

HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍCH VLASTNOSTÍ CHMELE A CHMELOVÝCH VÝROBKŮ

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF HOP AND HOP PRODUCTS

ALEXANDR MIKYŠKA¹, KAREL KROFTA², DANUŠA HAŠKOVÁ¹

¹Pivovarský ústav Praha, VÚPS, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research institute of brewing and malting, plc., Lípová 15, CZ – 120 44 Prague*, e-mail mikyska@beerresearch.cz

²Chmelařský institut, s. r. o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec / *Hop research institute Co., Ltd., Kadaňská 2525, CZ – 438 46 Žatec*, e-mail k.krofta@telecom.cz

Mikyška, A. – Krofta, K. – Hašková, D.: Hodnocení antioxidačních vlastností chmele a chmelových výrobků. Kvasny Prum. 52, 2006, č. 7–8, s. 214–225.

Pro hodnocení antioxidačních vlastností chmele a chmelových výrobků bylo zkoušeno několik postupů přípravy vzorků a metod stanovení. K extrakci antioxidantů byla použita horká voda nebo methanol. Antioxidační aktivita byla stanovena postupy vycházejícími z metod publikovaných Chaponem (fotometrické stanovení pomocí dipyridil-železitého komplexu), Kanedou (stanovení pomocí volného radikálu DPPH) a Ushidou (stanovení hodnoty EPR-T150). Postup dle Ushidy je omezeně použitelný pro malé difference redukčních aktivit jednotlivých vzorků. Postup dle Chapona je v principu použitelný, ale méně citlivý v porovnání s metodou dle Kanedy (DPPH). Stanovení s DPPH bylo provedeno fotometrickou i EPR detekcí, výsledky obou způsobů detekce dobře korelovaly. Bylo zjištěno, že redukční aktivita methanolových výluhů je vyšší než redukční aktivita výluhů horkovodních. Důvodem je odlišné spektrum extrahovaných látek. Pro další studium antioxidačních vlastností různých chmelů a chmelových výrobků byl zvolen způsob extrakce vroucí vodou z důvodu simulace podmínek chmelovaru a postup stanovení redukční aktivity s DPPH. Byly prokázány velké rozdíly redukčních aktivit mezi českými odrůdami chmele. Nejlepší hodnoty redukční aktivity byly zjištěny pro Žatecký poloraný červeňák. Mezi hybridními odrůdami nebyly nalezeny podstatné rozdíly v hodnotách redukčních aktivit.

Mikyška, A. – Krofta, K. – Hašková, D.: Evaluation of Antioxidant Properties of Hop and Hop Products. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 7–8, p. 214–225.

Several techniques of sample preparation and assessment methods were tested for evaluation of antioxidant properties of hop and hop products. Hot water or methanol was used for extraction of antioxidants. The antioxidant activity was determined using the techniques based on the methods already published by Chapon (photometric determination with dipyridyl-ferric complex), Kaneda (determination with free radical DPPH) and Ushida (determination of the EPR-T150 value). The method according to Ushida is limitedly usable due to small differences of reducing activities of individual samples. The method according to Chapon is basically usable but it is less sensitive in comparison with the method according to Kaneda (DPPH). Determination with DPPH was performed using photometric and EPR detections, results of both detection methods were in a good correlation. The reducing activity of methanol extracts was found to be higher than the reduction activity of hot water extracts. It is due to a different spectrum of extracted substances. Hot water extraction was used for further study of the antioxidant properties of various hops and hop products for simulation of conditions of hop boiling and the method of determination of the reducing activity with DPPH. Significant differences in reducing activities were proved among Czech hop varieties. Best results of reducing activity were found out for Saaz hops. No significant differences in reduction activities were found among hybrid varieties.

Mikyška, A. – Krofta, K. – Hašková, D.: Die Auswertung von Antioxidationsseigenschaften von Hopfen und Hopfenerzeugnissen. Kvasny Prum. 52, 2006, Nr. 7–8, S. 214–225.

Für eine Auswertung von Hopfen und Hopfenerzeugnissen wurden mehrere Verfahren der Mustervorbereitung und einige Methoden der

Ermittlung geprüft. Zur Extraktion von Antioxidanten wurden ein Heisswasser oder Methanol angewandt. Die Antioxidationsaktivität wurde durch mehrere Verfahren festgestellt, die in der Literatur angeführt sind, laut Chapon (photometrische Ermittlung mittels Dipyridil – Eisenkomplex), weiter laut Kaneda (Ermittlung mittels Freiradikal DPPH) und schliesslich laut Ushida (durch die Ermittlung des EPR – T 150 Wertes). Das Verfahren laut Ushida ist aus dem Grund der geringfügigen Unterschiede von Reduktionsaktivitäten der einzelnen Muster praktisch unverwendbar. Das Verfahren laut Chapon ist im Prinzip schon einsetzbar, aber im Vergleich mit dem Kanedaverfahren (DPPH) ist jedoch weniger empfindlich. Die Ermittlung mit DPPH verfolgte mit photometrischer – und EPR Detektion, die gewonnene Ergebnisse gut miteinander korrelierten. Es wurde festgestellt, daß die Reduktionsaktivität von Methanolauslaugen höher wurde als die von Heisswasserauslaugen. Der Grund dafür ist ein unterschiedliches Spektrum von extrahierten Stoffen. Für weiteres Studium der Antioxidationsseigenschaften von verschiedenen Hopfensorten und Hopfenerzeugnissen wurde aus dem Grund einer Simulation des Würzerkochens in der Würzpfanne die Extraktion mit dem Heisswasser ausgewählt. Es wurden eine grosse Unterschiede von Reduktionsaktivitäten unter tschechischen Hopfensorten festgestellt. Eindeutig die beste Resultate wies die tschechische Hopfensorte „Žatecký poloraný červeňák“ aus. Unter Hybridarten konnten keine wesentliche Unterschiede der Reduktionsaktivität festgestellt werden.

Микишка, А. – Крофта, К. – Гашкова, Д.: Оценка антиокислительных свойств хмеля и хмелевых продуктов. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 7–8, стр. 214–225.

Несколько методов подготовки прод и методов анализа было проверено для оценки антиокислительных свойств хмеля и хмелевых продуктов. Для экстракции антиокислителей применялась горячая вода или метиловый спирт. Антиокислительная активность была определена способами основанными на методах опубликованных Шапоном (фотометрическое определение с помощью дипиридил-ферритого комплекса), Канедой (определение с помощью несвязанного радикала DPPH) и Ушлидой (определение величины EPR-T150). Метод Ушлиды имеет ограниченное применение из-за небольших дифференций восстановительной активности отдельных прод. Возможно применить метод Шапона, но по сравнению с методой Канеды (DPPH) он менее чувствительный. Определение с DPPH было сделано как фотометрическим, так и EPR методом обнаружения, результаты обоих методов хорошо коррелируются. Выявилось, что восстановительная активность экстрактов метиловым спиртом больше, чем экстрактов горячей водой. Причиной является различный спектр экстрагированных веществ. Для последующего исследования антиокислительных свойств разных хмелей и хмелевых продуктов были избраны метод экстракции горячей водой – для моделирования условий варки суслы – и метод определения восстановительной активности с DPPH. Была доказана большая разница восстановительной активности между чешскими сортами хмеля. Лучшим является сорт „Žatecký poloraný červeňák“. Между гибридными сортами не была обнаружена значительная разница в величинах восстановительной активности.

Klíčová slova: *antioxidanty, redukční aktivita, chmel, chmelové produkty, polyfenoly*

Keywords: *antioxidants, reducing activity, hop, hop products, polyphenols*

1 ÚVOD

Antioxidanty přítomné ve sladu a chmelu mají v pivovarství dvojí význam. Jednak působí v průběhu výroby a skladování piva jako ochrana před vznikem nežádoucích senzoryckých aktivních látek staré chuti, jednak mají při konzumaci piva příznivý vliv na zdraví. Klíčovou roli v antioxidantní aktivitě chmele hrají polyfenoly. Polyfenolům v pivu jsou přisuzovány účinky antioxidantní, antimutagenní, antikarcinogenní, antimikrobiální, antitrombotické, antiflogistické (protizánětlivé), imunomodulační, dále regulují krevní tlak a hladinu glukosy v krvi [1].

