

Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XX. (Ovčárna pod Pradědem, 25. – 27. 4. 2018), Sborník příspěvků ze semináře (J. Fischer, J. Kellner, K. Vytřas, Eds.), str. oo – oo.
© Univerzita Pardubice, Pardubice 2018; ISBN 978-80-7560-xxx-y.

HPLC/MS/MS ANALÝZA POLYFENOLICKÝCH LÁTEK OBSAŽENÝCH V MEDOVINÁCH

HPLC/MS/MS ANALYSIS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS CONTAINED IN MEADS

Kateřina Pravcová, Lenka Česlová, Miroslava Juričová a Jan Fischer

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,

Studentská 573, 532 10 Pardubice

E-mail st40226@student.upce.cz

Souhrn

Cílem této práce bylo stanovení vybraných fenolických látek v medovinách s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi. Vzorky medovin byly analyzovány bez úpravy nebo byly extrahovány do směsi ethylacetát:diethylether. Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 (150 mm × 3.0 mm, 2.7 μm). Mobilní fáze byla složena z redestilované vody okyselené 0,3% kyselinou mravenčí a acetonitrilu. Vybrané fenolické látky byly kvantifikovány a jejich obsah v extraktech byl porovnán s obsahem při analýze neupravených vzorků medovin. Zastoupení fenolických látek v medovinách bylo podobné, lišilo se jejich množství v závislosti na použitém medu či technologii výroby. Mezi studovanými medovinami byl nalezen jeden vzorek, kde byl obsah fenolických látek pouze ve stopovém množství, což může svědčit o falsifikaci výrobku.

Abstract

The objective of this study was the determination of selected phenolic compounds in mead samples using reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. The mead samples were analysed without pretreatment or after extraction to the diethyl ether:ethyl acetate mixture. The final separation of phenolic compounds was performed on Ascentis Express C18 column (150 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) with mobile phase consisted of water acidified with 0.3% formic acid and acetonitrile. Selected phenolic compounds were quantified and their amount in untreated mead samples and extracts was compared. Representation of phenolic compounds in meads was similar, only the quantity was different. The mead with trace amount of phenolic compounds was found among studied samples, which can be probably caused by falsification.

1. Úvod

Výroba medoviny je známa již od dávných dob. Medovina je tradiční alkoholický nápoj, k jehož výrobě se používá fermentovaná směs medu a vody, ale i ovocné šťávy, koření nebo bylinné extrakty. Medovina obsahuje od 8 do 18% ethanolu a mnoho různých složek podle typu medu. Med obsahuje sacharidy, bílkoviny, enzymy, aminokyseliny, vitamíny, minerály a fenolické sloučeniny [1-3].

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou charakterizovány svými antioxidačními vlastnostmi. Základní struktura fenolických sloučenin zahrnuje alespoň jeden aromatický kruh, na kterém je jedna nebo více hydroxylových skupin připojena k alifatickým nebo aromatickým skeletům. Tyto sloučeniny výrazně ovlivňují chuť medu (hořkost) [4-9], jelikož působí jako přírodní konzervační látky [10]. Mají také antioxidační, protizánětlivé [11] a antibakteriální účinky [12] a mohou sloužit jako prevence proti rakovině [13,14]. Profil fenolických sloučenin v medovině je silně ovlivněn typem medu a příměsí ovocných šťáv a bylinných extraktů. Obsah těchto sloučenin závisí také na technologickém procesu (fermentace, tepelné zpracování a skladování) [1-3].

Extrakční proces je významný pro HPLC/MS analýzu fenolických sloučenin v medu a medovině, jelikož obsahují velké množství sacharidů a dalších sloučenin, které by mohly v případě hmotnostně spektrometrické detekce způsobit značné potlačení ionizačního procesu [15-17]. Nejběžnější obohacovací metoda je extrakce v systému kapalina-kapalina. Jako extrakční rozpouštědlo se obvykle používá ethylacetát nebo diethylether [15,18]. Mezi další metody patří extrakce tuhou fází [15,19,20]. Tato metoda využívá extrakční patrony s neiontovými sorbenty, např. Amberlite XAD [16] a Bond Elut C18 [20] nebo s kyselými iontoměničovými pryskyřicemi, jako je Dowex 50WX8 [20].

