

Profil proanthokyanidinů v pivu a jeho surovinách

The Proanthocyanidin Profile in Beer and Its Raw Materials

Jana OLŠOVSKÁ, Martin DUŠEK, Veronika ZUŠŤÁKOVÁ, Alexandr MIKYŠKA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, plc.,*

Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2

e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper*

Olšovská, J. – Zušťáková, V. – Dušek, M. – Mikyška, A.: Profil proanthokyanidinů v pivu a jeho surovinách. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 10–11, s. 296–304

Přítomnost proanthokyanidinů, látek patřících do široké skupiny polyfenolů, je v pivu obecně spíše nežádoucí a to vzhledem k jejich tendenci tvořit komplexy s proteiny, a tím zhoršovat jeho koloidní stabilitu. Na druhé straně, jsou tyto látky prospěšné díky schopnosti vázat volné radikály a tím zlepšovat senzoryckou stabilitu piva. Znalost profilu jednotlivých proanthokyanidinů v pivu a surovinách a jejich individuálního chování během celého technologického procesu by mohla napomoci při řešení úkolů spojených se zlepšováním senzorycké i koloidní stability piva. Proto byla vypracována nová metoda pro stanovení proanthokyanidinů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí s vysokým rozlišením. Metoda byla využita pro sledování změn profilu vybraných proanthokyanidinů během pivovarského procesu a následně také pro ověření specifity profilu proanthokyanidinů pro danou odrůdu českého chmele.

Olšovská, J. – Zušťáková, V. – Dušek, M. – Mikyška, A.: The proanthocyanidin profile in beer and its raw materials. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 10–11, pp. 296–304

The presence of proanthocyanidins, substances belonging to the general group of polyphenols in beer is generally rather undesirable due to their tendency to form complexes with proteins, and thereby degrade the colloidal stability of beer. On the other hand, these substances are useful because of their ability to bind free radicals and thereby improve sensory stability of beer. The knowledge of the profile of the proanthocyanidins in beer and raw materials and their individual behavior during the entire technological process could help to address the challenges associated with improving the sensory and colloidal stability of beer. Therefore, we have developed a novel method for determination of proanthocyanidins by liquid chromatography with high resolution mass detection. The method was used to monitor changes in the profile of selected proanthocyanidins during the brewing process and consequently to verify the specificity profile of proanthocyanidins for given variety of Czech hops.

Olšovská, J. – Zušťáková, V. – Dušek, M. – Mikyška, A.: Profil von Proanthokyanidinen im Bier und in seinen Rohstoffen. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 10-11, S. 296–304

Die Anwesenheit der Proanthokyanidine im Bier, die zur breiten Gruppe von Polyphenolen gehören, durch ihre Tendenz Komplexe mit Proteinen zu bilden und damit die kolloidale Stabilität des Bieres zu verschlechtern, ist vielmehr unerwünscht. Auf der anderen Seite sind diese Stoffe dank der Fähigkeit die freie Radikale zu binden, in der Lage die sensorische Stabilität des Bieres zu verbessern. Die Kenntnis des Profils von einzelnen Proanthokyanidinen im Bier und in den Rohstoffen, ihr individuelles Verhalten während des ganzen technologischen Prozesses könnte die Lösung der Problematik einer Verbesserung der kolloidalen und sensorischen Stabilität des Bieres helfen. Deswegen wurde eine neue Methode zur Proanthokyanidinenbestimmung mittels Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie mit hoher Auflösung gekoppelt ausgearbeitet. Diese Methode wurde zur Verfolgung der Profiländerungen von ausgesuchten Proanthokyanidinen während des Brauprozesses und anschließend auch die Spezifität des Profils von Proanthokyanidinen für gegebene Sorte des tschechischen Hopfens zu überprüfen, angewandt.

Klíčová slova: *proanthokyanidiny, pivo, slad, chmel, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením*

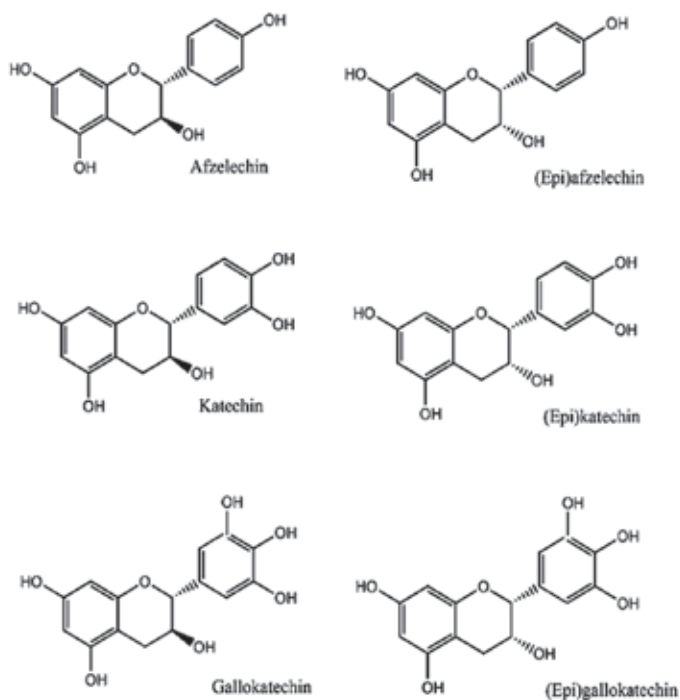
Keywords: *proanthocyanidins, beer, malt, hops, high performance liquid chromatography, high resolution mass spectrometry*

1 ÚVOD

Polyfenoly, sekundární metabolity produkované zejména rostlinami, jsou velkou a různorodou skupinou sloučenin, která obsahuje přes 8000 dosud popsanych sloučenin. (Haslam et al., 1994). Proanthokyanidiny, známé také jako kondenzované taniny neboli trísloviny, jsou v přírodě po ligninu druhou nejrozšířenější skupinou polyfenolů (Lazarus et al., 1999). Molekuly flavan-3-olů: páry isomerů katechinu a epikatechinu, gallokokatechinu a epigallokokatechinu, afzelechinu a epiafzelechinu (viz obr. 1) tvoří základní stavební jednotku kondenzovaných proanthokyanidinů. Tyto flavan-3-ol jednotky mají typickou C6-C3-C6 flavanoidní strukturu, která je tvořena třemi kruhy, dvěma aromatickými kruhy (kruhy A a C) a heterocyklickým kruhem B (Preddy et al., 2009). Kondenzací těchto jednoduchých katechinů vznikají proanthokyanidiny jako dimerní, oligomerní nebo až polymerní sloučeniny. Různorodost různých struktur proanthokyanidinů je dána jak vlastní variabilitou monomerních jednotek, tj. počtem hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích A a C, tak i stereochemií na asymetrickém uhlíku C3 na kruhu B. K variabilitě také přispívá vlastní typ interflavonoidní vazby, kde ke vlastní kondenzaci monomerních jednotek katechinů může dojít buď mezi uhlíkem C4 vyšší flavonoidní jednotky a uhlíkem C8 (vazba 4→8) nebo C6 (vazba 4→6) nižší flavonoidní jednotky (typ B), případně typ A, kde je vazba tvořena přes

1 INTRODUCTION

Polyphenols, secondary metabolites produced mostly by plants, are a large and diverse group of compounds, which contains over 8000 previously described compounds. (Haslam et al. 1994). Proanthocyanidins, also known as condensed tannins or tannins, are the second most common group of polyphenols in the nature of after lignin (Lazarus et al., 1999). Molecules of flavan-3-ols, pairs of isomers of catechin and epicatechin, epigallocatechin and galloocatechin, and afzelechin and epiafzelechin (see Fig. 1) are the basic structural units of condensed proanthocyanidins. The flavan-3-ol units are typically C6-C3-C6 flavanoid structures which are formed by three rings, the two aromatic rings (rings A and C) and a heterocyclic ring B (Preddy et al., 2009). Condensation of these simple catechins yields proanthocyanidins as dimeric, oligomeric or polymeric compounds. The diversity of the various structures of proanthocyanidins is given by the variability of monomeric units, i.e. the number of hydroxyl groups on both of the aromatic rings A and C and the stereochemistry at the asymmetric carbon C3 on ring B. The variability is also contributed by a specific type of an interflavonoid bond, wherein the self-condensation of the monomeric units of catechins can occur either between the carbon C4 of the higher flavonoid unit and C8 carbon (link 4→8) or 6 (4→6 linkage) of the lower flavonoid unit (type B), or the type A wherein the bond is formed via an ether bridge between



Obr. 1 Monomerní jednotky proanthokyanidinů (Predy et al., 2009) / Fig. 1 Monomer units of proanthocyanidins (Predy et al., 2009)

