

Polyfenoly ječmene a sladu a jejich antioxidační vlastnosti

Barley and malt polyphenols and their antioxidant properties

MARKÉTA DVOŘÁKOVÁ¹, PAVEL DOSTÁLEK¹, ZUZANA SKULILOVÁ¹, MARIE JURKOVÁ², VLADIMÍR KELLNER², LUIS F. GUIDO³

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic*

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

³REQUIMTE – Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

e-mail: pavel.dostalek@vscht.cz

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Skulilová, Z. – Jurková, M. – Kellner, V. – Guido, L. F.: Polyfenoly ječmene a sladu a jejich antioxidační vlastnosti. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 3, s. 160–163.

Deset různých odrůd ječmene a jejich odpovídajících sladů byly analyzovány na obsah monomerních a oligomerních flavan-3-olů metodou HPLC-UV-ESI-MS. Pro stanovení celkových flavan-3-olů byla použita vanilínová metoda, pro stanovení celkových polyfenolů metoda Folin-Ciocalteu a pro měření antioxidační kapacity byly aplikovány metody DPPH a FRP. Katechin a prodelfinidin B3 byly stanoveny jako hlavní monomerní a dimerní flavan-3-oly. Mimoto prodelfinidin B3 nejvíce přispívá k antioxidační kapacitě jak ječmene, tak i sladu. U stejných vzorků byly stanoveny jednotlivé frakce, a to volné, esterifikované a vázané polyfenoly. Největší podíl na obsahu celkových polyfenolů měla frakce vázaná. Katechin a kyselina ferulová, stanovené pomocí HPLC-DAD, byly nejvíce zastoupené fenolové sloučeniny jak ve volné, tak ve vázané formě. Antioxidační kapacita jednotlivých frakcí byla měřena metodou DPPH a FRP. Dále byla aplikována extrakce horkou vodou, abychom se co nejvíce přiblížili pivovarské technologii. Vzorky byly analyzovány z hlediska antioxidační kapacity a obsahu jednotlivých polyfenolů. Pro měření antioxidační kapacity byly porovnány následující metody DPPH, FRAP a ITT. Obsah celkových polyfenolů, měřený metodou Folin-Ciocalteu, byl pozitivně korelován se všemi použitými metodami pro měření antioxidační kapacity. Volné polyfenoly byly stanoveny metodou HPLC s elektrochemickou detekcí, z nichž nejdominantnější byla kyselina ferulová.

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Skulilová, Z. – Jurková, M. – Kellner, V. – Guido, L. F.: Barley and malt polyphenols and their antioxidant properties. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 3, p. 160–163.

Ten different barley cultivars and their corresponding malts were analysed for monomeric and oligomeric flavan-3-ols content by using high-performance liquid chromatography ultraviolet detection-electrospray ion trap mass spectrometry. The Folin-Ciocalteu and the vanillin spectrophotometric assays were used for the assessment of the total polyphenol and total flavan-3-ol content respectively, and the antioxidant activity was determined by DPPH and FRP. Catechin and prodelfinidin B3 were respectively the major monomeric and dimeric flavan-3-ols. Moreover, prodelfinidin B3 was shown to be the main contributor for the radical scavenging activity both for barley and malt. The same samples were used to obtain different fractions. The contribution of bound phenolics to the total polyphenol content was significantly higher than that of free and esterified fractions. Catechin and ferulic acid, quantified by HPLC-DAD, were the most abundant phenolics in the free and bound fractions, respectively. The antioxidant activities of phenolic fractions were investigated using the radical scavenging assay (DPPH) and the ferricyanide reducing power (FRP). Further the hot water extracts of barley cultivars and corresponding malts were analyzed. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) and radical scavenging activity (ABTS) and indicator time test (ITT) were compared. The total polyphenol content, as measured according to Folin-Ciocalteu's method, was positively correlated with all antioxidant methods used. Free phenolic compounds were measured by HPLC with CoulArray detector. The dominant phenolic compound was ferulic acid.

Dvořáková, M. – Dostálek, P. – Skulilová, Z. – Jurková, M. – Kellner, V. – Guido, L. F.: Die Gersten- und Malzpolyphenole und ihre Antioxidations-eigenschaften. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 3, S. 160–163.