Separace fenolických sloučenin se obecně provádí pomocí RP-HPLC s oktadecylsilikagelovými [20-24] nebo oktyl silikagelovými kolonami [15,16,21] a s vodným acetonitrilem [15] nebo methanolem [15,20,21,23,24,26] jako mobilní fází. Používá se gradientová eluce s různou strmostí gradientu a počáteční koncentrací mobilní fáze. Většina fenolických sloučenin je ovlivněna pH mobilní fáze, a proto se k vodní složce mobilní fáze nebo k oběma rozpouštědlům přidávají různé kyseliny nebo pufrů. Velmi často se do mobilní fáze přidává kyselina mravenčí [20,21,23,24,26], kyselina octová [15,16] nebo octan amonný [22] v různých koncentracích.

Nejběžnější metodou detekce fenolických sloučenin v potravinách a nápojích je hmotnostní spektrometrie [28]. Dále může být použita spektrofotometrická detekce [17,29-32], coulometrická detekce [33] nebo detekce fluorescenční [15]. S výjimkou HPLC se pro separaci fenolických sloučenin využívá i plynové chromatografie [15,25] nebo kapilární elektroforézy (CE). Z elektroforetických metod je pro separaci a kvantifikaci flavonoidů v medu často využívaná micelární elektrokinetická chromatografie. Tato metoda se stala dobrou alternativou chromatografických separací pro současnou analýzu fenolických složek v medu [16].

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie a roztoky

Na přípravu vzorků, standardů a mobilních fází byl použit acetonitril v čistotě pro HPLC/MS (Sigma Aldrich, USA) a destilovaná voda, která byla přečištěna pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Německo). Jako přídavek do mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA). Dále byly použity chemikálie: diethylether a ethylacetát (Lach-ner, Neratovice), 35% kyselina chlorovodíková (J.T.Baker, Nizozemsko) a methanol (Sigma Aldrich, USA). Pro identifikaci látek a přípravu kalibračních roztoků byly použity standardy jednotlivých fenolických látek gallová, gentisová, vanilová, protokatechová, syringová, 4-hydroxybenzoová, salicylová, ferulová, kávová, p-kumarová, m-kumarová, isoferulová a chlorogenová kyselina, apigenin, epikatechin, katechin, myricetin, kvercetin, taxifolin, luteolin, rutin, vanilin a 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Všechny standardy pocházely z firmy Sigma-Aldrich (USA).

2.2. Vzorky medovin

Pro analýzu byly vzorky jednotlivých medovin 10x zředěny 20% acetonitrem a přefiltrovány přes stříkačkový PTFE filtr o velikosti pórů 0,45 μm . Dále byly připraveny extrakty jednotlivých medovin. Bylo smícháno 10 ml vzorku medoviny s 15 ml diethyletheru a 15 ml ethylacetátu. Směs byla okyselená 150 μl 35% kyseliny chlorovodíkové a byla třepána 20 min. Pro urychlení sedimentace byla směs centrifugována po dobu 10 min. Vrchní organická vrstva byla převedena do plastové kónické zkumavky, extrakční rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha a odparek byl následně rozpuštěn v 2 ml 20% acetonitrilu ve vodě. Na závěr byla celá směs přefiltrována přes 0,45 μm stříkačkový PTFE filtr a zředěna 10x nebo 50x 20% acetonitrem. Všechny vzorky medoviny byly získány od českých a slovenských včelařů nebo zakoupeny v místních obchodech (tabulka 1).

Tabulka 1: Vzorky medovin.