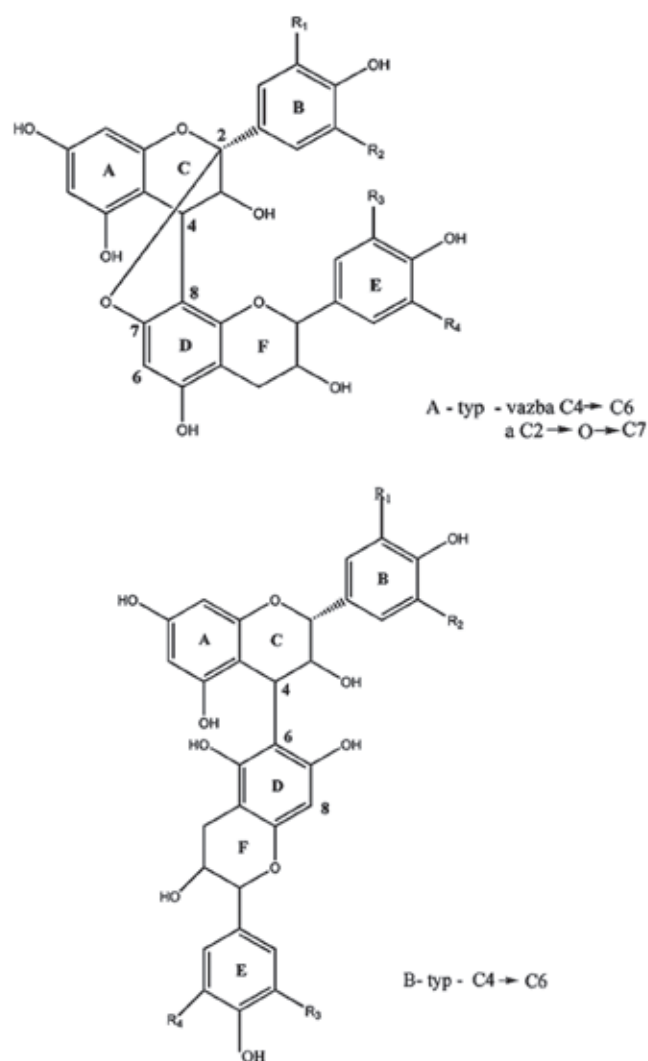
éterový můstek mezi uhlíky C2 a C7 ($2 \rightarrow O \rightarrow 7$) (Lazarus et al., 1999; Santos-Bueiga et al., 2000; Predy et al., 2009). Také další variabilita vzniká při samotné kondenzaci monomerních jednotek a vychází ze stereochemie těchto jednotek, přičemž 2,3-*cis* enantiomery tvoří [4 β]-interflavonoidní vazbu, zatímco 2,3-*trans* enantiomery [4 α]-interflavonoidní vazbu. Struktury dimerů typu A a B jsou zobrazeny na obr. 2.

Proanthokyanidiny, tvořené výhradně z jednotek katechinu a/nebo epikatechinu, jsou označovány jako prokyanidiny, a dále se dělí na prokyanidiny A a B podle typu interflavonoidní vazby (Predy et al., 2009). Skupina prokyanidinů B se nadále dělí na prokyanidiny s interflavonoidní vazbou (4 \rightarrow 8), což jsou prokyanidiny B1 (epikatechin-(4 β \rightarrow 8)-katechin), B2 (epikatechin-(4 β \rightarrow 8)-epikatechin), B3 (katechin-(4 α \rightarrow 8)-katechin), B4 (katechin-(4 α \rightarrow 8)-epikatechin), a na prokyanidiny s interflavonoidní vazbou (4 \rightarrow 6) – zde jde o prokyanidiny B5, B6 a B8. Další dobře popsanou skupinou jsou prodelfinidiny (viz obr. 3), které jsou tvořeny dimery obsahujícími společně monomerní jednotky katechinu a galokatechinu, jako je například prodelfinidin B3 (gallokatechin-(4 α 8)-katechin) a prodelfinidin B9 (epigallokatechin-(4 α \rightarrow 8)-katechin), které byly izolovány z piva (Stevens et al., 2002).

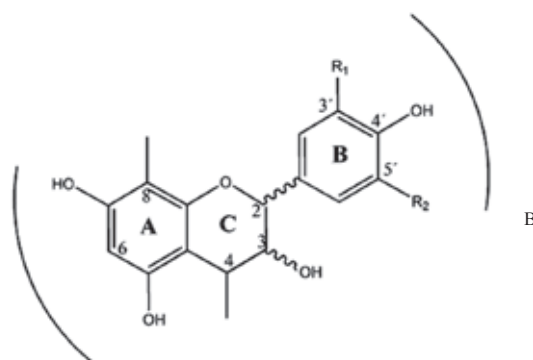
Vzhledem k tomu, že se proanthokyanidiny vyskytují v mnoha druzích rostlin, jsou přítomny také v řadě potravin a nápojů (Es-Safi et al., 2006). Běžně se vyskytují v bobulovitém ovoci (hroznech révy vinné, angreštu, černém a červeném rybízu, jeřabinách, černém bezu), v čaji a v různých ořeších (Prior et al., 2005). Jedním z významných zdrojů proanthokyanidinů je také pivo a sladové nápoje, neboť proanthokyanidiny jsou přirozenou složkou ječmene a chmele. V tab. 1 jsou uvedeny významné zdroje proanthokyanidinů a jejich průměrné koncentrace.

Proanthokyanidiny jsou oceňovány především pro své antioxidační vlastnosti, které jsou dány jejich schopností vychytávat volné radikály a alkyl peroxyl radikály. Jejich přítomnost v potravě a nápojích podporuje ochranu proti kardiovaskulárním onemocněním, imunitním poruchám a neurodegenerativním onemocněním. Biologická aktivita proanthokyanidinů závisí na chemické struktuře, koncentraci a stupni polymerace (Stevens et al., 2002; Hellstrom et al., 2008).

Během technologického procesu výroby piva se proanthokyanidiny obsažené ve chmelu a sladu snadno extrahují do piva díky své vysoké rozpustnosti (Predy et al., 2009). Průměrný obsah proanthokyanidinů v pivu se pohybuje okolo 20 mg.l⁻¹. Odhadované množství proanthokyanidinů, které je závislé na odrůdě chmele, geografickém původu rostliny, na průběhu sklizně a na čerstvosti chmelové suroviny, se pohybuje v rozsahu 0,5–5 % (Li et al., 2006). Dvořáková a kol. (2008) uvedli ve své práci průměrnou sumu proanthokyanidinů a fla-



Obr. 2 Struktura dimerů proanthokyanidinů (dimer B-typu s vazbou C4 \rightarrow C8 nebo s vazbou C4 \rightarrow C6, dimer A-typu s vazbou C4 \rightarrow C6 a C2-O-C7) (Predy et al., 2009) / Fig. 2 Structure of proanthocyanidin dimers (dimer of B-type with C4 \rightarrow C8 or C4 \rightarrow C6 bond, dimer of A-type with C4 \rightarrow C6 and C2-C7-O bond) (Predy et al., 2009)



Obr. 3 Základní struktura proanthokyanidinů: R₁, R₂ = H, propelargonidiny; R₁ = H, R₂ = OH, prokyanidiny; R₁, R₂ = OH, prodelfinidiny (Santos-Buelga et al., 2000) / Fig. 3 The basic structure of proanthocyanidins: R₁, R₂ = H, propelargonidins; R₁ = H, R₂ = OH, prokyanidins; R₁, R₂ = OH, prodelfinidins (Santos-Buelga et al., 2000)

carbons C2 and C7 ($2 \rightarrow O \rightarrow 7$) (Lazarus et al., 1999; Santos-Bueiga et al., 2000; Predy et al., 2009). Also, another variation arises during the actual condensation of monomeric units and is based on the stereochemistry of these units, the 2,3-*cis* enantiomers forming a [4 β]-interflavonoid bond, while 2,3-*trans* enantiomers [4 α]-interflavonoid bond. Structures of dimers A and B are shown in Fig. 2.