Durch Methode HPLC-UV-ESI-MS wurden zehn verschiedenen Gersten- und Malzsorten an Gehalt von Monomer- und Oligomerflavan-3-ols analysiert. Für die Bestimmung von gesamten Flavan-3-ols wurden eine Vanilin Methode, für die Bestimmung von gesamten Polyphenolen die Folin-Ciocalteu Methode, für die Messung der Antioxidationsaktivität die DPPH und FRP Methoden angewandt. Als die Hauptmonomer- und Dimer Flavan-3-ols wurden Katechin und Prodelfinidin B3 bestimmt. Prodelfinidin B3 ferner am meisten zur Antioxidationsaktivität sowohl der Gerste als auch des Malzes beiträgt. Die einzelne Fraktion und zwar freien, esterifizierten und gebundenen Polyphenole wurden an den gleichen Mustern festgestellt. Der größte Anteil an gesamten Polyphenolgehalt wies die gebundene Fraktion aus. Die meist vertretene Phenolverbindungen in der sowohl freier als auch in gebundener Form wurden durch die HPLC-DAD festgestellten Katechin und Ferulasäure. Durch die DPPH und FRP Methoden wurde die Antioxidationskapazität von einzelnen Fraktionen gemessen. Um die Brautechnologie zu kopieren, wurde eine Extraktion mit Heißwasser appliziert. Aus dem Gesichtspunkt der Antioxidationskapazität und des Gehalts an einzelnen Polyphenolen wurden die Muster analysiert. Für die Messung der Antioxidationskapazität wurden die Methoden DPPH, FRAP und ITT verglichen. Der durch die Folin-Ciocalteu Methode gemessene Gehalt an gesamten Polyphenolen wurde positiv mit allen für die Messung der Antioxidationskapazität angewandten Methoden korreliert. Durch die Methode HPLC mit elektrochemischer Detektion wurden die freien Polyphenole festgestellt, die meist dominante wurde Ferulasäure.

Klíčová slova: ječmen, slad, pivo, polyfenoly, antioxidační kapacita, FRAP, catechin, prodelfinidin B3

Keywords: barley, malt, polyphenols, antioxidant capacity, catechin, prodelfinidin B3

1 ÚVOD

Je známo, že pivo obsahuje širokou paletu fenolových sloučenin, z kterých většina pochází z pivovarských surovin – ječného sladu a chmele. Asi 80 % fenolových sloučenin pochází ze sladu a zbýva-

1 INTRODUCTION

Beer is known to contain a wide variety of phenolic compounds, most of which originate from the raw materials of brewing, that is barley malt and hop. About 80 % of phenolic compounds originate from

jících 20 % přichází s chmelem [1,2,3]. Nicméně antioxidanty nebo antioxidanty se strukturou polyfenolů jsou také obsaženy v ječmeni a sladu a současné studie ukazují, že obilniny obsahují více fytochemikálií, než se původně myslelo [4].

U těchto fenolových sloučenin v ječmeni je známo, že mají antioxidační a antiradikálové vlastnosti. Tyto vlastnosti přispívají k inhibici oxidační deteriorace piva [4]. Fenolové sloučeniny hrají důležitou roli rovněž při stanovení stability piva a jeho senzoryckých charakteristik.

Vzhledem k vlivu fenolů na kvalitu piva jsou metody analýzy fenolových sloučenin velmi důležité pro pivovarníky [5]. Řada metod pro stanovení fenolových sloučenin již byla publikována [6].

Cílem této práce bylo analyzovat pivovarské suroviny – ječmen a slad – z hlediska jejich antioxidační kapacity a obsahu jednotlivých polyfenolů a vztahu obsahu těchto látek a antioxidační kapacity. Analýzy ječmene a sladu zahrnovaly analýzu volných, rozpustných esterově vázaných a nerozpustných vázaných fenolových frakcí. Studium jejich vzájemných vztahů a jejich příspěvků k antioxidační kapacitě bylo vyvoláno zájmem o tuto problematiku. Stanovení monomerních a oligomerních proanthokyanidinů nám umožnilo najít souvislost jejich obsahu s celkovým obsahem polyfenolů a také s antioxidačními vlastnostmi. Většina vědců souhlasí s tvrzením, že proanthokyanidiny hrají hlavní roli v tvorbě nebiologických zákalů piva [3]. Pro extrakci, separaci a stanovení polyfenolů byly testovány různé techniky a byla použita HPLC-UV, -CoulArray, a -ESI-MS detekce.