Číslo vzorku	Název medoviny	Výrobce	Obj % alkoholu
1.	Staroslovenská medovina	Včela PRO, Jan Löffelmann	13,0
2.	Medovina „Medvědí objetí“	Medovinka s.r.o., Hlinsko	13,0
3.	Staročeská medovina	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	-
4.	Přibyslavská medovina, medovicová	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
5.	Přibyslavská medovina, slunečnicová	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
6.	Přibyslavská medovina, lípa	M. Zelený, Nové město n. Metují	-

Číslo vzorku	Název medoviny	Výrobce	Obj % alkoholu
7.	Medovina (z plastu)	Ing. Petr Kudláč – APIMED Dolná Krupá, Slovensko	-
8.	Medové víno z Českého lesa s jablečnou příchutí (cyser)	J. Lstibůrek, Domažlice	11,5
9.	BIO medovina	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	13,0
10.	Originální medovina z kunětických strání	E. Báchor, Pardubice	-
11.	Tmavá staroslovanská medovina z lesního medu	Ing. Petr Kudláč – APIMED Dolná Krupá, Slovensko	13,5
12.	Medové víno z Českého lesa, archivní	J. Lstibůrek, Domažlice	13,5
13.	Keltská medovina	Sznepka, Hlučín	11,6
14.	Domácí jemná medovina	Vinařství UHER Josef	-
15.	Medové víno z Českého lesa s rybízovou příchutí	J. Lstibůrek, Domažlice	14,0
16.	Medovina z Vysočiny	včelařství Sláma, Havlíčkův Brod	13,0
17.	Včelovina	Včelco s.r.o., Smolenice, Slovensko	3,0
18.	Křivoklátská medovina	Jan Halada, ČESKÁ VČELA s.r.o, Rakovník	18,0
19.	Medové Velkomoravské	NATUREL s.r.o. ve spolupráci s Ing. Markem Sznepkou, Třebechovice pod Orebem	11,3
20.	Medovina lípa	M. Zelený, Nové město n. Metují	-
21.	Medovina jarní	M. Zelený, Nové město n. Metují	12,5
22.	Medovina luční	M. Zelený, Nové město n. Metují	-

2.3. Přístrojové vybavení

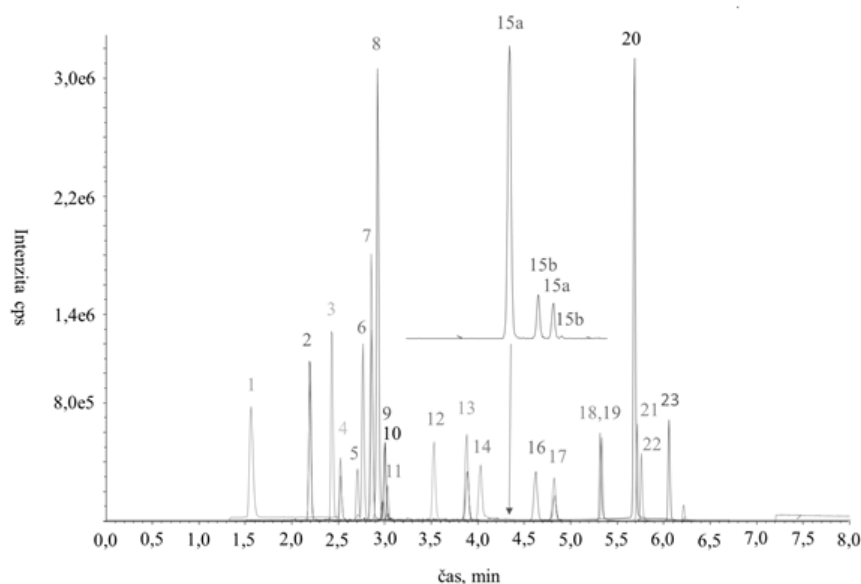
Látky s antioxidační aktivitou byly analyzovány na kapalinovém chromatografu, který byl složen ze dvou čerpadel LC-20AD, autosampleru SIL-20A, směšovače mobilní fáze DGU 20 (všechny Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatu kolon LCO 102 (Ecom, Praha, Česká republika) (AB Sciex, Framingham, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA).