Tab. 1 Průměrný obsah proanthokyanidinů ve vybraných zdrojích (Wu et al., 2004; Gu et al., 2003) / *Table 1 Average content of proanthocyanidins in selected sources (Wu et al., 2004; Gu et al., 2003).*

| Zdroj proanthokyanidinů <i>Source of proanthocyanidins</i> | Průměrný obsah (mg/100 g) <i>Average content (mg/100 g)</i> |
|---|--|
| Ovoce / Fruit | |
| Černý rybíz / <i>Blackcurrant</i> | 147.8 ± 33.0 |
| Angrešt / <i>Gooseberry</i> | 134.0 ± 45.6 |
| Černý jeřáb / <i>Black rowan berry</i> | 663.7 ± 15.1 |
| Bez / <i>Lilacs</i> | 23.3 ± 11.2 |
| Červený rybíz / <i>Redcurrant</i> | 60.8 ± 2.3 |
| Broskve / <i>Peaches</i> | 67.3 ± 20.9 |
| Nektarinky / <i>Nectarines</i> | 22.8 ± 14.6 |
| Kiwi / <i>Kiwi</i> | 3.7 ± 1.6 |
| Brusinky / <i>Cranberries</i> | 418.8 ± 75.3 |
| Borůvky / <i>Blueberries</i> | 27.0 ± 17.5 |
| Ostružiny / <i>Blackberries</i> | 8.9 ± 0.1 |
| Maliny / <i>Raspberries</i> | 30.2 ± 23.4 |
| Jahody / <i>Strawberries</i> | 145.0 ± 24.9 |
| Zelené hrozno / <i>Green grapes</i> | 81.5 ± 15.0 |
| Červené hrozno / <i>Red grapes</i> | 61.0 ± 12.3 |
| Banány / <i>Bananas</i> | 4.0 ± 0.6 |
| Ořechy/ Nuts | |
| Pekanové / <i>Pecan</i> | 494.1 ± 86.2 |
| Lískové / <i>Hazelnuts</i> | 500.7 ± 152.0 |
| Pistácie / <i>Pistachios</i> | 237.3 ± 52.0 |
| Mandle / <i>Almonds</i> | 184.0 ± 48.2 |
| Vlašské / <i>Walnuts</i> | 67.3 ± 14.7 |
| Nápoje / Beverages | |
| Červené víno / <i>Red wine</i> | 313.0 ± 5.0 |
| Pivo / <i>Beer</i> | 23.0 ± 2.0 |
| Grepový džus / <i>Grapefruit juice</i> | 231.0 ± 2.0 |
| Jablkový džus / <i>Apple juice</i> | 9.0 ± 0.1 |
| Suroviny pro výrobu piva / Raw materials for beer production | |
| Chmel / <i>Hops</i> | 500 - 5000 v sušině (Li et al., 2006) |
| Slad* / <i>Malt*</i> | 35 – 85 |

*výsledky byly získány z databáze analytické laboratoře VÚPS, Praha / *The results were obtained from analytical laboratory database, the RIBM Prague

van-3-olů v různých odrůdách ječmene a příslušných sladech. Ve sladu byl zjištěn obsah 764 až 1422 mg CE/kg a v původním ječmeni 892 až 2000 mg CE/kg (CE=ekvivalent katechinu). Autoři se domnívají, že je tato skutečnost způsobena tepelnou úpravou ječmene, kdy při sladování dochází k degradaci těchto látek, což má za následek jejich nižší koncentraci v příslušném sladu.

Odhaduje se, že okolo 70–80 % proanthokyanidinů v pivu pochází z ječmene, zatímco pouze 20–30 % pochází z chmele (Stevens et al., 2002). Žádná přesnější studie však dosud nebyla publikována. Podle zatím dostupné literatury jsou proanthokyanidiny z chmele strukturně velmi podobné proanthokyanidinům v ječmeni (sladu), podle těchto pramenů je hlavní rozdíl ve vyšším podílu gallokatechinových oligomerních jednotek v ječmeni.

Obsah polyfenolů v meziproduktech pivovarské výroby a pivu je důležitý pro koloidní stabilitu výrobku. Proteiny, zejména proteiny bohaté na aminokyselinu prolin, tvoří s anthokyanogeny nerozpustné komplexy, které jsou příčinou nežádoucího zákalu piva při jeho skladování (Kadlec et al., 2009). Zákal o nižší intenzitě tvoří komplexy s monomery katechinu a epikatechinu, intenzivnější zákal způsobuje především prokyanidin B3, a zejména prodelfinidin B3 (Kadlec et al., 2009; Siebert et al., 1996).

Proanthocyanidins consisting exclusively of units of catechin and/or epicatechin are referred to as procyanidins, and are further divided into procyanidins A and B, according to the type of the interflavonoid bond (Predy et al., 2009). Group of procyanidins B further divides to procyanidins divided into procyanidins with interflavonoid bond (4→8), i.e. groups B1 (epicatechin-(4β→8)-catechin), B2 (epicatechin-(4β→8)-epicatechin), B3 (catechin-(4α→8)-catechin), B4 (catechin-(4α→8)-epicatechin) and procyanidins with interflavonoid bond (4→6) including procyanidins B5, B6 and B8. Another group includes the well described prodelfinidins (see Fig. 3), which are formed by dimers containing common monomeric units of catechin and gallo catechin, such as prodelfinidin B3 (gallo catechin-(4α→8)-catechin) and prodelfinidin B9 (epigallocatechin-(4α→8)-catechin) which have been isolated from beer (Stevens et al., 2002).

Since proanthocyanidins are present in many plant species, they are also present in many foods and beverages (Es-Safi et al., 2006). They are commonly found in berryformed fruits (grapes, gooseberries, black and red currants, rowanberries, black elderberry), in tea and various nuts (Prior et al., 2005). One of the major sources of proanthocyanidins is also beer and malt beverages, as proanthocyanidins are a natural component of barley and hops. Table 1 shows the major sources of proanthocyanidins and their average levels. Proanthocyanidins are especially valued for their antioxidant properties, which are determined by their ability to scavenge free radicals and alkyl peroxy radicals. Their presence in foods and beverages promotes protection against cardiovascular disease, immune disorders and neurodegenerative diseases. Biological activity of proanthocyanidins depends on the chemical structure, concentration and degree of polymerization (Stevens et al., 2002; Hellstrom et al., 2008).

During the technological process of beer production, proanthocyanidins contained in the hops and malt are easily extracted into the beer due to their high solubility (Predy et al., 2009). The average content of proanthocyanidins in beer is around 20 mg.l⁻¹. The estimated amount of proanthocyanidins, which is dependent on the variety of hops, the geographical origin of the plants, the course of the harvest and the freshness of the hop raw material is in the range of 0.5 - 5% (Li et al., 2006). Dvořáková et al. (2008) reported on the average amount of proanthocyanidins and flavan-3-ols in different varieties of barley and corresponding malts. The malt was found to contain 764 to 1422 mg CE/kg, and the main barley 892-2000 mg CE/kg (CE = catechin equivalent). The authors believe that this is caused by the heat treatment of barley in the malting which degrades these compounds, which results in their lower concentrations in the respective malt.

It is estimated that about 70 to 80% proanthocyanidins in beer originates from barley, while only 20 to 30% comes from the hops (Stevens et al., 2002). No accurate studies have as yet been published. Judging by the available literature, hop proanthocyanidins are structurally very similar to proanthocyanidins in barley (malt); according to these sources the main difference is in a higher share of gallo catechin oligomeric units in barley.

The content of polyphenols in beer production intermediates and beer is important for the colloidal stability of the product. Proteins, particularly proteins rich in the amino acid proline, form insoluble complexes with anthocyanogens causing undesirable haze during beer storage (Kadlec et al., 2009). A haze of lower intensity is formed by complexes with the catechin and epicatechin monomers, intense turbidity is caused mainly by procyanidins B3 and B3 and in particular prodelfinidin (Kadlec et al., 2009; Siebert et al., 1996).

In terms of positive contribution of proanthocyanidins, their balanced content is beneficial to the sensory profile of beer. These compounds have the ability to scavenge free radicals from beer (viz. the principle of natural antioxidants), and thereby slow down the oxidation of beer or stabilize its organoleptic characteristics and increase its sensory stability (Whittle et al., 1999). Furthermore, some of these substances affect the fullness of beer, its astringency and aftertaste (Langstaff et al., 1993). This fact should be considered when stabilizing beer because a disproportionate reduction in their content can affect the overall character of the finished beer.

Several methods have been developed in the past for the separation and identification of the structures of proanthocyanidin analogs. Taylor et al. separated proanthocyanidins extracted from hops by column chromatography on Sephadex LH-20 using gradient elution with a mobile phase constituted by methanol, water and acetone (Taylor et al., 2003). The resulting fractions were analyzed by two-dimensional thin layer chromatography and gel permeation chromatography. Final elucidation of the structures was carried out using

Z hlediska pozitivního příspěvku proanthokyanidinů k senzorickému profilu piva je jejich vyvážený obsah prospěšný. Tyto látky mají totiž schopnost odstraňovat z piva volné radikály (princip přirozených antioxidantů), a tím zpomalují oxidaci piva, neboli stabilizují jeho organoleptické vlastnosti a zvyšují jeho senzorickou stabilitu (Whittle et al., 1999). Mimoto některé tyto látky ovlivňují plnost piva, trpkost a dozrívání hořkosti (Langstaff et al., 1993). Tuto skutečnost je nutno uvážit při stabilizaci piva, neboť neúměrné snížení jejich obsahu může mít vliv na celkový charakter výsledného piva.