Zájem odborné veřejnosti v medicíně, farmacii i potravinářství přitahují „lapače“ radikálů, protože jsou schopny chránit lidský organismus před nepříznivými účinky volných radikálů, které mohou způsobit vznik řady onemocnění včetně rakoviny, a vedou k akceleraci procesu stárnutí. Bylo zjištěno, že různé antioxidanty fenolické povahy, jako jsou flavonoidy a taniny, eliminují volné radikály, a tak preventivně zabráňují poškození buněk. Fenolické látky jsou v široké míře distribuovány v rostlinné říši a nalézájí se v mnohém ovoci a zelenině. Vyvážená dieta může být přirozeným zdrojem antioxidantů, schopných chránit lidský organismus před vznikem některých onemocnění, vznikajících jako důsledek radikálových reakcí. Schopnost látek fenolické povahy eliminovat volné radikály je závislá na dávce a může se měnit v závislosti na jejich struktuře, substituentech a stupni polymerace. Všeobecně je akceptováno, že reaktivní kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) mohou mít velmi nepříznivé účinky v podmínkách „in vivo“. Mohou atakovat lipidy, proteiny a DNA a vyvolat oxidaci. Oxidační poškození je považováno za hlavní příčinu stárnutí a několika degenerativních onemocnění, jako jsou srdečně-cévní choroby a rakovina. Dietární antioxidanty jsou považovány za důležitý faktor, který může účinek ROS v podmínkách „in vivo“ eliminovat. Nej důležitějšími dietárními antioxidanty jsou polyfenoly. Řada studií prokázala, že rostlinné polyfenoly vykazují silnou antioxidantní aktivitu díky jejich schopnosti potlačovat tvorbu volných radikálů [2, 3].

U čtených flavonoidů byla prokázána ochrana tzv. low-density lipoproteinů před oxidací katalyzovanou měďnatými ionty [4, 5, 6]. Flavonoidy včetně chalconů jsou skupinou fenolických sloučenin široce rozšířenou v rostlinné říši. Antioxidantní vlastnosti flavonoidů jsou dávány do vztahu s jejich schopností vázat kovové ionty do chelátových vazeb, eliminovat singletový kyslík, superoxidové, peroxidové a hydroxylové radikály a peroxynitrity [7, 8]. Antioxidantní vlastnosti byly prokázány i u prenylovaných flavonoidů a prenylchalconů jako schopnost inhibovat oxidaci lidských low-density lipoproteinů v podmínkách in vitro. Oxidace LDL byla hodnocena tvorbou reaktivních látek z konjugovaných dienu a thiobarbiturové kyseliny (TBARS) a oxidace derivátů tryptofanu [9].

Všeobecně se uznává platnost radikálové teorie senzoryckého stárnutí piva, podle níž se při stárnutí piva uplatňují zejména radikály organických a anorganických sloučenin nebo sloučeniny, které podporují průběh radikálových procesů. Zvláštní význam přitom mají sloučeniny kyslíku a jeho excitované stavy, kyslíkové volné radikály, a obecněji aktivní formy kyslíku [10, 11]. Jedná se o značně komplikovaný systém vzájemně provázaných enzymaticky i neenzymaticky katalyzovaných reakcí, na jejichž průběhu a kinetice se podílejí látky působící jako „antioxidanty“ a „prooxidanty“. Základní reakce vedoucí k tvorbě nežádoucích senzoryckých aktivních karbonylových látek „staré chuti“ jsou podle Wackebauera [12] následující: oxidace vyšších alkoholů, oxidativní odbourávání isohumulonů, Maillardovy reakce, Streckerovo odbourávání, autooxidace nenasyčených mastných kyselin a ethylesterů nenasyčených mastných kyselin, fotooxidace nenasyčených mastných kyselin, aldolová kondenzace aldehydů s krátkým řetězcem a sekundární autooxidace aldehydů.

V pivovarské technologii je za důležitý marker vzniku senzorycké nežádoucí chuti a vůně považována autooxidace lipidů [11]. Chmel a některé chmelové výrobky jsou schopny tento proces inhibovat. Lermusieau prokázal velké rozdíly antioxidantní aktivity mezi odrůdami chmele. Chmelení peletami zvýšilo redukční aktivitu mladiny, chmelení chmelovým extraktem na bázi oxidu uhličitého nemělo na kvalitu mladiny patrný vliv vzhledem k velmi nízkému obsahu polyfenolů [13].

Důležitým faktorem pro potlačení procesů vedoucích ke koloidnímu i senzoryckému stárnutí piva během skladování je i použitá technologie výroby piva. Mimo diskusi je nutnost důsledné eliminace provzdušnění piva ve finálních fázích výroby, při filtraci a stáčení do transportních obalů, kdy se již neuplatní redukční vliv kvasinek. Je však

1 INTRODUCTION

Antioxidants contained in malt and hops have two tasks in the brewing industry. Firstly, they act in the course of beer production and storage and as a protection against undesirable sensorial active substances of stale flavor; secondly, they affect health favorably when beer is consumed. The key role in the hop antioxidant activity is played by polyphenols. Polyphenols in beer are deemed to have antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic, antimicrobial, antithrombotic, antiflogistic (anti-inflammatory), immunomodulatory effects, further they regulate blood pressure and glucose level in blood [1].

Professional public in medicine, pharmacy and food industry has been attracted by “traps” of radicals as they are able to protect the human organism against unfavorable effects of free radicals that can induce a number of diseases, including cancer, and lead to acceleration of the aging process. Various antioxidants of a phenolic nature, such as flavonoids and tannins, eliminate free radicals and thus prevent cell damage. Phenolic substances are widely distributed in the plant kingdom and occur in a lot of fruit and vegetables. Balanced diet can be a natural source of antioxidants capable to protect the human organism against the origin of some diseases originating as a consequence of radical reactions. Capacity of phenolic substances to eliminate free radicals is dosage-dependant and can vary in dependence on their structure, substituents and level of polymerization. It is generally accepted that reactive oxygen radicals (ROS – reactive oxygen species) can have unfavorable effects under the „in vivo“ conditions. They can attack lipids, proteins and DNA and induce oxidation. Oxidative damage is considered the major cause of aging and several degenerative disorders as heart and vascular diseases and cancer. Dietary antioxidants are considered to be an important factor that can eliminate the ROS effect under the “in vivo” conditions. The most important dietary antioxidants are polyphenols. Numerous studies have proved that plant polyphenols exhibit a strong antioxidant activity due to their ability to inhibit production of free radicals [2, 3].

Protection of so-called low-density lipoproteins against by cupric ions catalyzed oxidation [4, 5, 6] was proved in many flavonoids. Flavonoids, including chalcones, are a group of phenolic compounds widespread in the plant kingdom. The antioxidant properties of flavonoids are connected with their ability to bind metal ions to chelate links, eliminate singlet oxygen, superoxide, peroxide and hydroxyl radicals and peroxynitrites [7, 8]. Antioxidant properties were also demonstrated in prenylflavonoids and prenylchalcones as the capacity to inhibit oxidation of human low-density lipoproteins (LDL) under the in vitro conditions. LDL oxidation was assessed by the production of reactive substances from conjugated dienes and thiobarbituric acid (TBARS) and oxidation of tryptophan derivatives [9].

Validity of the radical theory of sensorial beer aging according to which mainly the radicals of organic and inorganic compounds or compounds supporting the course of radical processes play an important role at beer aging, is generally acknowledged. Compounds of oxygen and its excited states, free oxygen radicals and more generally active oxygen forms are of a special significance [10, 11]. This is a considerably complicated system of mutually linked enzymatically and non-enzymatically catalyzed reactions in the course and kinetics of which the substances acting as “antioxidants” and “prooxidants” participate. The basic reactions leading to generation of undesirably sensorial active carbonyl substances of “stale flavor” according to Wackebauer [12]: oxidation of higher alcohols, oxidative degradation of isohumulones, Maillard's reactions, Strecker's degradation, auto oxidation of unsaturated fatty acids and ethylesters of unsaturated fatty acids, photo oxidation of unsaturated fatty acids, aldol condensation of aldehydes with short chain and secondary auto oxidation of aldehydes.

In the brewing technology, auto oxidation of lipids is considered to be an important marker of generation of sensorially undesirable flavors and odors [11]. Hop and some hop products are able to inhibit this process. Lermusieau proved great differences of antioxidant activity among hop varieties. Hopping by hop pellets enhanced effectively antioxidant activity of wort, hopping by CO₂ hop extract did not have the effect on the quality of wort due to a very low content of polyphenols [13].

Technology used for beer production is also an important factor for suppressing the processes leading to colloidal and sensorial beer aging during storage. Necessity to eliminate beer aerating consistently during the final production phases, filtration and filling into the

pravděpodobně, že srovnatelně významný je vliv varního postupu a přítomnosti chmelových polyfenolů na antioxidační aktivitu a senzorickou stabilitu piva [14, 15, 16, 17]. Oxidace během mletí a chmelovaru je klíčovým krokem v rozvoji nežádoucích cizích chutí v pivu [16, 18].

Pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarských surovinách i pivu bylo v uplynulých deseti letech publikováno mnoho analytických metod. Řada analytických postupů byla s modifikacemi převzata z jiných potravinářských oborů (oleje, tuky, maso, mléko), nebo farmaceutického výzkumu. Pivovarské suroviny a meziprodukty pivovarské technologie jako jsou slad, chmel a chmelové produkty, karamel, mladina a mladé pivo jsou složité matrice, které obsahují mnoho látek podléhajících více či méně snadno oxidaci. Podrobný souhrn analytických metod stanovení antioxidační aktivity pivovarských surovin, meziproduktů pivovarské technologie a pív publikoval Moll [19]. Analytické metody jsou rozděleny do dvou skupin na chemicko-biochemické a fyzikální metody. Řada chemicko-biochemických metod je založena na fotometrickém stanovení dynamiky a intenzity vzniku zabarvení či odbarvení zkoumaného prostředí v důsledku změny koncentrace stabilních radikálů. Fyzikální metody využívají např. měření oxidačně-redukčního potenciálu roztoků. Množství antioxidantů se stanovuje také kapalinovou chromatografií s elektrochemickou nebo coulometrickou detekcí. Kaneda popsal chemiluminiscenční metodu stanovení antioxidační aktivity piva [20].

Vhodnými sloučeninami pro studium antioxidační aktivity různých látek v procesu peroxidace lipidů v podmínkách *in vitro*, které generují volné radikály, jsou azo-sloučeniny. Jako zdroj alkyperoxylových volných radikálů použil Liégeois et al. [21] ve vodě rozpustný 2,2'-azobis(2-aminopropan)dihydrochlorid (AAPH) při studiu antioxidačních vlastností mladiny, sladu a chmele prostřednictvím oxidace vodních disperzí kyseliny linoleové. Antioxidační aktivita byla definována jako inhibiční čas potlačení oxidace kyseliny linoleové působením antioxidantů ve zkoumaných vzorcích. Metoda prokázala významné antioxidační vlastnosti pivovarských surovin, především chmele. Stejný oxidačně-redukční systém využili i Lermusieau et al. [13] při studiu redukující aktivity různých odrůd chmele. Velké rozdíly redukčních aktivit mezi odrůdami zdůvodňují odlišným obsahem chmelových flavonoidů. Odrůdy s nízkým obsahem alfa-hořkých kyselin mají podstatně vyšší antioxidační aktivitu a zároveň několikanásobně vyšší obsah polyfenolů, na rozdíl od hořkých odrůd a CO₂-extraktů. Přídavek chmele do sladin výrazně zvýšil celkovou redukující aktivitu mladiny.

K měření senzorické stability piva použil Kaneda [14] jiný typ stabilního radikálu, 1,1-dipirydyl-2-pikryl hydrazil (DPPH). Nepárový elektron na hydrazylovém dusíku (obr. 1) je odpovědný za intenzivní fialové zabarvení radikálu. Po přidání piva do roztoku DPPH dochází k okamžitému odbarvení reakčního prostředí vlivem působení antioxidantů přítomných v pivu. DPPH-redukční aktivita čerstvého piva prokázala pozitivní korelaci se senzorickou stabilitou piva skladovaného při 37 °C po dobu 5 dní. Z toho lze usuzovat, že senzorickou stabilitu piva lze predikovat z úrovně DPPH-redukující aktivity čerstvého piva, které zohledňuje procesní vlivy při výrobě i vliv surovin.

V posledních zhruba deseti letech se v potravinářském výzkumu i praxi objevují moderní metody stanovení volných radikálů resp. stanovení antioxidační aktivity různých matric pomocí techniky elektronové paramagnetické rezonance (EPR), zvané též elektronová spinová rezonance (ESR). Principem techniky je měření energetických změn volných elektronů radikálů změnou orientace (spínu) elektronu vyvolaných působením magnetického pole.

Antioxidační, antiradikálová aktivita je stanovována na základě redukce volných radikálů (generovaných ve vzorku teplem či chemicky nebo přidáním modelového stabilního radikálu ke vzorku) antioxidanty přítomnými v analyzované matici. V praxi některých velkých evropských i světových pivovarů se používá metoda stanovení endogenní antioxidační kapacity piva (lag-time) pomocí tepelné destrukce piva a stanovení radikálů elektronovou spinovou rezonancí spektrometrií. Ve sladině a mladině je stanovena hodnota T150, signál volných radikálů po 150 minutách termické destrukce vzorku [22, 23]. Publikované výsledky ukazují, že takto stanovená antioxidační kapacita koreluje s obsahem oxidu siřičitého a provzdušněním piva ve finálních fázích výroby, špatně však koresponduje s obsahem dalších antioxidantů, zejména polyfenolů [24, 25, 26, 27].

Každá z publikovaných metod stanovení antioxidační aktivity postihuje jiné spektrum antioxidantů. V naší práci jsme se zaměřili na vypracování metodiky stanovení antioxidačních vlastností chmele třemi postupy. Jednalo se o metodu podle Chapona [29] založenou na redukci železitých komplexů, stanovení hodnoty T150 podle Ushidy [23] a konečně stanovení antioxidační aktivity pomocí volného radikálu DPPH [14], kde jsme použili jak spektrofotometrické stanovení, tak stanovení EPR.

transport containers when the reducing effect of yeasts does no longer apply is out of any discussion. But presumably, effects of the brewing process and the presence of hop polyphenols on the antioxidant activity and beer sensorial stability are comparably significant [14, 15, 16, 17]. Oxidation during mashing and hopping is a key step in the development of undesirable off-flavors in beer [16, 18].

A number of analytical methods for determination of the reducing activity in brewing raw materials and beer have been published over the last decade. Many analytical methods were adopted with modifications from other food branches (oils, fats, meat, and milk) or pharmaceutical research. Brewing raw materials and intermediate products of brewing technology, such as malts, hop and hop products, caramel, wort and green beer are complex matrices that contain many substances subjecting less or more to oxidation. A detailed survey of analytical methods for determination of the reducing activity of brewing materials, intermediate products of brewing technology and beers have been published by Moll [19]. The analytical methods are split into two groups: chemical and biochemical, and physical methods. A number of chemical and biochemical methods are based on the photometrical determination of dynamics and intensity of formation of coloration or decoloration of the investigated environment as a result of a change in the concentration of stable radicals. The physical methods use for example measurement of redox potential of solutions. Many antioxidants are also determined by liquid chromatography with electrochemical or coulometrical detection. Kaneda described chemiluminescence method of reducing activity measurement of beer [20].

Azo-compounds are suitable compounds for studying the antioxidant activity of various substances in the process of peroxidation of lipids under the "in vitro" conditions that generate free radicals. As a source of alkyperoxyl free radicals, Liégeois et al. [21] used in water soluble 2,2'-azobis (2-aminopropan) dihydrochloride (AAPH) when studying antioxidant properties of wort, malt and hop by means of oxidation of aqueous dispersions of linoleic acid. Antioxidant activity was defined as an inhibition time for suppression of oxidation of linoleic acid by operation of antioxidants in the samples explored. The methods proved significant antioxidant properties of brewing raw materials, mainly hop. The same redox-system was also used by Lermusieau et al. [13] when studying the reduction activities of different hop varieties. They explain great differences of reduction activities among varieties by the different content of hop flavonoids. The varieties with low content of alpha bitter acids have a substantially higher reducing activity and at the same time multiply higher polyphenol content unlike the bitter varieties and CO₂-extracts. Addition of hop to wort increased the total reduction activity of wort significantly.

Kaneda [14] used another type of stable radical, 1,1-dipirydyl-2-pikryl hydrazyle (DPPH) to measure beer sensorial stability. Unpaired electron on hydrazyle nitrogen (Fig. 1) is liable for intensive violet colour of radical. Upon addition of beer to the DPPH solution, immediate discolouring of the reaction environment occurs due to the operation of antioxidants presented in beer. DPPH-reduction activity of fresh beer proved positive correlation with sensorial stability of beer stored at 37 °C for 5 days. This suggests that beer sensorial stability can be predicted from the level of DPPH-reducing activity of fresh beer that takes into account the process effects during production as well as the effects of raw materials.

Over the last decade, modern methods for determination of free radicals or determination of the antioxidant activity of different matrices with the technique of electron paramagnetic resonance spectrometry (EPR), also called electron spin resonance (ESR), have appeared in food research and practice. The principle of the technique is the measurement of energetic changes of free electrons of radicals by change of orientation (spin) of an electron induced by the operation of the magnetic field.

The antioxidant, antiradical, activity is determined on the basis of the reduction of free radicals (generated in a sample by heat or chemically or by the addition of model stable radical to the sample) by the antioxidants presented in the analyzed matrix. In practice of some big European and world breweries assessment of endogenous antioxidant capacity of beer (lag-time) is used, using thermal beer destruction and determination of radicals with electron spin resonance spectrometry. In wort and unhopped wort the T150 value is determined. It is a signal of free radicals after 150 minutes of heat destruction of a sample [22, 23]. Published results show that the determined antioxidant capacity correlates with the content of sulphur dioxide and aerating of beer in the final production phases but it does not correspond well with the content of further antioxidants, mainly polyphenols [24, 25, 26, 27].