2.4. HPLC/MS/MS analýza fenolických látek

Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 o délce 150 mm, průměru 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μm . Pro separaci byla zvolena teplota 30°C. Mobilní fáze byly složeny z destilované vody okyselené 0,3% kyselinou mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a dávkované množství vzorku bylo zvoleno 2 μl . Použitý gradient byl následující: 0 min - 10% B, 0.1 - 23% B, 3 min - 24% B, 4 min - 50% B, 5 min - 60% B, 6 min - 10% B.

3. Výsledky a diskuze

Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické separace dvaceti tři fenolických látek s cílem dosáhnout maximální rychlosti separace a minimální koeluce látek. Počáteční koncentrace acetonitrilu byla volena tak, aby nejméně zadržová kyselina gallová eluovala přibližně minutu za mrtvým objemem kolony. Tento čas byl potřebný pro odstranění polárních látek z matrice, které by ovlivňovaly MS analýzu. Z důvodu velkého zpoždění gradientu u použitého systému byla volena skoková změna koncentrace mobilní fáze pro urychlení eluce látek separujících se po kyselině gallové. Následovala optimalizace strmosti gradientu s cílem oddělit látky se stejnou molární hmotností či stejnými MRM přechody, tedy takové, jež nelze rozlišit pomocí hmotnostní spektrometrie. Zejména se jednalo o isomery kyseliny ferulové, které se strukturně velmi podobají a často dochází k jejich koeluci. Optimální eluce studovaných fenolických látek bylo dosaženo s využitím gradientové eluce s průběhem gradientu, který je uveden v experimentální části. Separace všech látek byla uskutečněna do 6 minut (obrázek 1).