2 JEČNĚ A SLADOVÉ POLYFENOLY

Obilná zrna obsahují komplexní směs fenolů a polyfenolů. Ječné zrnko a slad byly z tohoto hlediska již zkoumány, stejně tak jako fenoly z čiroku. Zdá se, že ječmen a čirok jsou jediné obiloviny, ve kterých se nachází polymerní flavanoly [7].

V ječném zrně byla nalezena široká paleta sloučenin s fenolovou strukturou, které mají antioxidační účinky (deriváty kyseliny benzoové, skořicové, proanthokyanidiny, kyanidiny, chinony, flavonoly, chalcony, flavony, flavanony a aminofenolové sloučeniny [8,9,10]).

Fenolové sloučeniny byly v cereáliích nalezeny jak ve volné, tak i vázané formě. Obvykle volné fenolové sloučeniny jsou proanthokyanidiny nebo flavonoidy, zatímco vázané sloučeniny jsou esterově vázané do polymerů buněčné stěny (arabinoxylany, lignin). Ve vázaných polymerech je nejvíce zastoupena kyselina ferulová a její dehydromer [8].

Flavan-3-oly představují hlavní třídu fenolů ječmene. Vyskytují se v monomerní formě, jako (+)-katechin (C) a (-)-epikatechin, a polymerní formě, které se skládají hlavně z jednotek katechinu a (+)-gallokatechinu (GC). Nejčastěji a v nejvyšších koncentracích vyskytující se dimer je prodelphinidin B3 (GC-C) a prokyanidin B3 (C-C) [8]. Hlavními trimery jsou prokyanidin C2, proanthokyanidin T4 (C-C-C) a trimerní proanthokyanidiny T1, T2 a T3, které se skládají ze dvou jednotek katechinu (C) a jedné jednotky gallokatechinu (GC) spojené spolu C4-C8 vazbami. Obsah monomerních, dimerických a trimerních flavan-3-olů činí 58–68 % celkového obsahu polyfenolů [11]. Největší zastoupení mají trimerní flavan-3-oly. Monomerní flavan-3-oly jsou bezbarvé, v kontrastu s tím polymerní flavan-3-oly po zahřátí v kyselém butanolu na vzduchu tvoří anthokyanové pigmenty. Díky značnému vylepšení analytických metod byla nalezena celá řada sloučenin z této skupiny. V jedné studii bylo odlišeno sedm dimerů, devatenáct trimerů, dvacet tři tetramerů a sedm pentamerů [12]. Ve sladu je přítomen z flavan-3-olů katechin 25–75 mg/kg, prodelphinidin B3 186–372 mg/kg, prokyanidin B3 130–276 mg/kg [13]. Fenolové kyseliny přítomné v ječmeni můžeme rozdělit do dvou skupin – substituované deriváty kyseliny benzoové a substituované deriváty kyseliny skořicové [7,8,14]. Hydroxybenzoová a hydroxyskořicová kyselina jsou také přítomné ve formě glykosidických esterů v ječném zrně [15]. Trans-ferulová kyselina je hlavní látkou vedle p-kumarové a vanilové kyseliny, které byly také detekovány [9]. Jsou přítomny hlavně v aleuronové vrstvě a endospermu. Jejich glykosidické estery byly nalezeny v pluchách, štitku a aleuronových buňkách. Endosperm obsahoval pouze stopy vázaných nerozpustných fenolových kyselin [15]. Kyseliny hydroxyskořicová a hydroxybenzoová jsou známy jako primární antioxidanty působící jako akceptory volných radikálů [9]. Ferulová kyselina se často vyskytuje jako volná a vázaná na arabinosová rezidua v pentosanech a uvolňuje se do sladiny během rmotování při optimální teplotě 45 °C. Během varu nebo účinkem některých bakterií a divokých kvasinek se určitá část ferulové kyseliny decarboxyluje za vzniku 4-vinylguajakolu, látky, která ve většině piv způsobuje nežádoucí příchut [16]. Nicméně u pšeničných piv je přítomnost této látky žádoucí.

barley malt, and remaining 20 % come from hop [1,2,3]. However, antioxidants or phenolic structured antioxidant compounds are also detected in barley and malt, and recent studies have shown that cereals contain more phytochemicals than previously considered [4]. Those phenolic compounds in barley are known to possess antioxidant and antiradical properties. Therefore to inhibit the oxidative deterioration of beer, natural antioxidants of barley need to be protected [4]. Phenolic compounds play an important role in determination of beer stability and flavour characteristic. Because of their effect on beer quality, methods of analysis of phenolic compounds are of a great importance to brewers [5]. A number of methods for the analysis of phenolic compounds in beer and brewing materials have been reported [6].