Each of the published methods for determination of the reducing

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál a metody

2.1.1 Chemikálie a přístroje

Síran železito-amonný a 1- α,α -dipyridyl p.a., DPPH, N-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN), 4-oxo-TEMPO dodala Sigma-Aldrich, kyselinu sírovou dodala LachNer Neratovice. Methanol o HPLC čistotě pro extrakce chmele byl od firmy Merck. Rozpouštění DPPH bylo prováděno v ultrazvukové lázni Powersonic PSO 2000A. Acetátový pufr byl připraven smísením roztoku kyseliny octové ($c = 0,1$ mol/l) a octanu sodného ($c = 0,1$ mol/l) v poměru 2:1. Přesná hodnota pH = 4,30 se nastaví přidávkou prvního či druhého roztoku.

K mletí chmelů byl použit ultraodstředivý mlýnek Retsch ZM1 a síto 1,5 mm. K homogenizaci vzorku byl použit rotační dělič sypkých a granulovaných materiálů (Retsch). Voda pro ředění byla připravena na zařízení pro přípravu ultračisté vody (Millipore). Chmelové výluhy byly filtrovány membránovým filtrem Macherey Nagel (Německo). Pro vodné extrakty byla použita celulózová membrána Chromafil A – 45/25, 0,45 μ m, pro methanolové extrakty byla použita membrána PTFE, Chromafil O – 45/25, 0,45 μ m. Průběh kolorimetrických reakcí byl měřen na UV-VIS spektrofotometru SHIMADZU UV-1601. Měření volných radikálů bylo provedeno na zařízení Spectrometer Miniscope MS 200 s příslušenstvím (Magnettech GmbH).

2.1.2 Extrakce antioxidantů ze chmele a chmelových výrobků

K experimentům byly použity české odrůdy chmele Žatecký poloraný červeňák, Sládek, Premiant, Agnus a Harmonie ze sklizní 2004 a 2005 v hlávkové a granulované formě. Chmele byly před extrakcí antioxidantů rozemlety na ultraodstředivém mlýnku Retsch ZM 1 na síto 1,5 mm. Pro přípravu vzorků, tj. převod antioxidantů chmele do roztoku, byly porovnávány tři postupy: přímý var mletého chmele ve vodě pod zpětným chladičem za stálého míchání po dobu 30 minut, zahřívání vodní suspenze chmele na vodní lázni při 100 °C po dobu 2 hodin a extrakce chmele methanolem za studena. Horkovodní výluhy se nejvíce blíží reálným podmínkám při zpracování chmele v pivovarech. Do varné baňky o objemu 1000 ml se přidá 5 gramů mletého chmele a 700 ml destilované vody. Obsah baňky se přivede pod zpětným chladičem do varu za neustálého míchání magnetickým míchadlem. Doba varu 30 minut. Alternativně se baňka se suspenzí chmele umístí na 2 hodiny do vodní lázně udržované na bodu varu. Po ukončení varu se obsah baňky zchladí a kvantitativně přelije do odměrné baňky o objemu 1 litru a doplní destilovanou vodou po rysku. Připravený výluh se nejprve zfiltruje přes filtrační papír a poté přes celulózový membránový filtr 0,45 μ m. Čistý filtrát se použije pro měření redukční aktivity.

Extrakce methanolem byla provedena následujícím postupem: pět gramů mletého chmele bylo třikrát extrahováno 30 ml methanolu po dobu 15 minut v třepačce a 5 minut sonikací v ultrazvukové lázni. Po každém kroku byla čirá organická fáze odpipetována do 100 ml odměrné baňky. Do extrakční nádoby bylo přidáno dalších 30 ml methanolu a celý postup se opakoval. Po ukončení extrakce byl vyextrahovaný chmel promyt na fritě malým množstvím methanolu a objem extraktu v odměrné baňce doplněn po rysku. Před vlastním stanovením redukující aktivity byl organický výluh zfiltrován přes nylonový membránový filtr a naředěn desetkrát methanolem.

2.1.3 Stanovení redukční aktivity

2.1.3.1 Stanovení redukční aktivity dle Chapona [28]

Principem metody je katalýza redukce prakticky bezbarvého komplexu trojmocného železa s dipyridylem. Komplex trojmocného železa s 2,2'-dipyridylem má silné oxidační účinky. Při redukci se mění z bezbarvé $DPFe^{3+}$ formy na $DPFe^{2+}$ červené barvy. Průběh vybarvovací reakce se měří při 510 nm a teplotě 25 °C. Pro chmel a chmelové výrobky byla metoda modifikována. Oproti originálnímu postupu se provedla úprava množství přídavku chmelového výluhu na dvojnásobek a průběh reakce se sledoval 10 minut proti původním 3 minutám. K provedení analýzy se připraví pracovní roztoky a dipyridylu (roztok A: 150 mg síranu železito-amonného se rozpustí v 5 ml destilované vody, přidá se 0,2 ml koncentrované kyseliny sírové a po rozpouštění se doplní v 50 ml odměrné baňce po rysku, roztok B: 50 mg dipyridylu se rozpustí v 45 ml destilované vody, přidají se 4 ml ředěné kyseliny sírové ($c = 0,1$ N) a doplní na objem 50 ml).

V kvetě se smíchá 2,8 ml roztoku dipyridylu a 0,1 ml roztoku sí-

activity covers a different spectrum of antioxidants. In our study we focused on designing the methodology of determination of hop antioxidant properties with three methods. It was the method according to Chapon [29] based on the reduction of ferric complexes, determination of the T150 value according to Ushida [23] and finally determination of reducing activity with free DPPH radical [14], where we used both the spectrophotometric determination and EPR determination.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Materials and methods

2.1.1 Chemicals and instruments

Iron ammonium sulphate and 1- α,α -dipyridyl p.a., DPPH, N-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN), 4-oxo-TEMPO were purchased from Sigma-Aldrich, sulphuric acid was obtained from LachNer Neratovice. Methanol HPLC grade for hop extractions was purchased from Merck. Dissolving of DPPH was carried out in an ultrasonic bath Powersonic PSO 2000A. Acetate buffer was prepared by blending the solution of acetic acid ($c = 0.1$ mol/l) and sodium acetate ($c = 0.1$ mol/l) in proportion 2:1. The exact value of pH=4.30 is adjusted by addition of the first or the second solution.

An ultracentrifugal mill Retsch ZM1 and sieve (1.5 mm) were used for milling hops. A rotary divider of bulk and granulated materials (Retsch) was used for sample homogenization. Water after dilution was prepared on the equipment for preparation of ultra clear water (Millipore). Hop extracts were filtered by a membrane filter Macherey Nagel (Germany). Water extracts were filtered through a cellulose membrane Chromafil A – 45/25, 0,45 μ m, methanol extracts were filtered through a PTFE membrane Chromafil O – 45/25, 0,45 μ m. Course of colorimetric reactions was measured by the use of UV-VIS spectrophotometer SHIMADZU UV-1601. Measuring of free radicals was performed on the equipment Spectrometer Miniscope MS 200 with the accessories (Magnettech GmbH).

2.1.2 Extraction of antioxidants from hop and hop products

Hops and hop pellets of Czech hop varieties Saaz, Sládek, Premiant, Agnus, and Harmonie from harvests 2004 and 2005 were used for the experiment. Before the extraction of antioxidants, the hops were milled on the ultracentrifugal mill Retsch ZM 1 with the sieve 1.5 mm. Three methods for sample preparation, i.e. transfer of hop antioxidant to the solution were compared: direct boiling of milled hop in water under a reverse cooler and constant mixing for 30 minutes, heating water suspension of hop in aqueous bath at 100 °C for 2 hours and cold extraction of hop with methanol. Hot extraction nears best the real conditions for hop processing in breweries. 5 grams of milled hop and 700 ml of distilled water were added to a boiling flask, volume 1000 ml. The content of the boiling flask is boiled under the reverse cooler while constantly stirred with a magnetic stirrer. Time of boiling is 30 minutes. Alternatively, the flask with hop suspension can be placed for 2 hours into an aqueous bath kept on boiling point. After boiling, the content of flask is cooled down and quantitatively poured into a 1l graduated flask and distilled water is added to a scale line. At first the prepared extracts is filtered through a filter paper and then through a cellulose membrane filter (0.45 μ m). Pure filtrate is used for measurement of the reduction activity.

Extraction with methanol was carried out as follows: five grams of milled hop was extracted three times with 30 ml of methanol for 15 minutes in a shaker and 5 minutes by sonication in an ultrasound bath. After each step a pure organic phase was pipetted to a 100 ml volumetric flask. Another 30 ml of methanol was added to an extraction dish and the whole method was repeated. After completing the action, the extracted hop was washed out on the frit with a small amount of methanol and the volume of extract was added to a scale line. Before determination of the reduction activity, the organic extract was filtered through a nylon membrane filter and diluted 10 times with methanol.