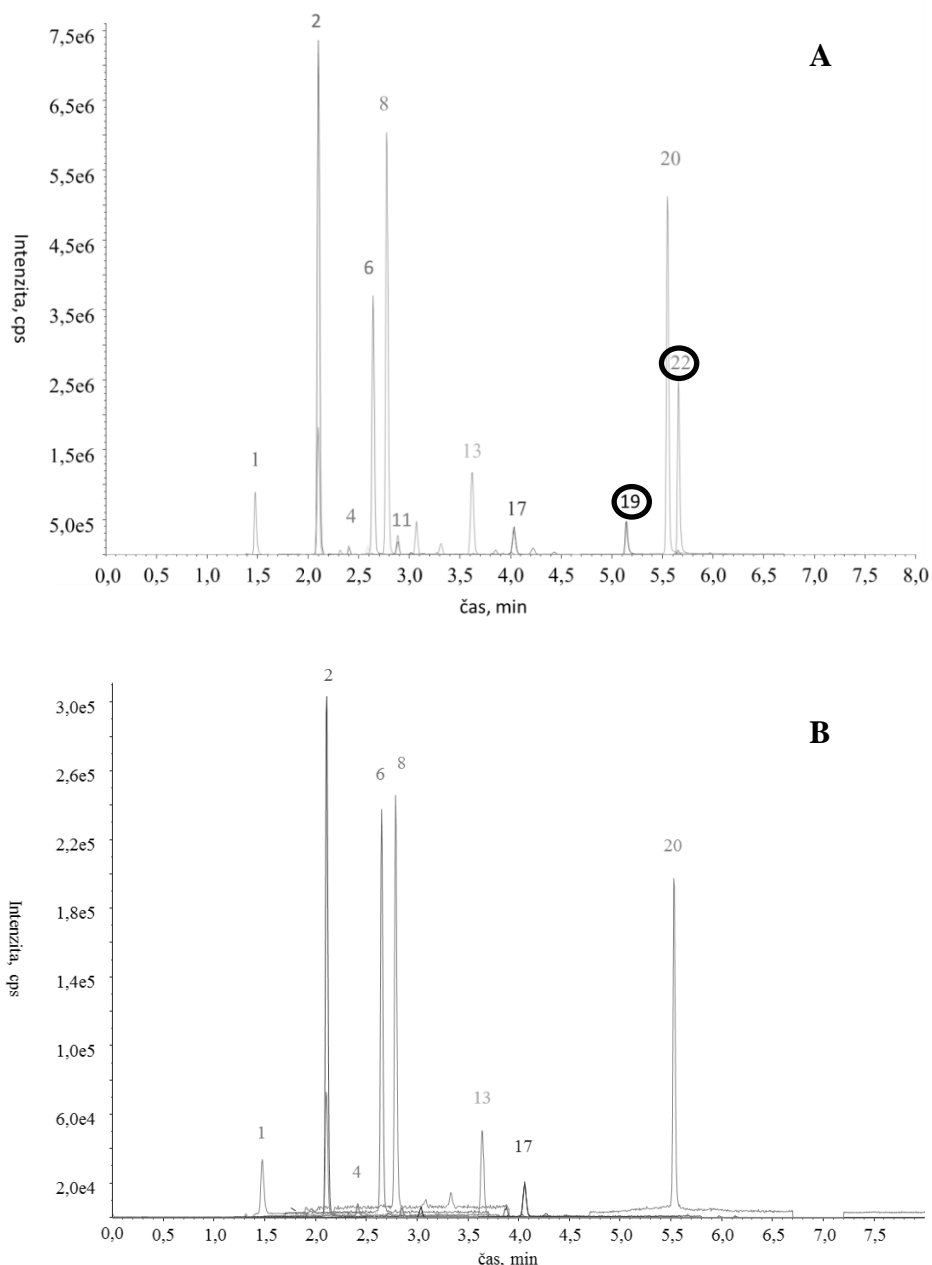


Obrázek 1: Optimalizovaná separace látek.

(1–gallová kyselina, 2–3,4-DHB, 3–chlorogenová kyselina, 4–katechin, 5–dihydroxybenzaldehyd, 6–4-HBA, 7–epikatechin, 8–kávová kyselina, 9–vanilová kyselina, 10–syringová kyselina, 11–gentisová kyselina 12–rutin, 13–p-kumarová kyselina, 14–vanilin, 15–isomery kyseliny ferulové (15a-trans-, 15-iso-forma), 16–taxifolin, 17–m-kumarová, 18–o-kumarová kyselina, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 21–luteolin, 22–kvercetin, 23–apigenin)

Pro kvantifikaci byla použita hmotnostní spektrometrie v MRM režimu. Jednotlivé MRM přechody byly optimalizovány pomocí přímé infúze standardů jednotlivých fenolických látek do hmotnostního spektrometru. Kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. V další části práce byl zkoumán vliv extrakčního kroku na obsah

fenolických sloučenin (obrázek 2). Obsah některých fenolických sloučenin byl v medovině bez předběžné úpravy výrazně nižší (obrázek 2B) než v extraktech (obrázek 2A). Zároveň se v extraktech podařilo identifikovat (a kvantifikovat) větší počet fenolických látek. Toto bylo pravděpodobně způsobeno jednak zakoncentrováním vzorku během extrakce a zároveň maticním efektem.