Pro separaci a identifikaci struktur analogů proanthokyanidinů bylo v minulosti vyvinuto několik metod. Taylor et al. separoval proanthokyanidiny extrahované z chmele na chromatografické koloně Sephadex LH-20 za použití gradientové eluce s mobilními fázemi tvořenými methanolem, vodou a acetonem (Taylor et al., 2003). Výsledné frakce byly analyzovány pomocí dvoudimenzionální tenkovrstevné chromatografie a gelové permeační chromatografie. Konečná elucidace struktur byla provedena pomocí hmotnostní detekce na MALDI-TOF, pomocí které Taylor popsal oligomerní struktury do stupně polymerace 15.

Magalhães et al. publikoval práci, ve které popsal separaci katechinu a epikatechinu, a dále objasnil strukturu více než 30 polyfenolických látek zahrnujících kromě proanthokyanidinů také např. xanthohumol a kvercetin. Tyto látky extrahoval z chmele, směs absorboval na PVPP (polyvinylpyrrolidon), a následně je desorboval směsí aceton/voda (7:3, v/v). Elucidace získaných sloučenin byla provedena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (Magalhães et al., 2010).

Li et al., který použil k identifikaci nově izolovaných proanthokyanidinů ze 13 odrůd chmele metody HPLC-APCI-MS (vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, chemická ionizace) a HPLC-ESI-MS (ionizace elektrosprejem), poprvé popsal závislost zastoupení jednotlivých analogů proanthokyanidinů ve vzorku chmele na jeho odrůdě (Li et al., 2006).

Jeho hypotéza byla ověřena ve studii autorů Olšovská et al., kteří potvrdili závislost profilu proanthokyanidinů na odrůdě chmele. Autoři provedli studii na odrůdách českého chmele (Sládek, Premiant, Žatecký poloraný červeňák a Agnus) ze sklizní 2011 (11 vzorků z 9 lokalit) a 2012 (40 vzorků z 24 lokalit). Kromě opakované odrůdové závislosti byla prokázána variabilita profilů v závislosti na lokalitě daného vzorku. Pro získání profilů studovaných látek byla v této práci použita technika UHPLC-TOF-MS (ultraúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí na principu doby letu), srovnávány byly profily 40 proanthokyanidinů s nejvyšším stupněm polymerace 5 (Olšovská et al., 2013).

Významnou studii týkající se obsahu a profilu anthokyanogenů v ječmeni provedl kolektiv autorů Whittle et al., který izoloval a identifikoval více než 50 struktur pomocí HPLC-ESI-MS (Whittle et al., 1999). Také Whittle zjistil významnou korelaci mezi profilem analogů proanthokyanidinů a odrůdou ječmene. Vyvinutá metoda však z důvodu časové náročnosti (150 minut) není vhodná pro rutinní stanovení.

Autoři Dvořáková et al. použili techniku HPLC-ESI-MS pro identifikaci monomerních a oligomerních flavan-3-olů v deseti odrůdách ječmene a příslušných sladech (Dvořáková et al., 2008).

Cílem této práce bylo vyvinout rychlou efektivní a reprodukovatelnou metodu pro stanovení proanthokyanidinů v pivu, jeho mezioduktech a surovinách s využitím nejmodernější instrumentální techniky, kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. K detekci byl použit hybridní hmotnostní detektor na bázi kvadrupólu a orbitální pasti. Metoda byla pilotně použita pro zjištění distribuce a chování některých proanthokyanidinů během výrobního procesu a ověření závislosti profilů proanthokyanidinů na chmelové odrůdě.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie

Aceton (99,9%), síran hořečnatý a chlorid sodný (p.a) (Lach:ner, Česká republika).

Acetonitril (99,9%), methanol (99,9%), kyselina mravenčí (pro LC-MS), probenecid ($\geq 98\%$) katechin ($\geq 99,0\%$), epikatechin ($\geq 97,0\%$), (Sigma-Aldrich, USA).

Prokyanidin A2 (99,84%), B1 ($>95\%$), B2 (95,38%) (Phytochem, Německo). Dusík (99,996%) (Messer, Německo).

Deionizovaná voda (vodivost $>18 \text{ M}\Omega$) (Milli-Q Integral 3, Merck Milipore, USA).

2.2 Příprava roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů proanthokyanidinů byly připraveny přesným navážením 1 mg standardu a následným rozpuštěním

mass spectrometry on MALDI-TOF, using which Taylor described oligomeric structures to the polymerization degree of 15.

Magalhães et al. described the separation of catechin and epicatechin, and also clarified the structure of more than 30 polyphenols including, apart from proanthocyanidins, also e.g. xanthohumol and quercetin. He extracted these substances from hops, absorbed the mixture on PVPP (polyvinylpyrrolidone) and subsequently desorbed them with acetone/water (7:3, v/v). Elucidation of resulting compounds was performed by liquid chromatography with mass detection (Magalhães et al., 2010).

Li et al. identified newly isolated proanthocyanidins from 13 hop varieties by HPLC-APCI-MS (high performance liquid chromatography with mass spectrometry, chemical ionization) and HPLC-ESI-MS (electrospray ionization). They were the first to describe the dependence of content of proanthocyanidin analogues in hops samples on hops variety (Li et al., 2006).

Their hypothesis was verified by Olšovská et al., who confirmed the dependence of the proanthocyanidin profile on the variety of hops. The authors conducted a study on Czech hops varieties (Sládek, Premiant, Saaz and Agnus) harvested in 2011 (11 samples from 9 locations) and 2012 (40 samples from 24 sites). In addition to repeated varietal dependence they demonstrated profile variability depending on the location of the sample. To obtain the profile of the studied compounds they used UHPLC-TOF-MS equipment (ultra-performance liquid chromatography with mass detection on the time-of-flight principle). 40 proanthocyanidin profiles were compared with the highest polymerization degree of 5 (Olšovská et al., 2013). An important study on the content and profile of anthocyanogens in barley was performed by Whittle et al., who isolated and identified more than 50 structures using HPLC-ESI-MS (Whittle et al., 1999). Whittle also found a significant correlation between the profile of proanthocyanidin analogues and barley variety. The method, however, is not suitable for routine determinations due to the time requirements (150 minutes).

Dvořáková et al. used the HPLC-ESI-MS technique to identify the monomeric or oligomeric flavan-3-ols in ten varieties of barley and corresponding malts (Dvořáková et al., 2008).

The aim of our study was to develop a rapid, efficient and reproducible method for the determination of proanthocyanidins in beer, intermediate products and raw materials using state-of-the-art instrumental techniques, liquid chromatography with mass spectrometry. The hybrid mass detector based on quadrupole and an orbital trap was used. The method was used to determine the distribution and behavior of some of proanthocyanidins during the manufacturing process and verification of the proanthocyanidin profiles as dependent on hop variety.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Acetone (99.9%), magnesium sulfate and sodium chloride (analytical grade) (Lach:ner, Czech Republic).

Acetonitrile (99.9%), methanol (99.9%), formic acid (LC-MS), probenecid ($\geq 98\%$), catechin ($\geq 99.0\%$), epicatechin ($\geq 97.0\%$) (Sigma-Aldrich, USA).

Procyanidins A2 (99.84%), B1 ($> 95\%$), B2 (95.38%) (Phytochemical, Germany). Nitrogen (99.996%) (Messer, Germany).

Deionized water (conductivity $> 18 \text{ Mohm}$) (Milli-Q Integral 3, Merck Millipore, USA).

2.2 Preparation of standard solutions

Stock solutions of proanthocyanidin standards were prepared by accurately weighing 1 mg of the standard and dissolving it in 1 mg.l⁻¹ of MeOH. Working solutions were prepared by diluting stock solutions to a final concentration of 1 mg.l⁻¹. The working solution was used to prepare ten calibration solutions (for individual proanthocyanidin standards) such that 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 and 800 ml of solution ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 100 ml of internal standard (probenecid, $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) was pipetted into ten glass vials and made up to a total volume of 1 ml by methanol/water (50:50, v/v). Working solutions were prepared always fresh. Stock solutions were stored in a freezer at -21°C .

2.3 Preparation of wort, green beer and beer samples by the QuEChERS method

Samples were taken during the brewing process from reproducible batches differing only in the hops variety. 10 ml of sample (sweet wort, wort, green beer or beer) was pipetted into a 50 ml plastic tube

v 1 ml MeOH. Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků na finální koncentraci 1 mg.l⁻¹. Z pracovního roztoku bylo připraveno deset kalibračních roztoků (pro jednotlivé standardy proanthokyanidinů) tak, že do deseti skleněných vialek se odpipetovalo 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 a 800 µl pracovního roztoku ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 100 µl vnitřního standardu (probenecid, $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) a vše bylo doplněno na celkový objem 1 ml roztokem methanol/voda (50:50, v/v). Pracovní roztoky byly připravovány vždy čerstvé. Zásobní roztoky byly uchovávány v mrazáku při -21 °C.