2.1.3 Determination of the reducing activity

2.1.3.1 Determination of the reducing activity according to Chapon [28]

Principle of this method is the catalysis of reduction of practically colourless complex of trivalent iron with dipyridyl. The complex of trivalent iron with 2,2'-dipyridyle has strong oxidative effects. During the reduction it is changed from a colourless $DPFe^{3+}$ form to $DPFe^{2+}$ of

ranu železito-amonného. Po uplynutí 2 minut se proměří absorbance při vlnové délce 510 nm (nulová hodnota A_0) a ve stejném okamžiku přidá 100 μ l vzorku. Průběh vybarvovací reakce se sledoval po dobu 10 minut podobně jako u metody DPPH. Odečítala se hodnota absorbance reakčního prostředí po 10 minutách od přídavku vzorku (A_{VZ}). Redukční kapacita vzorku se vypočte ze vztahu (1).

$$RA_{\text{chapon}} = A_{VZ} - A_0 \quad (1)$$

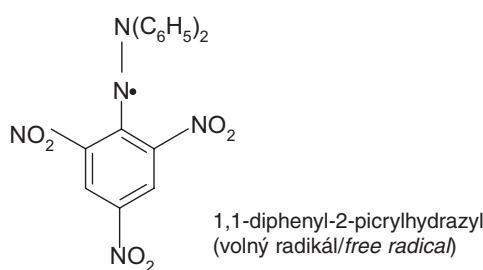
2.1.3.2 Spektrofotometrické stanovení redukční aktivity s DPPH dle Kanedy [14]

Metoda je založena na reakci barevného radikálu 1,1-difenyl-2-picryl-hydrazylu (DPPH) s antioxidanty v měřeném roztoku. Intenzivní fialové zabarvení při 525 nm je způsobeno nepárovým elektronem na hydrazylovém dusíku. Reakce s redukcujícími látkami má za následek postupné snižování koncentrace radikálu, což se projevuje odbarvováním reakčního prostředí, snižováním absorbance roztoku. Rozdíl absorbancí na počátku reakce a po 10 minutách kvantifikuje redukční aktivitu (RA) zkoumaného vzorku. Činidlo, tj. roztok DPPH o koncentraci $c = 1,86 \cdot 10^{-4}$ mol/l, se připraví ve směsi ethanol-acetátový pufr (2:1 obj.). Činidlo se rozpouští nejprve mícháním a poté umístěním v ultrazvukové lázni. Rozpouštění se kontroluje průběžným měřením absorbance roztoku až do konstantní hodnoty po doplnění odměrné baňky po rysku. Při výše uvedené koncentraci by absorbance roztoku činidla měla činit přibližně 1,6 abs. jednotek. Roztok se uchovává ve tmě a chladu, za těchto podmínek je stabilní několik dní, pro práci v průběhu jednoho dne je možno stanovit slepý pokus na činidlo jen jednou.

Při vlastním stanovení (hodnota A_{VZ}) se smíchá v kyvetě 2,8 ml činidla DPPH 0,2 ml vzorku. Směs se promíchá a po 10 minutách proměří absorbance při vlnové délce 525 nm. Stejným způsobem se postupuje u stanovení slepého vzorku (A_{SL}), kdy je smíchán vzorek se směsí ethanol-acetátový pufr. Při stanovení slepé hodnoty činidla (A_C), se smíchá 2,8 ml činidla a 0,2 ml destilované vody a po 10 minutách se proměří absorbance. Redukční aktivita RA_{DPPH} se vypočte ze vztahu (2), výsledky se udávají na tři desetinná místa. Rovněž je možno antioxidační aktivitu vyjádřit v procentech úbytku koncentrace DPPH podle vztahu (3)

$$RA_{DPPH} = A_C + A_{SL} - A_{VZ} \quad (2)$$

$$RA_{DPPH \text{ rel}} = 100 (A_C + A_{SL} - A_{VZ}) / (A_C + A_{SL}) \quad (3)$$



Obr. 1 / Fig. 1 Strukturální vzorec volného radikálu 1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazylu / Structural formula of free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyle

2.1.3.3 Stanovení redukční aktivity s DPPH technikou EPR

Principem metody je degresivní kinetické měření, metoda je založena na reakci stabilního volného radikálu 1,1-difenyl-2-pikryl-hydrazylu (DPPH) s antioxidanty v měřeném roztoku. Úbytek koncentrace radikálu je měřen technikou elektronové paramagnetické rezonance. Připraví se slepý pokus na činidlo (14 ml činidla a 1 ml dest. vody). Kyveta se vloží do karuselu spektrometru a spustí příslušný program nastavení nulového bodu. V kyvetě se smísí 14 ml činidla s 1 ml vzorku, promíchá a vloží do karuselu spektrometru. Současně s promícháním se spustí start programu měření. Reakční směs je nasávána po dobu 10 minut v minutových intervalech do měřicí cely spektrometru, kde probíhá měření hodnoty signálu volného radikálu DPPH.

Po ukončení měření se v příslušném dialogovém okně řídicího počítače vybere spektrální vlna odpovídající volnému radikálu DPPH a provede se vyhodnocení naměřených dat pomocí matematického aparátu spektrometru.

Výsledkem je časová závislost hodnoty signálu DPPH. Počítají se následující parametry:

a red colour. Course of the colouring reaction is measured at 510 nm and temperature of 25 °C. The method was modified for hop and hop products. Compared to the original method, quantity of the hop extract addition was adjusted to a double quantity and course of the reaction was followed for 10 minutes versus original 3 minutes. For the analysis, operational solutions of iron ammonium sulphate and dipyridyl are prepared (solution A: 150 mg of iron ammonium sulphate is dissolved in 5 ml of distilled water, 0.2 ml of concentrated sulphuric acid is added and after dissolution it is replenished in a 50 ml volumetric flask to a scale line; solution B: 50 mg of dipyridyl is dissolved in 45 ml of distilled water, 4 ml of diluted sulphuric acid is added ($c = 0.1$ N) and replenished to a volume of 50 ml.

2.8 ml of dipyridyl solution and 0.1 ml of iron ammonium sulphate solution are blended in a cuvette. After 2 minutes the absorbance is measured at the wavelength of 510 nm (zero value A_0) and at the same time 100 μ l of a sample is added. Course of a coloring reaction was followed for 10 minutes similarly as in the DPPH method. The absorbance value of the reaction environment was read after 10 minutes from the addition of the sample (A_{VZ}). Reduction capacity of the sample is calculated from the equation (1).

$$RA_{\text{chapon}} = A_{VZ} - A_0 \quad (1)$$

2.1.3.2 Spectrophotometric determination of the reducing activity with DPPH according to Kaneda [14]

The method is based on the reaction of colored radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyle (DPPH) with antioxidants in the measured solution. Intensive violet coloring at 525 nm is caused by an unpaired electron on hydrazyle nitrogen. Reaction with reduction substances results in gradual reduction of concentration of the radical, which is shown in discolouring the reaction environment, reduction of solution absorbance. The difference in absorbance at the beginning of the reaction and after 10 minutes quantifies the reduction activity (RA) of the explored sample. The agent, i.e. DPPH solution with concentration $c = 1.86 \cdot 10^{-4}$ mol/l, is prepared in the mixture of ethanol-acetate buffer (2:1 vol.). The agent is initially dissolved by mixing and then by placing in an ultrasound bath. Dissolving is checked by running measurement of solution absorbance up to a constant value after filling the volumetric flask to a scale line. At the above given concentration, absorbance of the agent solution should be about 1.6 abs. units. The solution is kept in dark and cold, under these conditions it is stable for several days, for work in the course of one day a blind experiment for an agent can be established only once.

When performing determination (value A_{VZ}), the DPPH agent (2.8 ml) is blended in the cuvette with 0.2 ml of the sample. The mixture is stirred and after 10 minutes absorbance is measured at wavelength of 525 nm. The zero sample (A_{SL}) is determined in the same manner the sample is blended with the mixture of ethanol-acetate buffer. Zero value of the agent (A_C) is determined by blending 2.8 ml of agent and 0.2 ml of distilled water and after 10 minutes absorbance is measured. Reduction activity RA_{DPPH} is calculated from the equation (2), results are given to three decimal positions. The antioxidant activity can also be expressed in percents of decline of DPPH concentration according to the equation (3)

$$RA_{DPPH} = A_C + A_{SL} - A_{VZ} \quad (2)$$

$$RA_{DPPH \text{ rel}} = 100 (A_C + A_{SL} - A_{VZ}) / (A_C + A_{SL}) \quad (3)$$

2.1.3.3 EPR determination of the reducing activity with DPPH

Principle of the method is digressive kinetic measurement, the method is based on the reaction of stable free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyle (DPPH) with antioxidants in the measured solution. Decline in the radical concentration is measured with the technique of electron paramagnetic resonance. Zero value of reagent is prepared (14 ml of the agent and 1 ml of distilled water). The cuvette is inserted into a carousel of the spectrometer and an appropriate program for setting zero-point is initiated. 14 ml of the agent is blended in the cuvette with 1 ml of the sample, stirred and inserted into a carousel of the spectrometer. Together with stirring, start of the measuring program is triggered. The reaction mixture is sucked for 10 minutes in one-minute intervals into the measuring cell of the spectrometer where the signal value of the free radical DPPH is measured.