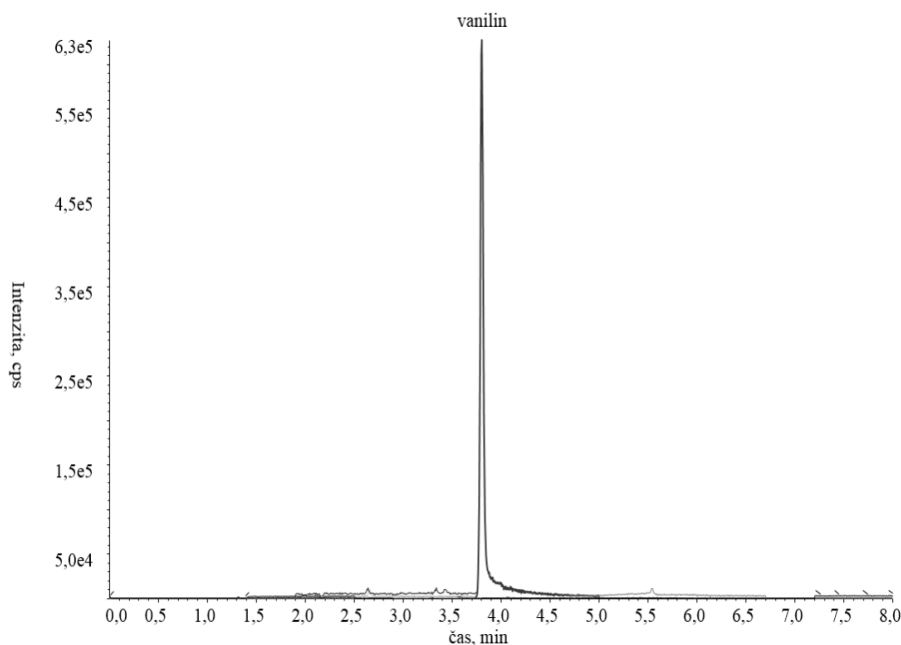


Obrázek 2: Rozdíl mezi extraktem (A) a neupravenou medovinou (B).

1–gallová, 2–protokatechová kyselina, 4–katechin, 6–4-hydroxybenzoová, 8–káвовá, 11–gentsiová, 13–p-kumarová, 17–m-kumarová kyselina, 19–myricetin, 20–salicylová kyselina, 22–kvercetin

Na záznamech analýz všech vzorků lze nalézt více či méně pestrou směs fenolických látek, až na záznamu analýzy jednoho vzorku (obrázek 3), kde dominuje pouze pík

odpovídající vanilinu. Jeho intenzita a tedy i nalezená koncentrace ve vzorku je o několik řádů vyšší ve srovnání s ostatními medovinami. Naopak ostatní fenolické látky nebyly v tomto vzorku nalezeny v měřitelných koncentracích. Z tohoto zjištění lze usuzovat, že pro výrobu této „medoviny“ nebyl použit žádný med, ale nejspíše jen cukr, případně glukózo-fruktózový sirup (invertní cukr) spolu vanilinem s dalšími přídatnými látkami.



Obrázek 3: Separace falšované medoviny.

4. Závěr

V této práci byla provedena kvantitativní analýza 23 vybraných polyfenolických sloučenin za použití RP-HPLC/MS/MS techniky. Optimalizace probíhala v systémech s obrácenými fázemi na koloně plněné povrchově porézními částicemi, Ascentis Express C18 pomocí gradientové eluce. Obsah fenolických látek byl stanoven pomocí optimalizované HPLC/MS metody s využitím MRM přechodů. Vyvinutá analytická metoda je poměrně rychlá, vlastní HPLC/MS analýza trvá pouze 6 minut, během kterých je detekováno 23 fenolických antioxidantů v medovinách.

Tato metoda byla aplikována na 22 vzorků medovin získaných od včelařů nebo zakoupených na místních trzích. Cílem této práce bylo stanovit tyto sloučeniny v medovině, protože obsah fenolických látek sloužit jako jeden z parametrů pro ověření kvality medoviny. Není-li v medovině nalezen obsah fenolických sloučenin, znamená to, že při výrobě medoviny nebyl použit žádný med nebo byl použit med nízké kvality. V naší studii byla nalezena pouze jedna medovina bez fenolických sloučenin, což může být pravděpodobně způsobeno falšováním výrobku.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Studentské grantové soutěže Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, projekt č. SGS_2018_001.

