>-1</sup> (concentration of ferulic acid in a real sample) with correlation factor 0.9987, detection limit 0.30 mg.l<sup>-1</sup>.

Calibration curve for the determination of total ferulic acid in liquid matrixes was linear in the range of 1.7 to 25.5 mg.l<sup>-1</sup> (concentration of ferulic acid in a real sample), regression coefficient 0.9964, detection limit 0.5 mg.l<sup>-1</sup>.

The individual barley varieties differed in their content of ferulic acid. Ferulic acid content in 21 analyzed barley varieties moved from 639.0 to 1555.0 mg.kg<sup>-1</sup> (Tab. 1). The variety Malz achieved the most similar results in all the locations (2.1 % RSD), the most different results were exhibited by the variety Xanadu (33.9 % RSD). Average content of ferulic acid in barley was 935.1 mg.kg<sup>-1</sup> (11.1 % RSD). Differences in content of ferulic acid can be caused mainly by different weather conditions in the growing locations. The highest values of ferulic acid were determined in the barley samples from the location Lednice. It is assumed that increasing altitude affects the ratio of free and bound ferulic acid in barley in favor of free ferulic acid [4, 6, 7].

In malt samples made from the analyzed barley varieties, ferulic acid content moved from 1441.7 to 2174.6 mg.kg<sup>-1</sup> (Tab. 1). Higher content of ferulic acid was caused by releasing bound ferulic acid from barley during the malting process. The variety Westminster achieved the most similar results in all locations (2.7 % RSD), the most different results were found in the variety Prestige (15.0 % RSD). Average content of ferulic acid in malt was 1783.5 mg.kg<sup>-1</sup> (9.4 % RSD).

Increase in ferulic acid content in the series barley – malt varied from 7 to 164 %. The highest increase in ferulic acid content was achieved by the variety Aksamit from the locality Věrovany; the lowest was recorded in the variety Blaník, location Lednice. Generally, we can state that barley with a higher ferulic acid content produced malt in which content of ferulic acid did not increase significantly. It was probably caused by a ratio of bound and free acid in barley.

Ferulic acid content in samples of the respective worts moved from 3.9 to 9.1 mg.l<sup>-1</sup> (see Tab. 1). The most similar results in all locations were achieved by the variety Diplom (9.6 % RSD), the most different results were found in the variety Orthega (23.5 % RSD). Average content of ferulic acid in wort was 6.6 mg.l<sup>-1</sup> (14.9 % RSD).

## 4 CONCLUSIONS

A new UPLC-PDA method for the determination of ferulic acid in the brewing materials was introduced. Ferulic acid content in barley varied from 639.0–1555.0 mg.kg<sup>-1</sup>, in malt it moved from 1441.7–2174.6 mg.kg<sup>-1</sup> and in wort from 3.9–9.1 mg.l<sup>-1</sup>. Ferulic acid content was always higher in malt than in barley. Barleys with higher ferulic acid content gave malts in which content of ferulic acid did not increase significantly.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The results presented in this study were acquired in the framework of the The National Agency for Research in Agriculture NAZV QH91053.

*Translated by Vladimíra Nováková*

## LITERATURA / REFERENCES

- Čepička, J., Karabín, M.: Polyphenolic compounds of beer – natural antioxidants. *Chem. listy* **96**, 2002, 90–95.
- Slanina, J., Táborská, E.: Intake, bioavailability and metabolism of plant polyphenols in humans. *Chem. listy* **98**, 2004, 239–245.
- Maillard, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., Berset, C.: Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *Lebensmittel – Wissenschaft und – Technologie* **29** (3), 1996, 238–244.
- Sun, R. S., Sun, X. F., Wang, S. Q., Zhu, W., Wang, X. Z.: Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Ind. Crops Prod.* **15**, 2002, 179–188.
- European Brewery Convention.: *Analytica EBC. Getränke-Fachverlag Hans Carl, Grundwerk* 1998.
- McMurrough, B. I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A. M., Hennigan, G., McNulty, N.: Control of Ferulic Acid and 4-Vinyl Guaicol in Brewing. *J. Inst. Brew.* **102**, 1996, 327–332.
- Bonoli, M., Marconi, E., Caboni, M.F.: Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. *J. Chromatogr. A* **1057** (1-2), 2004, 1–12.