When the measuring is completed, a spectral wave corresponding to a free radical DPPH is chosen in a relevant dialog window of the controlling computer and the measured data are evaluated using mathematic apparatus of the spectrometer.

EPR-RP1 (%) – Redukční potenciál 1, úbytek hodnoty DPPH po 1. minutě reakce

EPR-RP2 (%) – Redukční potenciál 2, úbytek hodnoty DPPH mezi 2. a 10. minutou reakce

EPR-RADPPH (%) – Redukční aktivita, součet RP1 + RP2.

Výsledky jsou vyjádřeny v procentech úbytku hodnoty DPPH na počátku reakce.

2.1.3.4 Stanovení antioxidační aktivity (T150) pomocí EPR dle Ushidy [23]

Principem metody je progresivní kinetické měření, kdy hydroxylové radikály, generované ve zkoumaném vzorku, termicky reagují s anti-oxidanty. Nezareagované volné radikály jsou vázány na vhodné činidlo – spin-trap (PBN- N-terc-butyl- α -fenylnitron), měřen je signál tohoto adduktu pomocí EPR. Po vyčerpání antioxidantů měřený signál volných radikálů stoupá. U piva je stanovena doba, po kterou antioxidanty eliminují volné radikály v průběhu reakce (hodnota lag-time), u analytů, kde není stanovitelný tento bod (sladina, mladina), je výsledkem hodnota signálu v uznané době 150 minut od začátku reakce (T 150).

2.1.3.5 Analýzy chmele

Celkové polyfenoly, flavanoidy a hořké kyseliny byly stanoveny podle Analytiky EBC [29]. Anthokyanogeny byly stanoveny podle Pivovarsko-sladařské analytiky [30]. Obsah xanthohumolu byl stanoven metodou vypracovanou v Chmelařském institutu v Žatci [31].

2.2 Výsledky a diskuse

2.2.1 Porovnání postupů přípravy výluhu chmele vodou za horka

Byly testovány dva postupy přípravy vodného výluhu za horka. Provedení bylo následující: Postup A – přímý var mletého chmele ve vodě na topné desce pod zpětným chladičem za stálého míchání po dobu 30 minut. Postup B – zahřívání suspenze mletého chmele ve vodě na vodní lázni při 100 °C po dobu 2 hodin bez míchání. Zahřívání na vodní lázni se doporučuje z důvodu lepší filtrovatelnosti výluhů. Na druhé straně je časově a energeticky podstatně náročnější než postup první. K porovnání bylo použito 10 vzorků českých odrůd chmele v hlávkové formě. Chmele byly před přípravou výluhů rozemlety a homogenizovány. Redukční aktivita deseti vzorků chmele odrůd Žatecký červeňák, Sládek, Premiant, Bor a Agnus byla stanovena metodou DPPH s fotometrickou detekcí (tab. 1).

Tab. 1 Porovnání reduční aktivity vodných chmelových výluhů připravených za tepla dvěma postupy / Comparison of reducing activity of hop hot water extracts prepared by two procedures

Vzorek / Sample (odrůda, lokalita / variety, locality)	Redukční aktivita (RA _{DPPH}) Reducing activity (RA _{DPPH})		
	Postup A Procedure A	Postup B Procedure B	Rozdíl (% rel.) Difference (% rel.)
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Chotiněves	1.416	1.410	0.4
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Liběšice u Žatce	1.501	1.492	0.6
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Liběšice u Úštěka	1.410	1.407	0.2
Sládek, Brozany	1.347	1.317	2.3
Sládek, Blšany	1.043	1.113	–6.3
Premiant, Brozany	0.936	0.921	1.6
Premiant, Stekník	0.857	0.929	–7.8
Bor, Stekník, Anglická	0.815	0.830	–1.8
Bor, Stekník, Pivovarská II	0.825	0.820	
Agnus, Stekník	0.597	0.613	–2.6

Postup A – Přímý var, 30 minut, míchání / Procedure A – Direct boiling, 30 minutes, stirring

Postup B – Vodní lázeň, 100 °C, 2 hodiny / Procedure B – Water bath, 100 °C, 2 hours

The result is a time dependence of the value of DPPH signal. The following parameters are calculated:

EPR-RP1 (%) – Reducing potential 1, decline of DPPH value after the 1st minute of the reaction

EPR-RP2 (%) – Reducing potential 2, decline of DPPH value between the 2nd and 10th minute of the reaction

EPR-RA_{DPPH} (%) – Reducing activity, sum of RP1 + RP2

The results are expressed as in percents of decline in the DPPH value at the beginning of the reaction.

2.1.3.4 EPR determination of the antiradical activity (T150) according to Ushida [23]

The principle of this method is a progressive kinetic measurement when the hydroxylradicals generated in the explored sample react thermally with antioxidants. Non-reacted free radicals are bound to a suitable agent – spin-trap (PBN- N-tert-butyl- α -phenylnitron), signal of this adduct is measured with EPR. When antioxidants are depleted, the measured signal of free radicals increases. In beer the time for which the antioxidants eliminate free radicals during the reaction (lag-time value) is determined, in analytics where this point is not determinable (wort, unhopped wort) the result is the value of the signal in the period of 150 minutes from the beginning of the reaction (T 150).

2.1.3.5 Hop analyses

Total polyphenols, flavanoids and bitter acids were accessed according to Analytica EBC [29]. Anthocyanogens were accessed according to Pivovarsko-sladařská analytika [30]. Content of xanthohumol was accessed by the method elaborated at the Hop Research Institute in Žatec [31].

2.2 Results and discussion

2.2.1 Comparison of the techniques for preparation of hot water hop extract

Two techniques for preparation of hot water extract were compared. Performance was following: Method A – Direct boiling of milled hop in water on a heating plate under the reverse cooler and constantly stirred for 30 minutes. Method B – Heating the suspension of the milled hop in water in a water bath at 100 °C for 2 hours without stirring. Heating in a water bath is recommended for better filterability.

Tab. 2 Porovnání reduční aktivity vodných a methanolových chmelových výluhů / Comparison of reducing activity of hop water and methanol extracts

Vzorek / Sample (odrůda, lokalita / variety, locality)	Redukční aktivita (RA _{DPPH}) Reducing activity (RA _{DPPH})		
	Postup A Procedure A	Postup C Procedure C	Rozdíl (% rel.) Difference (% rel.)
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, G 45, 2005	1.249	1.365	8.5
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Račice	1.094	1.396	21.6
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Pochválov	1.223	1.392	12.1
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Očihov	1.020	1.345	24.2
Sládek, Nesuchyně	0.776	1.254	38.1
Sládek, Očihov	0.816	1.177	30.7
Sládek, Černčice	0.836	1.292	35.3
Premiant, Tuchořice	0.808	1.212	33.3
Premiant, Stekník	0.557	1.107	49.7
Harmonie, Kněževes	1.137	1.386	18.0
Agnus, Stekník	0.627	1.172	46.5
Agnus, Nesuchyně	0.721	1.145	37.0

Postup A – Přímý var, 30 minut, míchání / Procedure A – Direct boiling, 30 minutes, stirring

Postup C – Methanol / Procedure C – Methanol

Tab. 3 Porovnání obsahu polyfenolových látek ve vodných a methanolových chmelových výluzích / Comparison of polyphenols content of water and methanol hop extracts

Polyfenoly / Polyphenols (mg/l)	TP		ANT		F	
Vzorek / Sample (odrůda, lokalita / variety, locality)	Postup A Procedure A	Postup C Procedure C	Postup A Procedure A	Postup C Procedure C	Postup A Procedure A	Postup C Procedure C
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, G 45, 2005	263	192	78.1	116.3	21.2	21.7
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Račice	226	192	88.5	134.1	27.5	27.2
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Pochvátov	230	192	85.4	132.7	28.4	27.8
Žatecký poloraný červeňák / Saaz, Očihov	214	184	74.6	112.7	23.7	21.4
Sládek, Nesuchyně	115	106	47.4	77.2	8.7	10.3
Sládek, Očihov	135	81	57.4	63	11.0	9.0
Sládek, Černčice	126	121	46.8	72.8	9.8	10.0
Premiant, Tuchořice	138	99	32.2	78.1	6.5	7.8
Premiant, Stekník	98	75	33.3	62.8	3.1	5.4
Harmonie, Kněžves	166	176	61	127	19.7	17.8
Agnus, Stekník	100	57	31.8	36.5	2.8	3.3
Agnus, Nesuchyně	105	98	42.5	55.6	6.9	5.5
Korelační koeficient s RA_{DPPH} / Correlation coefficient RA_{DPPH}	0.929	0.943	0.890	0.925	0.925	0.918

Postup A – Přímý var, 30 minut, míchání / Procedure A – Direct boiling, 30 minutes, stirring

Postup C – Methanol / Procedure C – Methanol

TP – Celkové polyfenoly / Total polyphenols

ANT – Anthokyanogeny / Anthocyanogens

F – Flavanoidy / Flavanoids

Statistické vyhodnocení párovým t-testem (QC-Expert, TriloByte Pardubice) prokázalo, že rozdíly mezi oběma testovanými postupy jsou statisticky nevýznamné. Z důvodu časové úspornosti byl pro přípravu horkovodních výluhů chmele použit postup přímého varu s mícháním. Filtrovatelnost výluhů chmele nečinila vážné potíže.