Literatura

- (1) IGLESIAS, A., PASCOAL, A., CHOUPINA, A. B., CARVALHO, A. A., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. *Molecules*. 2014. 19, 12577-12590.
- (2) PEREIRA, A. P., DIAS, T., ANDRADE, J., RAMALHOSA, E., ESTEVINHO, L. M. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47, 2057–2063.
- (3) KAHOUN, D., ŘEZKOVÁ, S., KRÁLOVSKÝ, J. Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition. *Food Chemistry*. 2017. 219, 357-363.
- (4) CHEYNIER, Véronique. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*. 2012. 11, (2), 153-177.
- (5) AMBRIZ-PÉREZ, D.L., LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P., HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. *Cogent Food & Agriculture*. 2016. 2, (1), 7-8.
- (6) PREYS, S., MAZEROLLES, G., COURCOUX, P., SAMSON, A., FISCHER, U., HANAFI, M., BERTRAND, D., CHEYNIER, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*. 2006. 563, 126-136.
- (7) KREUTZMANN, S., CHRISTENSEN, L. P., EDELENBOS, M. Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. *LWT-Food Science and Technology*. 2008. 41, 193.
- (8) PAIXAO, N., PERESTRELO, R., MARQUES, J. C., CAMARA, J. S. Relationship between Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Red, Rose and White Wines. *Food Chemistry*. 2007. 105, 204-214.
- (9) MATEJÍČEK, D., MIKEŠ, O., KLEJDUS, B., ŠTĚRBOVÁ, D., KUBÁŇ, V. Antioxidant content in romanian traditional distilled alcoholic beverages. *Food Chemistry*. 2005. 90, 791.
- (10) LUTHER, M., PARRY, J., MOORE, J., MENG, J., ZHANG, Y., CHENG, Z., YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of

- black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*. 2007. 104, 1065.
- (11) KÜPELI, E., SAHIN, F.P., CALIS, I., YESILADA, E., EZER, N. Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. 112, 356.
- (12) RODRÍGUEZ VAQUERO, M. J., ALBERTO, M. R., MANCA DE NADRA, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 2007. 18, 93.
- (13) KING, A., YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of The American Dietetic Association*. 1999. 99, 213.
- (14) GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential *cancer* chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*. 2005. 41, 1941.
- (15) PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009. 28, 7.
- (16) GÓMEZ-CARAVACA, A. M., GÓMEZ-ROMERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. 41, 1220–1234.
- (17) BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*. 2009. 1216, 6620-6626.
- (18) DAS, A.; DATTA, S.; MUKHERJEE, S.; BOSE, S.; GHOSH, S.; DHAR., P. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *Food Science and Technology*. 2015. 61, 244-250.
- (19) LIU, H., ZHANG, M., GUO, Y., QIU, H. Solid-phase extraction of flavonoids in honey samples using carbamate-embedded triacontyl-modified silica sorbent. *Food Chemistry*. 2016. 204, 56-61.
- (20) MICHALKIEWICZ, A., BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*. 2008. 1187, 18-24.
- (21) YAO, L., JIANG, Y., SINGANUSONG, R., D'ARCY, B., DATTA, N., CAFFIN, N., RAYMONT, K. Flavonoids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia*

- and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*. 2004. 37, 166-174.
- (22) IURLINA, M. O., FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. 105, 297-304.
- (23) ESCRICHE, I., KADAR, M., JUAN-BORRÁS, M., DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 2014. 142, 135–143.
- (24) YAO, L., DATTA, N., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., FERRERES, F., MARTOS, I., SINGANUSONG, R., Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*. 2003. 81, 159-168.
- (25) RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, W. M. A., ARIESE, F., GOOIJER, C., BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2006. 1112, 31-63.
- (26) DA SILVA, I. A. A., DA SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., QUEIROZ, N., MAGNANI, M., DE NOVAIS, J. S., SOLEDADE, L. E. B., LIMA, E. O., DE SOUZA, A. L., DE SOUZA, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 2013. 141, 3552-3558.
- (27) <http://laboratoryinfo.com/hplc> [cit. 2017-03-28]
- (28) ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003. 51, 2866–2887.
- (29) HAYES J. P., SMYTH M. R., MCMURROUGH I.: Comparison of electrochemical and ultraviolet detection in High-Performance Liquid Chromatography for the determination of phenolic compounds commonly found in beers. *Analyst*. 1987. 112: 1197–1207.
- (30) SHUI, G., LEONG, L.P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002. 977, 89.
- (31) GARCÍA, A. A., GRANDE, B. C., GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*. 2004. 1054, 175.

- (32) LIN, Y. T., VATTEM, D., LABBE, R. G., SHETTY, K. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*. 2005. 40, 2059.
- (33) KAHOUN, D., REZKOVÁ, S., VESKRNOVÁ, K., KRÁLOVSKÝ, J., HOLČAPEK, M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric–array and UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2008. 1202, 19–33.