The scope of this work was to analyze brewing raw materials, such as barley and malt from the point of their antioxidant activity and the content of individual phenolics and their relationship. Barley and malt analysis comprises the determination of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic fractions. Study of their relationship and contribution on antioxidant capacity evoke a possible interest. The determination of monomeric and oligomeric proanthocyanidins enables us to find their relation with total polyphenol content as well as antioxidant properties. Most investigators agree in attributing to proanthocyanidins the main role in the formation of non-biological hazes in beer [3]. Various techniques for polyphenols extraction and purification from different matrices have been tested and different measurement of individual phenolics, such as HPLC-UV, -CoulArray, and -ESI-MS detection were used.

2 BARLEY AND MALT POLYPHENOLS

Cereal grains contain a complex mixture of phenols and polyphenols. Barley grain and malt have been the most studied, but sorghum phenols in special cultivars have been studied as well. Barley and sorghum seem to be alone among the cereals in possessing polymeric flavanols [7].

A wide range of antioxidant compounds with a phenolic structure has been found in barley grain, such as benzoic, cinnamic acid derivatives, proanthocyanidins, quinones, flavonols, chalcones, flavones, flavanones, and amino phenolic compounds [8,9,10]. Phenolic compounds are found in both free and bound form in cereals. Generally, the free phenolic compounds are proanthocyanidins or flavonoids, while the bound phenolic compounds are ester-linked to cell-wall polymers (arabinoxylans, lignin), ferulic acid and its dehydromer derivatives being the major phenolic compound present [8].

Flavan-3-ols constitute the major class of phenolics in barley. They appear in monomer form, (+)-catechin (C) and (-)-epicatechin, and polymer forms constituted mainly by units of catechin and (+)-gallo-catechin (GC). The most abundant dimers are prodelphinidin B3 (GC-C) and procyanidin B3 (C-C) [8]. The main trimers are procyanidin C2, so-called trimeric proanthocyanidin T4 (C-C-C) and trimeric proanthocyanidins T1, T2 and T3 constituted by two units of C and one unit of GC linked together by C4-C8 bonds. Monomeric, dimeric and trimeric flavan-3-ols accounted for 58-68 % of the total phenolic content [11], with a predominance of trimeric flavan-3-ols. The monomeric flavan-3-ols are colorless. In contrast, polymeric flavan-3-ols materials give rise to anthocyanin pigments when heated in acidic butanol in air. As analytical methods have improved, so the great complexity of this group of substances has been recognized. In recent study dimers (7), trimers (19), tetramers (23), and pentamers (7) were recognized [12]. Concentration of some flavan-3-ols in barley malts are catechin 25–75 mg/kg, prodelphinidin B3 186–372 mg/kg, procyanidin B3 130–276 mg/kg [13].

The phenolic acids present in barley can be divided into two groups, the substituted benzoic acid and the substituted cinnamic acid [7,8,14]. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids are also present as free forms and as glycosidic esters in barley grains [15]. Trans-ferulic acid is the major compound besides p-coumaric and vanillic acids which have also been detected [9]. They were mainly present in aleurone layer and endosperm. Their glycosidic esters were detected in the husk, test and aleurone cells. Endosperm contained only trace amounts of insoluble-bound phenolic acids [15]. Hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids are known equally as primary antioxidants acting as free radical acceptors and chain breakers [9]. Ferulic acid occurs free and attached to some arabinose residues in pentosans and it is released into wort during mashing, with an optimum temperature about 45 °C. During boiling or under the influence of some bacteria and wild yeast some ferulic acid is decarboxylated to yield

3 VÝSLEDKY

Bylo studováno deset odrůd ječmene (jarní ječmen – sklizeň 2005) vypěstovaných na dvou pokusných polních plochách (Kroměříž, Žabčice, Česká republika) a z nich vyrobených odpovídajících sladů. Amulet, Bojos, Jersey, Prestige, Malz, Sebastian a Tolar byly sladařské odrůdy a Merlin, KM 1910 a KM 2084 byly bezpluché odrůdy. Všechny vzorky ječmene byly sesladvány ze stejných podmínek [17].