2.3 Příprava vzorků sladin, mladiny, mladého piva a piva metodou QuEChERS

Vzorky byly odebírány při varném procesu z reprodukovatelných várek lišících se pouze použitou odrůdou chmele. 10 ml vzorku (sladiny, mladiny, mladého piva nebo piva) bylo odpipetováno do plastové 50 ml kyvety (Pozn.: vzorek piva musel být před analýzou vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně pro odstranění oxidu uhličitýho). Ke vzorku bylo přidáno 10 ml acetonitrilu, kyveta byla důkladně uzavřena a vzorek byl 1 min intenzivně protřepán na třepačce. Následně byla do vzorku přidána směs solí, 4 g MgSO₄ a 1 g NaCl, a vzorek byl 1 min intenzivně protřepáván. Vzorek byl následně odstředěn při 5000 min⁻¹ po dobu 7 minut. Po odstředění bylo 300 µl organické fáze odpipetováno do 1,5 ml vialky, přidáno 50 µl vnitřního standardu probenecidu ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$), 600 µl destilované vody a 50 µl 2% mravenčí kyseliny ve vodě pro zvýšení stability proanthokyanidinů. Takto připravený vzorek byl následně dávkován na chromatografickou kolonu.

2.4 Příprava vzorků chmele

Pro získání profilů proanthokyanidinů ve chmelu byly použity vzorky chmele ze sklizně 2014. Vzorky pocházely z různých lokalit České republiky a jednalo se o odrůdy Žatecký poloraný červeňák (ŽPČ), Sládek, Agnus a Premiant. Přibližně 1 g sušených hlávek chmele rozemletých najemno v tříštivém mlýnku byl vložen do Erlenmayerovy baňky společně s 250 ml 70% acetonu s vodou. Volný prostor v baňce byl naplněn dusíkem tak, aby následující extrakce (třepání 40 minut) probíhala v inertní atmosféře. Poté byl vzorek přefiltrován přes skládaný filtr. Z filtrátu bylo odebráno 5 ml vzorku, který byl odpařen dosucha na vakuové odparce při 40 °C. Poté byl odparek v baňce rozpuštěn v 1 ml methanolu. Vzorek pro LC-MS analýzu byl připraven smícháním 200 µl chmelového extraktu s 20 µl vnitřního standardu a 780 µl destilované vody.

2.5 HPLC-HRMS analýza

Vzorky byly analyzovány na HPLC systému Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (Thermo-Q-Exactive, Thermo Scientific). Pro separaci látek byla použita chromatografická kolona XSELECT HSS T3 (2,1x100 mm, velikost částic 2,5 µm). Mobilní fáze byla tvořena roztoky 0,1% (obj.) mravenčí kyseliny ve vodě (A) a 0,1% (obj.) mravenčí kyseliny v acetonitrilu (B). Eluce probíhala v gradientovém

(Note: beer sample before analysis had to be placed for 10 minutes in an ultrasonic bath to remove carbon dioxide). To the sample was added 10 ml of acetonitrile, the cuvette was tightly closed and the sample was vigorously shaken for 1 min on a shaker. Subsequently, the sample was supplied with a mixture of salts, 4 g MgSO₄ and 1 g NaCl, and shaken vigorously for 1 min. The sample was then centrifuged at 5000 min⁻¹ for 7 minutes. After centrifugation, 300 µl of the organic phase was pipetted into a 1.5 ml vial 50 µl of an internal standard probenecid ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) was added along with 600 µl of distilled water and 50 µl of 2% formic acid in water to increase the stability of proanthocyanidins. The sample thus prepared was then applied on the chromatographic column.

2.4 Preparation of hops samples

Hops harvested in 2014 was used to obtain profiles of proanthocyanidins in hops samples. The samples came from different localities in the Czech Republic and included the Saaz (SDRs), Sládek, Agnus and Premiant varieties. Approximately 1 g of dried hop cones in a finely comminuted in a mincer was placed in an Erlenmeyer flask together with 250 ml of 70% acetone and water. Free space in the flask was filled with nitrogen so that subsequent extraction (40-min shaking) was carried out in an inert atmosphere. The sample then was filtered through a fluted filter. A 5 ml sample was collected from the filtrate and evaporated to dryness in a vacuum evaporator at 40 °C. Then, the residue in the flask was dissolved in 1 ml methanol. A sample for LC-MS analysis was prepared by mixing 200 µl of the hop extract with 20 µl of the internal standard and 780 µl of distilled water.

2.5 HPLC-HRMS analysis

Samples were analyzed on a Dionex HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific) system in conjunction with a high resolution mass spectrometer (Thermo-Q Exactive, Thermo Scientific). Chromatographic column XSELECT HSS T3 (2,1x100 mm, particle size 2.5 µm) was used for separation of substances. The mobile phase consisted of a 0.1% (vol.) formic acid in water (A) and 0.1% (vol.) formic acid in acetonitrile (B). Elution was carried out in the gradient mode (min/B) of 0/5, 1/5, 13/70, 18/100, 22-25/5. The total time of separation was 25 minutes. The column temperature was 40 °C. Flow rate of mobile phase was 0.4 ml.min⁻¹. The volume of sample injected on the column was 2 µl.

MS/MS experiment was performed in negative ionization mode using resolution 35000 and a 2 Da isolation window. MS/MS data were acquired using the "Data Independent Acquisition" (DIA) mode, when the selected precursor masses were fragmented in HCD (Higher- Energy Collisional Dissociation) collision cell and the analytes were detected and quantified based on the specific product ions in MS/MS fragmentation spectra (see Table 2). The measured signals were recorded and processed using the Thermo Xcalibur 2.2 software. Subsequently, the data were exported into the OriginPro 8.5 program (OriginLab, USA), to be further processed.

Tab. 2 MS parametry pro sledované analyty a skupiny analytů z fragmentačního MS/MS spektra (normalizované kolizní energii NCE: 30) / Table 2 MS parameters for the analytes and the analytes from the fragmentation MS/MS spectrum (normalized collision energy NCE: 30).

| Proanthokyanidin Proanthocyanidin | t_R (min) | Sumární vzorec Summary formula | Mateřský ion Parent ion m/z [M-H] ⁻ | Kvantifikační ion Quantification ion m/z |
|---|----------------|---|--|--|
| K | 4.8 | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ | 289.1 | 125.0242 |
| EK | 6.2 | | | |
| (E)G | | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ | 305.1 | 125.0242 |
| (E)K-(E)A | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁ | 531.1 | 289.0720 |
| (E)K-(E)K Prokyanidin B1 / Procyanidin B1 | 5.2 | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.1 | 407.0775 |
| (E)K-(E)K Prokyanidin B3/ Procyanidin B3 | 4.5 | | | |
| (E)K-(E)K Prokyanidin B/ Procyanidin B | 5.8 | | | |
| (E)K-(E)K Prokyanidin A2 / Procyanidin A2 | 8.8 | C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂ | 575.1 | 289.0720 |
| (E)K-(E)G | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ | 593.1 | 407.0775 |
| (E)G-(E)G | | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄ | 609.1 | 125.0242 |
| (E)K-(E)K-(E)K | | C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ | 865.1 | 407.0775 |

K – catechin, EK- epikatechin, (E)K – catechin nebo epikatechin – nerozlišeno, (E)A-afzelechin nebo epiafzelechin – nerozlišeno, (E)G-gallo-catechin nebo epigallokatechin – nerozlišeno

K – catechin, epicatechin EK-, (E)K – catechin or epicatechin – unspecified, (E)A-afzelechin or epiafzelechin – unspecified, (E)G – gallo-catechin or epigallocatechin – unresolved

módu (min/B) 0/5, 1/5, 13/70, 18/100, 22–25/5. Celková doba separace byla 25 minut. Teplota kolony byla 40 °C. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml.min⁻¹. Objem vzorku dávkový na kolonu byl 2 µl.

MS/MS experiment byl měřen v negativním ionizačním módu, při použitím rozlišení 35000 a izolačním oknu 2 Da. MS/MS data byla získána použitím módu „Data independent acquisition“ (DIA), kdy vybrané hmoty prekurzorů byly fragmentovány v HCD (Higher-Energy Collisional Dissociation) kolizní cele a sledované analyty byly detekovány a kvantifikovány na základě specifických produktových iontů v MS/MS fragmentačních spektrech (viz tab. 2).

Naměřené signály byly zaznamenávány a zpracovány pomocí softwaru Thermo Xcalibur 2.2. Následně byla data exportována do programu OriginPro 8.5 (OriginLab, USA), kde byla dále zpracována.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace metody

Při optimalizaci metody byla testována hodnota normalizované kolizní energie, s cílem získat MS/MS spektra pro reprodukovatelnou a správnou kvantifikaci.