2.2.2 Porovnání postupů přípravy výluhu chmele vodou a methanolem

Další série testů byla zaměřena na porovnání redukční aktivity chmelových výluhů připravených přímým varem ve vodě a extrakcí methanolem za studena. K porovnání byly použity vzorky českých odrůd chmele v hlávkové a granulované formě ze sklizně 2005. Chmele byly před přípravou výluhů rozmlety a homogenizovány. Redukční aktivita byla stanovena metodou DPPH s fotometrickou detekcí. Výsledky paralelního stanovení dvanácti vzorků chmele odrůd Žatecký červeňák, Sládek, Premiant, Harmonie a Agnus jsou uvedeny v tab. 2.

Výsledky ukazují, že redukční aktivita výluhů připravených extrakcí methanolem za studena byla ve všech případech podstatně vyšší než aktivita horkovodních výluhů. Průkaznost zjištěných rozdílů potvrdilo i statistické hodnocení provedené párovým t-testem (QC-Expert, TriloByte Pardubice). Nejvyšší hodnoty redukčních aktivit byly naměřeny u Žateckého poloraného červeňáku, hybridní odrůdy mají vesměs redukční aktivitu podstatně menší. Meziodrůdová variabilita aktivit methanolových výluhů je podstatně nižší než výluhů horkovodních. Methanolem či vodou za horka je extrahováno rozdílné spektrum látek chmele. Výluh horkou vodou obsahuje větší množství celkových polyfenolů, menší množství anthokyanogenů a srovnatelné množství flavanoidů v porovnání s extrakcí methanolem (tab. 3). Redukční aktivita silně korelovala s obsahem všech sledovaných skupin polyfenolových látek jak ve vodných, tak v methanolových výluzích (tab. 3). Nejvíce polyfenolů obsahuje Žatecký červeňák, 4–5 % hm., obsah celkových polyfenolů v hybridních odrůdách je přibližně poloviční, 2–3 % hm. [32]. Dalším důvodem rozdílů redukčních aktivit horkovodních a methanolových výluhů je rozdílná rozpustnost látek obsažených v lupulinu (chmelové pryskyřice, silice a prenylflavonoidy). Pro hybridní odrůdy byly zjištěny větší rozdíly redukční aktivity mezi výluhy vodou a methanolem, nežli pro Žatecký poloraný červeňák s podstatně nižším obsahem hořkých látek.

Přes relativně nižší hodnoty RA_{DPPH} horkovodních výluhů se tento způsob přípravy vzorků jeví vhodnější. Zásadním hlediskem pro hodnocení chmele a tudíž i preferenci horkovodních výluhů je simulace podmínek zpracování chmele v pivovarském procesu. Výluh horkou vodou zároveň lépe postiňuje rozdíly jak mezi odrůdami, tak mezi lokalitami.

Analogické porovnání přípravy vzorků pro stanovení redukční akti-

lity of extracts. On the other hand it is substantially more time and power demanding than the first method. For comparison 10 samples of Czech hop varieties (hop cones) were used. Prior to the extract preparation the hops were milled and homogenized. Reduction activity of ten samples of hop varieties Saaz, Sládek, Premiant, Bor, and Agnus was established using the DPPH method with photometric detection (Tab. 1).

Statistical evaluation using the pair t-test (QC-Expert, TriloByte Pardubice) proved that the differences between the two tested techniques are statistically non-significant. The method of direct boil with stirring was used for preparation of hot water hop extracts due to saving of time. Filterability of hop extracts did not cause any serious problems.

2.2.2 Comparison of the techniques of preparation of hop extracts with water and methanol

Another series of tests focused on the comparison of reduction activity of hop extracts prepared by a direct boil in water and cold methanol extraction. For comparison, samples of Czech varieties in the form of hop cones and pellets from harvest 2005 were used. Prior to the extract preparation the hops were milled and homogenized. Reduction activity was established using the DPPH method with photometric detection. The results of the parallel determination of twelve samples of hop varieties Saaz, Sládek, Premiant, Harmonie and Agnus are given in the Tab. 2.

The results show that the reducing activity of the extracts prepared with cold methanol extraction was in all cases substantially higher than the activity of hot water extracts. The significance of the determined differences was also confirmed by statistical evaluation performed by the pair t-test (QC-Expert, TriloByte Pardubice). The highest values of the reducing activities were measured in Saaz hops; generally, the hybrid varieties have substantially lower reducing activity. Intervarietal variability of the activities of methanol extracts is substantially lower than that of hot water extracts. Methanol or hot water extracts provide a different spectrum of hop substances. Hot water extract contains a higher quantity of total polyphenols, lower quantity of anthocyanogens and a comparable quantity of flavanoids compared to the methanol extraction (Tab. 3). Reducing activity strongly correlated with the content of all the studied groups of polyphenolic substances both in water and methanol extracts (Tab. 3). Most polyphenols are contained in Saaz hops, 4 to 5% of weight; the volume of the total polyphenols in hybrid varieties is approximately half, 2 to 3% of weight [32]. Different solubility of substances contained in lupulin (hop resin, oil and prenylflavonoids) is another reason of the differences of reducing activities of hot water and methanol extracts. Higher differences of reducing activities between water and metha-

Tab. 4 Obsah hořkých kyselin a redukční aktivita chmelových extraktů odrůdy Agnus / *Bitter acids content and reducing activity of hop extracts of Agnus variety*

	α -kyseliny α -acids (% hm.)	β -kyseliny β -acids (% hm.)	Xanthohumol (% hm.)	RA _{DPPH} Postup A Procedure A	RA _{DPPH} Postup C Procedure C
Ethanolový extrakt / <i>Ethanolic extract</i>	32.0	15.9	2.62	0.301	1.455
CO ₂ -extrakt / <i>CO₂-extract</i>	40.1	23.7	0.26	0.116	1.392

Postup A – Přímý var, 30 minut, míchání / *Procedure A – Direct boiling, 30 minutes, stirring*
 Postup C – Methanol / *Procedure C – Methanol*

vity metodou DPPH bylo provedeno i pro chmelové extrakty odrůdy Agnus ze sklizně 2005. K dispozici byl pryskyřičný alkoholový extrakt (Hopsteiner, Německo) a CO₂-extrakt (Flaveko Pardubice). V tab. 4 jsou uvedeny obsahy α - a β -hořkých kyselin, xanthohumolu a hodnoty redukujících aktivit pro oba postupy v alkoholovém i CO₂-extraktu.

Z hodnot uvedených v tab. 4 jsou nejvíce překvapivé velké rozdíly redukčních aktivit horkovodních a methanolových výluhů. Redukční aktivita horkovodních výluhů jsou velmi nízké, podstatně nižší než u hlávkových chmelů. Toto zjištění odpovídá skutečnosti, že pryskyřičné chmelové extrakty obsahují nepatrné množství polyfenolů. Pouze v alkoholovém extraktu jsou přítomny prenylflavonoidy, zejména xanthohumol, které vykazují vysokou redukční aktivitu [9]. Přítomnost prenylflavonoidů v alkoholových extraktech vysvětluje rozdíl redukční aktivity v porovnání s CO₂ extraktem. Vysoké redukční aktivity methanolových výluhů lze vysvětlit značnou antioxidační kapacitou chmelových pryskyřic a hořkých kyselin, které tvoří značný podíl chmelových extraktů. V methanolu se rychle a beze zbytku rozpouští. Ve vodě i za varu se hořké kyseliny rozpouští ve velmi omezeném množství a dále izomerují např. na iso- α -hořké kyseliny a další transformační produkty. Lermusieau [13] zjistil jen nízkou redukční aktivitu komerčních chmelových extraktů rozpuštěných v methanolu. Redukční aktivitu však hodnotil jinou metodou – AAPH [13]. Z toho vyplývá, že postup přípravy vzorků a metoda stanovení redukční aktivity jsou velmi důležité při interpretaci výsledků.

2.2.3 Opakovatelnost stanovení antioxidační aktivity DPPH

Opakovatelnost měření redukční aktivity RA_{DPPH} byla vyhodnocena na základě provedení celého analytického postupu s homogenním vzorkem chmele a se spektrofotometrickou detekcí. Statistické hodnocení bylo provedeno analýzou jednorozměrných dat v programu QC-Expert (TriloByte Pardubice). Výsledky měření jsou uvedeny v tab. 5. Výsledky prokázaly možnost měřit redukční aktivitu s dobrou opakovatelností a variačním koeficientem 3,1 % rel. Byla zjištěna dobrá korelace na hladině pravděpodobnosti 99 % mezi spektrofotometrickým stanovením redukční aktivity chmelových výluhů a stanovením technikou EPR ($r = 0,878$, $n = 28$).