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a hmotnostní detekcí (elektrosprej, iontová past) byly kvantifikovány monomerní a oligomerní flavan-3-oly v 10 odrůdách ječmene a odpovídajících sladech. Metoda Folin–Ciocalteu a vanilinová spektrofotometrická metoda byly použity pro zhodnocení celkového obsahu polyfenolů a flavan-3-olů. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl) a FRAP. Katechin byl hlavním monomerním a prodelphinidin B3 byl hlavním dimerním flavan-3-olem. Mimo to, prodelphinidin B3 byl hlavní látkou s nejsilnější antioxidační kapacitou v ječmeni a sladu [18].

Deset různých odrůd ječmene a jejich odpovídajících sladů bylo použito ke získání různých frakcí. Extrahované fenoly byly rozděleny do tří frakcí – volné, rozpustné estery a nerozpustné vázané fenoly. Celkový obsah fenolů (TPC) těchto tří frakcí měřený Folin–Ciocalteu metodou byl od 37,7 do 167,2 mg ekvivalentu kyseliny galové/kg sušiny (GAE/kg suš.) pro ječmen a od 34,1 do 72,3 mg GAE/kg suš. pro slad. Obsah vázaných fenolů byl od 210,3 do 320,5 GAE/kg suš. pro ječmen a od 81,1 do 234,9 mg GAE/kg suš. pro slad. Příspěvek vázaných fenolů k TPC byl významně vyšší než příspěvek volných nebo esterifikovaných frakcí fenolů. Katechin a ferulová kyselina, které byly kvantifikovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC–DAD), byly nejvíce zastoupené fenoly ve volných a vázaných frakcích. Obsah kyseliny p-kumarové byl nižší v bezpluchých odrůdách ve srovnání s odrůdami obsahujícími pluchy, což znamená, že její obsah je vázán na oblast pluchy. Antioxidační aktivity fenolových frakcí byly zkoumány pomocí DPPH a FRAP metod. Vázané fenoly vykazovaly zřetelně vyšší antioxidační kapacitu ve srovnání s volnými a esterifikovanými fenoly. Během sladařského procesu bylo zaznamenáno značné snížení vázaných polyfenolů a naopak došlo ke zvýšení esterifikované frakce [19].

Extrakty horkou vodou (45 °C) deseti odrůd ječmene a jejich odpovídajících sladů byly analyzovány na antioxidační kapacitu. Antioxidační kapacity měřené metodami FRAP (ferric reducing antioxidant power) a ABTS se pohybovaly mezi 0,23–0,45 mg GAE/g sušiny pro slad a 0,12–0,25 mg GAE/g sušiny pro ječmen. Bezpluchý slad KM 1910 byla odrůda s nejlepšími antioxidačními vlastnostmi, zatímco nejvyšší antioxidační kapacita pro ječmen byla zjištěna u odrůdy Merlin. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi metodami FRAP, ABTS a ITT ($p < 0,01$). Byl studován vliv hnojení (20 kg N/ha) na antioxidační kapacitu ječmene. Získané výsledky ukazují, že vliv hnojení na antioxidační vlastnosti není zřejmý a že závisí hlavně na odrůdě. Obsah celkových polyfenolů, měřený metodou Folin–Ciocalteu, se pohyboval mezi 0,6–2,9 mg GAE/g sušiny a pozitivně koreloval s výsledky získanými všemi metodami na měření antioxidační kapacity ($p < 0,01$). Volné fenolové sloučeniny byly stanoveny pomocí HPLC s CoulArray detektorem. Dominantní fenolová sloučenina byla kyselina ferulová a její obsah byl 12,5–21,9 mg/g sušiny pro ječmen a 7,8–56,1 mg/g sušiny pro slad. Obsah katechinu byl 11,0–17,0 mg/g sušiny pro ječmen a 0,9–12,1 mg/g sušiny pro slad [20].

Poděkování

Práce byla podporována projektem 1M0570 (Výzkumné centrum pro studium obsahových látek ječmene a chmele) a výzkumným záměrem MSM6046137305 – Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

4-vinyl guaiacol, a substance which in most beers confers an undesirable flavour [16]. However, in wheat beers the presence of this substance is desirable.