Normalizovaná kolizní energie (NCE) byla optimalizována tak, aby získaná MS/MS spektra obsahovala reprodukovatelnou a dobře vypovídající fragmentaci. Z testovaných hodnot NCE 20, 30 a 40 byla jako optimální zvolena hodnota 30, při které byla získána reprodukovatelná MS/MS spektra s bohatou fragmentací. Při použití NCE 20 nedocházelo k dostatečné fragmentaci iontů. Naopak při použití vyšší NCE než 30, docházelo až k příliš rozsáhlé fragmentaci iontů, která byla pro vyhodnocení nepřehledná.

3.2 Interní validace metody

Kalibrace metody byla provedena v koncentračním rozmezí od 5 do 200 µg.l⁻¹. V tomto koncentračním rozsahu byla zjišťována linearita signálu hmotnostního detektoru (plochy příslušného píku). Každý bod kalibrační křivky příslušného standardu byl vypočten z šesti opakovaných měření. Ze získaných hodnot ploch, normalizovaných na plochu interního standardu, byly sestaveny kalibrační křivky a vypočteny rovnice regrese a hodnoty determinačního koeficientu R², viz tab. 3.

Z kalibračních křivek byl odvozen limit kvantifikace (LOQ) jako nejnižší bod kalibrační křivky, který splňuje kritérium RSD opakovatelnosti menší než 20 %.

Pro ověření opakovatelnosti metody byl připraven vzorek chmelu (Sládek) šestkrát stejným postupem. Poté byly extrakty změřeny a následně byla vypočítána koncentrace (mg.kg⁻¹). Ze získaných koncentrací vybraných proanthokyanidinů (catechin, epicatechin, prokyanidin B1 a prokyanidin B2) byla vypočtena relativní směrodatná odchylka průměru RSD %, která vyjadřuje opakovatelnost metody (viz tab. 4). Pro všechny analyzované standardy byla RSD menší než 20 %, což svědčí o dobré opakovatelnosti metody.

Výtěžnost metody byla stanovena tak, že byly určeny hodnoty koncentrací vybraných látek v původním chmelu. Tyto vzorky byly obohaceny roztoky standardů na dvou koncentračních úrovních, a to o koncentracích odpovídajících původní 50% a 100% koncentraci. Z rozdílu obsahu analytů v původním chmelu a chmelu s přídatkem byla vypočtena výtěžnost zvlášť pro každou koncentrační úroveň (50 a 100% přídatku, viz tab. 4). Výtěžnost se na obou koncentračních hladinách pohybovala v rozsahu 98–118 %, což svědčí o dobré výtěžnosti metody. V souladu s již dříve popsány výsledky je tedy 70% acetone pro extrakci proanthokyanidinů z chmele optimální (Predy et al., 2009; Taylor et al., 2003). Z dobré výtěžnosti metody lze také usuzovat na dobré separační podmínky a podmínky MS detekce.

3.3 Aplikace metody

Optimalizovaná metoda byla použita pro sledování koncentračního profilu flavan-3 olů a proanthokyanidinů (catechin, epicatechin,

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of the method

The optimization of the method involved testing the value of normalized collision energy in order to obtain MS/MS spectra for reproducible and correct quantification.

Normalized collision energy (NCE) was optimized so as to obtain MS/MS spectra containing reproducible and readily informative fragmentation. The value of 30 was chosen as the optimum from the tested NCE values 20, 30 and 40; it gave reproducible MS/MS spectra with a rich fragmentation. When using the NCE 20, the fragmentation of ions was insufficient. Conversely, when using NCE higher than 30 the fragmentation of ions was too extensive, which stymied the evaluation.

3.2 Internal validation of the method

Calibration of the method was performed in the concentration range from 5 to 200 µg.l⁻¹. In this concentration range we determined the linearity of the mass detector signal (area of the relevant peak). Each point of the calibration curve of an appropriate standard was calculated from six repeated measurements. Calibration curves were constructed from the values of the areas normalized to the area of the internal standard and regression equations and the value of the determination coefficient R² were calculated, see Table 3.

The calibration curves were used to derive the limit of quantification (LOQ) as the lowest point of the calibration curve which satisfies the repeatability criterion RSD lower than 20%.

To verify the repeatability of the method, a sample of hops (Sladek) was prepared six times with the same procedure. The extracts were measured and the concentration (mg.kg⁻¹) was calculated. Relative standard deviation of the mean RSD %, which indicates the repeatability of the method (see Table 4), was calculated from the obtained concentration of selected proanthocyanidins (catechin, epicatechin, procyanidin B1 and procyanidin B2). RSD was less than 20% for all analyzed standards, indicating good repeatability of the method.

The yield of the method was established by determining the concentrations of selected substances in the original hops. These samples were enriched with standard solutions at two concentration levels, corresponding to the initial concentrations of 50% and 100% concentration. The difference between the content of the analytes in the original hops and hops with the addition served for calculating the yield separately for each concentration level (50 and 100% addition, see Tab. 4). The yield at both concentration levels ranged from 98 to 118%, indicating a good yield of the method. In accordance with the previously described results 70% acetone is therefore optimal for extraction of proanthocyanidins from hops (Predy et al., 2009; Taylor et al., 2003). The good yield of the method also indicates good conditions of separation and MS detection.

3.3 Application of the method

The optimized method was used for monitoring the concentration profile of flavan-3-ols and proanthocyanidins (catechin, epicatechin, procyanidin B1, B2, B3) during the brewing process (Fig. 4, 5, 6, 7 and 8). Concentration profiles of catechin, epicatechin, procyanidin B1 and B2 have the same pattern. In wort, when individual proanthocyanidins are derived only from barley, the concentration of these substances is initially low. After wort boiling their concentration increases significantly, suggesting that these substances originate mainly from hops. Subsequently, during the main fermentation and maturation, their concentration decreases (precipitation with proteins).

A different behavior is seen with the concentration profile for procyanidin B3, which has the highest concentration in wort and then decreases linearly. From this dependence it can be concluded that procyanidin B3 is not contained in hops.

Furthermore, the graph shows that the concentration of catechin in wort (Fig. 4) during hopping differs for various different hop vari-

Tab. 3 Kalibrace metody v rozsahu 5 µg.l⁻¹ až 200 µg.l⁻¹, LOQ a jeho RSD % / Table 3 Calibration of the method in the range of 5 µg.l⁻¹ – 200 µg.l⁻¹, LOQ and its RSD %

| Analyt Analyte | Rovnice regrese Regression equation | R ² | LOQ [µg.l ⁻¹] | RSD % |
|---------------------------------|--|----------------|---------------------------|-------|
| Katechin / Catechin | y = 0.00044 c – 0.00323 | 0.9996 | 10 | 2.4 |
| Epikatechin / Epicatechin | y = 0.00109 c – 0.00662 | 0.9986 | 5 | 12.6 |
| Prokyanidin B1 / Procyanidin B1 | y = 0.00060 c – 0.00323 | 0.9951 | 10 | 9.7 |
| Prokyanidin B2 / Procyanidin B2 | y = 0.000091c – 0.00669 | 0.9935 | 10 | 5.2 |

Tab. 4 Opakovatelnost a výtěžnost metody / Table 4 Repeatability and recovery of the method

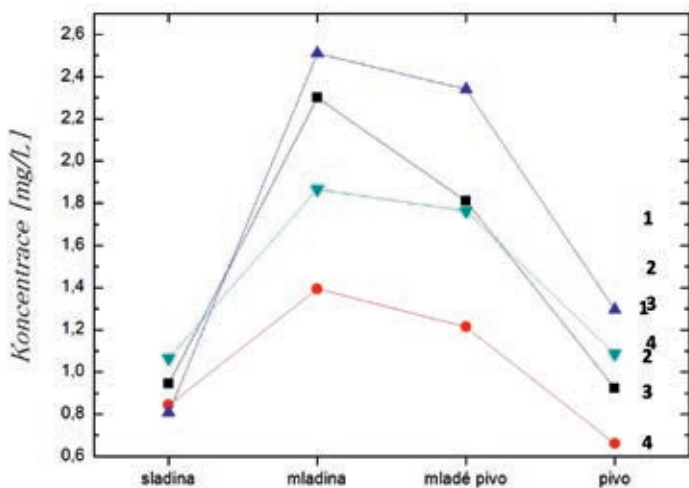
| Analyt Analyte | Opakovatelnost Repeatability RSD % | Výtěžnost s 50% přidavkem Yield with 50% addition | Výtěžnost s 100% přidavkem Yield with 100% addition |
|---------------------------------|--|---|---|
| Katechin / Catechin | 16.5 | 113 | 100 |
| Epikatechin / Epicatechin | 13.6 | 100 | 98 |
| Prokyanidin B1 / Procyanidin B1 | 19.7 | 111 | 118 |
| Prokyanidin B2 / Procyanidin B2 | 14.0 | 103 | 114 |

prokyanidin B1, B2 a B3) během pivovarského varního procesu (obr. 4, 5, 6, 7 a 8). Koncentrační profily katechinu, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2 mají stejný průběh. Ve sladidě, kdy jednotlivé proanthokyanidiny pocházejí pouze z ječmene, je koncentrace těchto látek zprvu nízká. Po chmelovaru jejich koncentrace výrazně stoupá, z čehož lze usuzovat, že tyto látky pocházejí převážně z chmele. Následně se v průběhu hlavního kvašení a zrání piva jejich koncentrace snižuje (precipitace s bílkovinami).

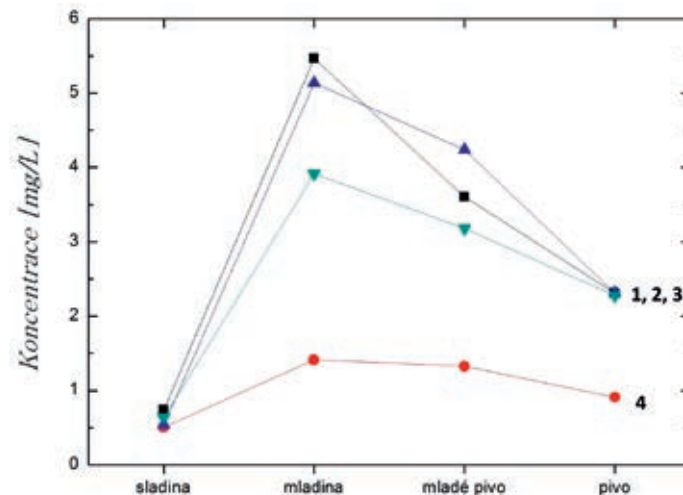
Rozdílný průběh má koncentrační profil prokyanidinu B3, jehož koncentrace je nejvyšší ve sladidě, a poté lineárně klesá. Z této závislosti lze vyvodit, že prokyanidin B3 není obsažen ve chmelu.

eties. Epicatechin concentration in wort (Fig. 5) for Kazbek variety coincides with that for hops 4980 (modification of Saaz hops). The concentration of procyanidins B1 in the wort has the same hop 4979 (modification SDRs) and Saaz. Procyanidin B2 concentration in wort is the same in both samples of modification Saaz 4979 and 4980. These samples contain about a five times higher B2 concentration compared to variety Kazbek. The small scatter of B3 content in wort (Fig. 8) is given by the uncertainty of measurement and the technology of sample preparation.

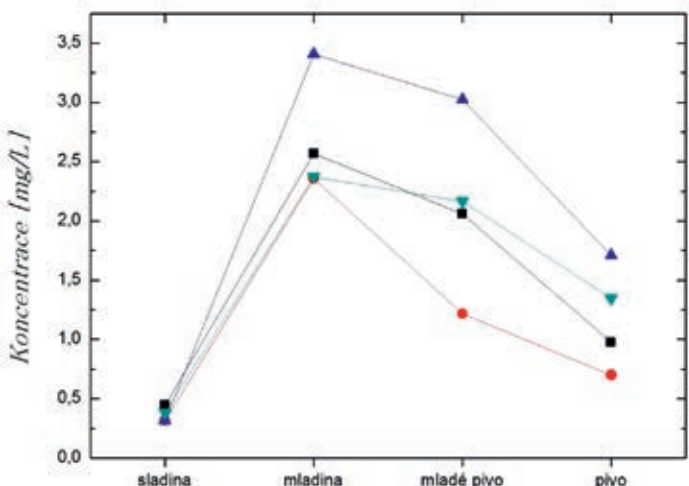
Like the previously described methods (Olšovská et al., 2013; Li et al. 2006) this method was also used for monitoring the specificity



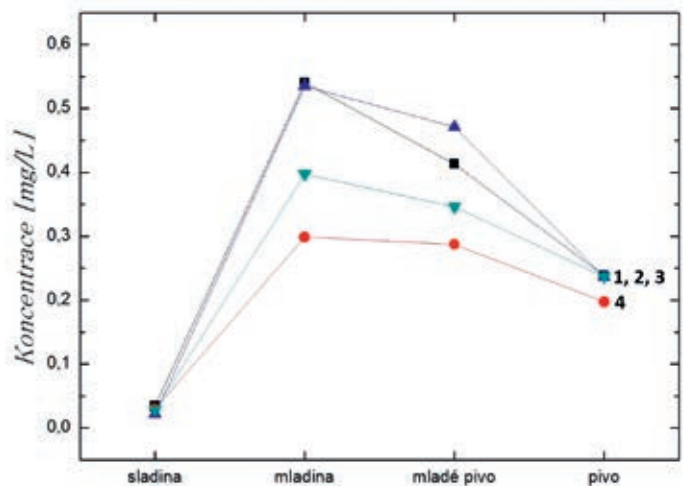
Obr. 4 Koncentrační profil katechinu během varního procesu. 1 – modifikace ŽPČ 4979, 2 – modifikace ŽPČ 4980, 3 – ŽPČ, 4 – Kazbek / Fig. 4 Catechin concentration profile during the brewing process 1 – Saaz modification 4979, 2 – Saaz modification 4980, 3 – Saaz, 4 – Kazbek



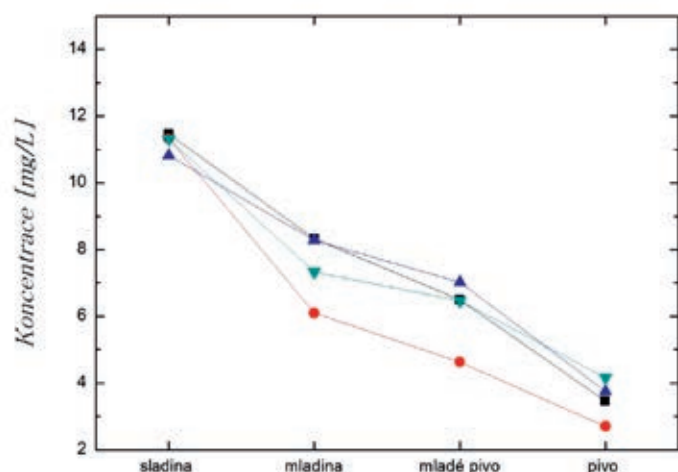
Obr. 6 Koncentrační profil prokyanidinu B1 během varního procesu. 1 – modifikace ŽPČ 4979, 2 – modifikace ŽPČ 4980, 3 – ŽPČ, 4 – Kazbek / Fig. 6 Concentration profile of procyanidin B1 during the brewing process 1 – Saaz modification 4979, 2 – Saaz modification 4980, 3 – Saaz, 4 – Kazbek



Obr. 5 Koncentrační profil epikatechinu během varního procesu. 1 – modifikace ŽPČ 4979, 2 – modifikace ŽPČ 4980, 3 – ŽPČ, 4 – Kazbek / Fig. 5 Epicatechin concentration profile during the brewing process 1 – Saaz modification 4979, 2 – Saaz modification 4980, 3 – Saaz, 4 – Kazbek



Obr. 7 Koncentrační profil prokyanidinu B2 během varního procesu. 1 – modifikace ŽPČ 4979, 2 – modifikace ŽPČ 4980, 3 – ŽPČ, 4 – Kazbek / Fig. 7 Concentration profile of procyanidin B2 during the brewing process 1 – Saaz modification 4979, 2 – Saaz modification 4980, 3 – Saaz, 4 – Kazbek



Obr. 8 Koncentrační profil prokyanidinu B3 během varního procesu. 1 – modifikace ŽPČ 4979, 2 – modifikace ŽPČ 4980, 3 – ŽPČ, 4 – Kazbek / Fig. 8 Concentration profile of procyanidin B3 during the brewing process 1 – Saaz modification 4979, 2 – Saaz modification 4980, 3 – Saaz, 4 – Kazbek

Dále je z grafů patrné, že koncentrace katechinu v mladině (obr. 4) je při chmelení různými odrůdami chmele rozdílná. Koncentrace epikatechinu v mladině (obr. 5) se shoduje u odrůdy Kazbek s chmelem 4980 (modifikace ŽPČ). Koncentraci prokyanidinu B1 v mladině má shodnou chmel 4979 (modifikace ŽPČ) a ŽPČ. Prokyanidin B2 v mladině má stejnou koncentraci v obou vzorcích modifikace ŽPČ 4979 a 4980; tyto vzorky obsahují asi pětinašobně vyšší koncentraci B2 oproti odrůdě Kazbek. Malý rozptyl obsahu B3 v mladině (obr. 8) je dán nejistotou měření a technologií přípravy vzorku.

Podobně jako dříve popsané metody (Olšovská et al., 2013; Li et al. 2006) byla vypracovaná metoda také použita pro sledování odrůdové specifity chmele na základě skupin proanthokyanidinů, které jsou uvedeny v tab. 3. Získané profily testovaných padesáti vzorků chmele byly statisticky zpracovány.