3 RESULTS

Ten barley (spring barley – harvest 2005) varieties grown in the same field trial (Kroměříž, Žabčice, Czech Republic) and the corresponding malts were studied. Amulet, Bojos, Jersey, Prestige, Malz, Sebastian, and Tolar were the representative malting barley varieties and Merlin, KM 1910 and KM 2084 were hulless varieties. All barley samples were malted using the same standard malting conditions [17].

The pattern of the monomeric and oligomeric flavan-3-ols for 10 barley varieties and the corresponding malts were identified and quantified using high-performance liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ion trap mass spectrometry. The Folin–Ciocalteu and the vanillin spectrophotometric assays were used for the assessment of the total polyphenol and total flavan-3-ol content, respectively, and the antioxidant activity was determined as the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity and the ferricyanide reducing power. Catechin and prodelphinidin B3 were respectively the major monomeric and dimeric flavan-3-ols. Moreover, prodelphinidin B3 was shown to be the main contributor for the radical scavenging activity both for barley and malt [18].

Ten different barley cultivars and their corresponding malts were used to obtain different fractions. Phenolics extracted belonged to free, soluble esters and insoluble-bound fractions. Total phenolic content (TPC) of the free fraction, as measured according to the Folin–Ciocalteu method, ranged from 37.7 to 167.2 mg gallic acid equiv/kg of dried material (GAE/kgdw) for barley and between 34.1 and 72.3 mg GAE/kgdw for malt. The bound phenolic content ranged from 210.3 to 320.5 and between 81.1 and 234.9 mg GAE/kgdw for barley and malt, respectively. The contribution of bound phenolics to the TPC was significantly higher than that of free and esterified fractions. Catechin and ferulic acid, quantified by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC–DAD), were the most abundant phenolics in the free and bound fractions, respectively. The p-coumaric acid content was lower in hulless genotypes, as compared to hulled genotypes, showing that it is mainly concentrated in the hull. The antioxidant activities of the phenolic fractions were investigated using the radical scavenging assay (DPPH) and ferricyanide reducing power. The bound phenolics demonstrated a significantly higher antioxidant capacity compared to the free and esterified phenolics. During the malting process, a significant decrease of the bound phenolics was observed with a corresponding increase of the esterified fraction [19].

Hot water (45 °C) extracts of ten barley varieties and their corresponding malts were analyzed in terms of antioxidant activity. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) and radical scavenging activity (ABTS), ranged from 0.23–0.45 mg GAE/gdw for malt and 0.12–0.25 mg GAE/gdw for barley. The hulless malt KM 1910 was the variety with the best antioxidant properties, whereas the highest antioxidant capacity for barley was detected for the variety Merlin. A significant positive correlation between the methods FRAP, ABTS and ITT was found ($p < 0.01$). The influence of fertilization (20 kg N/ha) on barley antioxidant capacity was studied. The results obtained suggest that the impact of fertilization was not evident and that it depends significantly on barley genotype. The total polyphenol content, as measured according to Folin–Ciocalteu's method, ranged from 0.6–2.9 mg GAE/gdw and correlated positively with all the antioxidant methods used ($p < 0.01$). Free phenolic compounds were measured by HPLC with a CoulArray detector. The dominant phenolic compound was ferulic acid and its content ranged from 12.5–21.9 and 7.8–56.1 mg/gdw for barley and malt, respectively. The content of catechin ranged from 11.0–17.0 mg/gdw in barley and 0.9–12.1 mg/gdw in malt [20].

Acknowledgments

This study was accomplished with the support of Project 1M0570 (Research Centre for Study of Extract Compounds of Barley and Hop) and Research Project MSM6046137305 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic).

LITERATURA / REFERENCES

1. Madigan, D., McMurrough, I.: Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst* **119**, 1994, 863–868.
2. Friedrich, W., Eberhardt, A., Galensa, R.: Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 2000, 56–64.
3. Moll, M., Fonknechten, G., Carnielo, M., Flayeux, R.: Changes in polyphenols from raw materials to finished beer. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **21**, 1984, 79–87.
4. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G.: Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2006, 7277–7286.
5. Madigan, D., McMurrough, I.: Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst* **119**, 1994, 863–868.
6. Dvořáková, M., Dostálek, P., Hulín, P.: Analytické metody pro stanovení polyfenolů ve sladině, mladíně a pivu. *Kvasny Prum.* **52**, 2006, 111–114.
7. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brooks, P. A., Stevens, R.: *Brewing: Science and practice*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2004.
8. McMurrough, I., Madigan, D., Smyth, M. R.: Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1996, 1731–1735.
9. Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M. J.: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1999, 1625–1634.
10. Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M. F.: Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2004, 5195–5200.
11. McMurrough, I., Malcom, J. L., Hennigan, G. P.: Content of (+)-catechin and proanthocyanidins in barley and malt grain. *J. Sci. Food Agric.* **34**, 1983, 62–72.
12. Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J.: Identification of the Polyphenols in Barley and Beer by HPLC/MS and HPLC/Electrochemical detection. *J. Inst. Brew.* **105**, 1999, 89–99.
13. McMurrough, I., Baert, T.: Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. *J. Inst. Brew.* **100**, 1994, 409–16.
14. McMurrough, I., Roche, G. P., Cleary, K. G.: Phenolic acid in beers and worts. *J. Inst. Brew.* **90**, 1984, 181–187.
15. Shahidi, F., Naczk, M.: *Food Phenolics; Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic publishing Co. Inc., Lancaster, PA, 1995, 10–13.
16. Graf, E.: Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 1992, 435–448.
17. Dvořáková, M.: Determination of phenolic compounds and their antioxidant capacity in barley, malt and beer. Dissertation thesis, Institute of Chemical Technology Prague, 2008.
18. Dvořáková, M., Moreira, M. M., Dostálek, P., Skulilová, Z., Guido, L. F., Barros, A. A.: Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1189**(1-2), 2008, 398–405.
19. Dvořáková, M., Guido, L. F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M. M., Barros, A. A.: Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 27–33.
20. Dvořáková, M., Douanier, M., Jurková, M., Kellner, V., Dostálek, P.: Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with CoulArray detector. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 150–159.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 19. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 2. 2. 2010

Současné stanovení iso-alfa kyselin ve formě jejich cis- a trans- forem a tetrahydroiso-alfa kyselin

Simultaneous determination of iso-alpha acids in their cis- and trans- forms and tetrahydroiso-alpha acids

MARIE JURKOVÁ, TOMÁŠ HORÁK, JIŘÍ ČULÍK, PAVEL ČEJKA, VLADIMÍR KELLNER

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2

Research Institute of Brewing and Malting Plc, Brewing Institute Prague, Lípová 15, 120 44 Praha 2, Czech Republic

e-mail: jurkova@beerresearch.cz

Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Současné stanovení iso-alfa kyselin ve formě jejich cis- a trans- forem a tetrahydroiso-alfa kyselin. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, č. 3, s. 163–166.

Vypracovaná metoda umožňuje i bez použití komplikovaných mobilních fází velice šetrným způsobem bez použití pufrů vedle sebe stanovit stereoisomerní formy iso-alfa kyselin a zároveň stanovit koncentraci případně přítomných tetrahydroiso-alfa kyselin jejich separací na koloně s reverzní fází C18. Jednotlivé skupiny látek se eluují v oddělených skupinách. Zbytky alfa kyselin, které nepřešly na iso-alfa kyseliny, stanovení v podstatě neruší.

Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Simultaneous determination of iso-alpha acids in their cis- and trans- forms and tetrahydroiso-alpha acids. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, No. 3, p. 163–166.

The elaborated method enables the simultaneous determination of stereoisomer forms of iso-alpha acids and tetrahydroiso-alpha acids using very modest way of separation on reverse phase on C18 column mobile phase without buffers. The groups of analysed compounds elute separately. The rests of untransformed alpha acids to iso-alpha acids do not obstruct the analysis.

Jurková, M. – Horák, T. – Čulík, J. – Čejka, P. – Kellner, V.: Die zeitgenössische Bestimmung der Iso-Alfa Säuren in der Cis- und Trans- Formen und Tetra Hydro Iso-Alfa Säuren. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, Nr. 3, S. 163–166.

Die ausgearbeitete Methode ermöglicht auch ohne Anwendung von komplizierten Mobilphasen und ohne Pufferanwendung auf einer sehr schonenden Weise die Stereo Isomer Formen der Iso-Alfa Säuren zu bestimmen und gleichzeitig durch die Separation auf der Kolonne mit Reversphase C 18 die Konzentration von zufällig anwesenden Tetrahydroiso-Alfa Säuren festzustellen. Die einzelnen Stoffgruppen werden in den separaten Gruppen eluiert. Die Reste von Alfa-Säuren, die auf Iso-Alfa Säuren nicht überstiegen sind, das Messen im Grunde nicht stören.