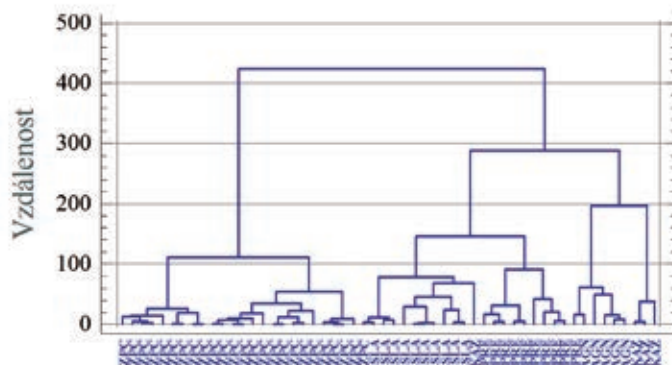
Výsledky klastrové analýzy relativního zastoupení monomerních jednotek a oligomerů, proanthokyanidinů (obr. 9) zcela jasně odlišily odrůdy chmele, a to i z pohledu genetické příbuznosti odrůd. České odrůdy s podílem ŽPČ v genomu se od tohoto tradičního chmele odlišují méně nežli odrůdy vzdálené. Geneticky vzdálené jsou odrůdy Kazbek a Agnus, které se řadí do skupiny amerických chmelů (Atlas českých odrůd chmele, 2012). Kazbek má v původu plané kavkazské chmele, Agnus odrůdy ŽPČ, Sládek, Bor, Fuggle a Northern Brewer. Bližší ŽPČ jsou odrůdy chmele Sládek a Premiant. Obě tyto odrůdy mají v původu významný podíl ŽPČ. Je zřejmé, že genetický původ chmele koresponduje s chemotaxonomickým profilem proanthokyanidinů chmele. Výsledky získané novou metodou plně potvrdily závěry předchozí studie (Olšovská et al., 2013).

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky separace proanthokyanidinů ve vybraných pivovarských surovinách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením a následně tuto metodu využít pro sledování profilu vybraných proanthokyanidinů (katechin, epikatechin, prokyanidin B1, B2 a B3) během pivovarského procesu. Byl potvrzen předpoklad, že jednotlivé koncentrace se během procesu mění. Koncentrace katechinu, epikatechinu, prokyanidinu B1 a B2 v mladině prudce stoupla oproti koncentraci ve sladince, z čehož vyplývá, že tyto látky jsou při varním procesu extrahovány z použitého chmele. Naopak prokyanidin B3 pochází pouze z ječmene, neboť jeho koncentrace během varního procesu lineárně klesá. Výsledný pokles všech sledovaných PAs je způsoben technologickým procesem při výrobě piva (precipitace s bílkovinami a následné odstraňování kaš). Dále bylo potvrzeno, že profil proanthokyanidinů je specifický pro danou odrůdu českého chmele.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována za podpory MZE-RO1014-Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin.



Obr. 9 Klastrová analýza. Odrůdová specifita chmele (ZPC – Žatecký poloraný červeňák, SLA – Sládek, PRE – Premiant, AGN – Agnus, KAZ – Kazbek) / Fig. 9 Cluster analysis. Varietal specificity of hops (ZPC – Saaz, SLA – Sládek, PRE – Premiant, AGN – Agnus, KAZ – Kazbek)

of hop varieties based on the groups of proanthocyanidins shown in Table 3. The resulting profiles of the fifty hop samples tested were statistically processed.

The results of cluster analysis of the relative representation of monomeric units and oligomers of proanthocyanidins (Fig. 9) clearly distinguish the varieties of hops, even in terms of genetic relatedness. Czech hops varieties with a share of Saaz in the genome differ from this traditional hop less than remote varieties. Varieties Kazbek and Agnus are genetically distant as they belong to a group of American hops (Atlas of Czech hop varieties, 2012). Kazbek has a Caucasian origin of wild hop varieties, Agnus is near the varieties Saaz, Sládek, Bor, Fuggle and Northern Brewer. Nearer to Saaz hops are varieties Sládek and Premiant. Both these varieties possess a significant proportion of Saaz. It is clear that the genetic origin of hops corresponds with the chemotaxonomic profile of hops proanthocyanidins. Results obtained by the new method fully confirmed the conclusions of previous studies (Olšovská et al., 2013).

4 CONCLUSIONS

The aim of this study was to optimize the conditions for the separation of proanthocyanidins in selected brewing materials by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry and then use this method to monitor the profile of selected proanthocyanidins (catechin, epicatechin, procyanidin B1, B2 and B3) during the brewing process. It confirms the assumption that the individual concentrations change during the brewing process. The concentration of catechin, epicatechin, procyanidin B1 and B2 in the wort rose sharply relative to the concentration in the sweet wort, indicating that in the brewing process these substances are extracted from the hops. Conversely, procyanidin B3 comes only from barley, because its concentration during the brewing process decreases linearly. The resulting decline in all monitored PAs is due to the technological process in the production of beer (precipitation with proteins and subsequent sludge removal). It was also confirmed that the profile of proanthocyanidins is specific for given variety of Czech hops.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was developed with the support of CR Ministry of Agriculture RO1014 project "Quality research and processing of malting and brewing raw materials".

LITERATURA / REFERENCES

- Atlas českých odrůd chmele / Czech hop varieties, 2012: Chmelářský institut, Žatec, Česká Republika.
- Dvořáková, M., Moireira, M.M., Dostálek, P., Skulilová Z., Guido, L.F., Barros, A.A., 2008: Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barely and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1189: 398–405. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.080.
- Es-Safi, N-E., Guyot, S., Ducrot, P-H., 2006: NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS Analysis of Pear Juice Polymeric Proanthoxyanidins with Potent Free Radical Scavenging Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6969–6977. DOI: 10.1021/jf061090f
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, L., 2003: Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Destimations of Normal Consumption. *The Journal of nutrition*, 134(3): 613–617.
- Haslam, E., Cai, Y., 1994: Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat. Prod. Rep.*, 11: 41–66. DOI: 10.1039/NP9941100041
- Hellström, J.K., Mattila, R.H., 2008: HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 7617–7624. DOI: 10.1021/jf801336s.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M., 2009: Technologie potravin. Co byste měli vědět o výrobě potravin. KEY Publishing s.r.o., Ostrava.
- Langstaff, S. A., Lewis, M. J., 1993: The mouthfeel of beer—a review. *J. Inst. Brew.*, 99 (1): 31–37. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1993.tb01143.x.
- Lazarus, S.A., Adamson, G. E., Hammerstone, J. F., Schmitz H.H., 1999: High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3693–3701. DOI: 10.1021/jf9813642.
- Li, H. J., Deinzer, M. L., 2006: Structural Identification and Distribution of Proanthocyanidins in 13 Different Hops. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4048–4056. DOI: 10.1021/jf060395r.
- Magalhães, P.J., Viera, J.S., Gonçalves, L.M., Pacheco, J.G., Guido, L.F., Barros, A.A., 2010: Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217: 3258–3268. DOI:10.1016/j.chroma.2009.10.068.
- Olšovská, J., Kameník, Z., Čejka, P., Jurková, M., Mikyška, A., 2013: Ultra-high-performance liquid chromatography profiling method for chemical screening of proanthocyanidins in Czech hops. *Talanta*, 116, 919–926. DOI:10.1016/j.talanta.2013.07.067
- Preedy, V. R. (Ed.), 2011: Beer in health and disease prevention. Academic Press, Elsevier.
- Prior, L.R., Gu, L., 2005: Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66: 2264–2280. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.03.025.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000: Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, Review. *Journal Sci.Food Agric.*, 80: 1094–1117. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1094::AID-JSFA569>3.0.CO;2-1.
- Siebert, K.J., Aurea C., Penelope Y. L., 1996: Formation of protein–polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* 44(8): 1997–2005. DOI:10.1021/jf950716r
- Stevens, J. F., Miranda, C. L., Wolthers, K. R., Schimerlik, M., Deinzer, M. L., Bulher, D.R., 2002: Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of nNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3435–3443. DOI: 10.1021/jf0116202
- Taylor, A.W., Barofsky, E., Kennedy, J.A., Deinzer, M.L., 2003: Hop (*Humulus lupulus* L.) Proanthocyanidins Characterized by Mass Spectrometry, Acid Catalysis, and Gel Permeation Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4101–4110. DOI: 10.1021/jf0340409
- Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J., 1999: Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical Detection. *J. Inst. Brew.*, 105: 89–99. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00011.x.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S., 2004: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aro-nia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 52(26): 7846–7856. DOI: 10.1021/jf0486850.

Do redakce došlo / Manuscript received: 4. 7. 2015
Přijato k publikování / Accepted for publication: 11. 8. 2015