2.2.4 Meze detekce stanovení antioxidační aktivity DPPH

Detekční meze a linearita koncentrační závislosti měření redukční aktivity pomocí DPPH byly vyhodnoceny na základě měření EPR-DPPH koncentračních řad výluhu chmele s dvojnásobnou navázkou (10 g/l) oproti výše uvedenému postupu přípravy výluhu. Vzorek byl pro stanovení ředěn odplyněnou deionizovanou vodou. Jak je patrné z obr. 2, byl zjištěn lineární průběh závislosti redukční aktivity na koncentraci antioxidantů ve vzorku v rozmezí RA = 90 % rel. až 10 % rel.

Nad hranici přibližně RA_{DPPH} = 90 % rel. se projevila limitace či-

nol extrakty were found for hybrid varieties than for Saaz variety with substantially lower content of bitter substances.

In spite of relatively lower values of RA_{DPPH} of hot water extracts, this method for the sample preparation seems to be more suitable. The basic view for hop evaluation and thus also for preference of hot water extracts is the simulation of conditions of hop processing in the brewing process. At the same time hot water extract better covers the differences both between the varieties and localities.

Analogous comparison of sample preparation for determination of reduction activity with the DPPH method was also performed for hop extracts of the variety Agnus from the harvest 2005. Hop resin alcohol extract (Hopsteiner, Germany) and CO₂-extract (Flaveko Pardubice) were used. Tab. 4 gives the contents of α - and β - bitter acids, xanthohumole and values of reduction activities for both the methods in alcohol and CO₂-extract.

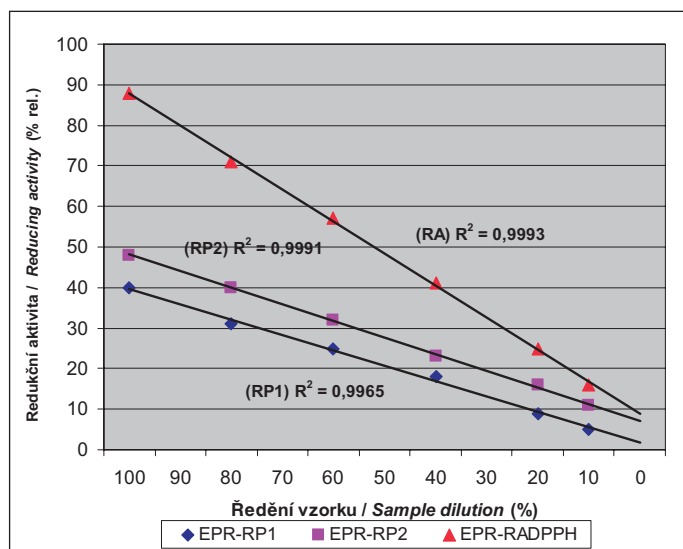
Of the values presented in Tab. 4, great differences of reducing activities of hot water and methanol extracts are the most surprising. Reducing activities of hot water extracts are very low, significantly lower than in cone hops. This finding corresponds to the fact that hop resin extracts contain a negligible amount of polyphenols. Prenylflavonoids, mainly xanthohumol, exhibiting a high antioxidant activity, are found only in the alcohol extract [9]. The presence of prenylflavonoids in alcohol extract explains the difference in reducing activity in comparison with CO₂ extract. High reducing activities of methanol extracts can be explained by a considerable antioxidant capacity of hop oils and bitter acids that form a considerable portion of hop extracts. They dissolve quickly and without residues in methanol. In water, even boiling, bitter acids dissolve in a very limited amount and further they isomerize for example to iso- α -bitter acids and other transformation products. Lermusieau [13] found only low reducing activity of commercial hop extracts dissolved in methanol he assessed reducing activity with another method – AAPH [13]. It suggests that the technique of the sample preparation and the method of the determination of reducing activity are very important for interpretation of results.

2.2.3 Repeatability of determination of the reducing activity DPPH

Repeatability of the measurement of reducing activity RA_{DPPH} was evaluated on the basis of performance of the whole analytical method with a homogeneous sample of hop and spectrophotometric detection. Statistical evaluation was performed with the analysis of one-dimensional data in program QC-Expert (TriloByte Pardubice). Results of the measurement are given in Tab. 5. The results proved the possibility to measure the reducing activity with good repeatability and variation coefficient 3.1 % rel. Good correlation was found on the probability level 99 % between spectrophotometric determination of reducing activity of hop extracts and determination with the ESR technique ($r = 0.878$, $n = 28$).

Tab. 5 Opakovatelnost stanovení redukční aktivity chmele / *Repeatability of hop reducing activity measurement*

Měření / <i>Measurement</i>	1.	2.	3.	4.	5.
RA _{DPPH}	1.0915	1.1135	1.1159	1.1227	1.1063
Měření / <i>Measurement</i>	6.	7.	8.	9.	10.
RA _{DPPH}	1.2115	1.0876	1.1013	1.1157	1.1346
Aritmetický průměr / <i>Arithmetic mean</i>	1.121				
Směrodatná odchylka / <i>Standard deviation</i>	0.035				
Variační koeficient / <i>Variation coefficient (%)</i>	3.1				
Medián / <i>Median</i>	1.115				

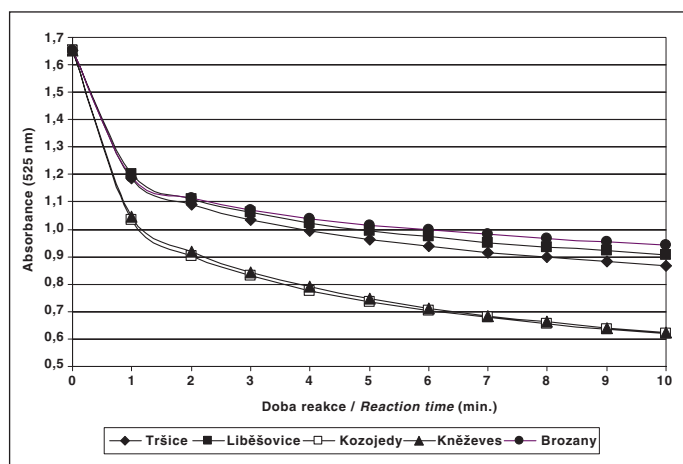


Obr. 2 / Fig. 2 Závislost redukční aktivity EPR-DPPH na ředění vzorku / Dependence of reducing activity EPR-DPPH on sample dilution

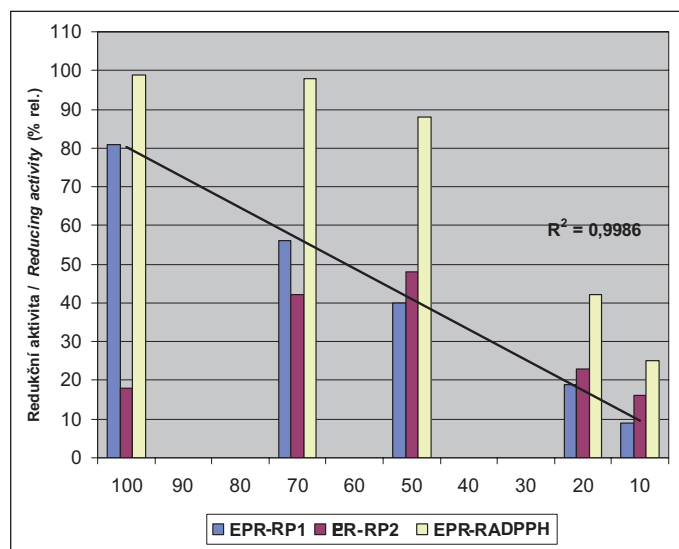
nídem. Jak je patrné z obr. 3, obsah rychle redukujících látek ve vzorku nad hranici přibližně RP1=40 % rel. může za přítomnosti srovnatelného obsahu pomalu redukujících látek (RP2) vést ke zkreslení výsledku. Při stanovení RP1 nad hranici přibližně 40 % rel. je nutno provést ředění vzorku.

2.2.5 Porovnání metod stanovení antioxidační aktivity dle Chapona a Kanedy

Porovnání výsledků obou metod bylo provedeno na vzorcích českých odrůd chmele (Žatecký poloraný červeňák, Sládek, Premiant, Agnus). Výběr vzorků byl proveden tak, aby zahrnoval všechny pěstelské oblasti v České republice. Antioxidační vlastnosti byly hodnoceny v horkovodních výluzech fotometrickými metodami dle Kanedy (DPPH) a Chapona. Průběh kolorimetrických reakcí pro odrůdu Premiant je uveden na obr. 4 a 5. Nejvyšší redukční aktivita podle metody DPPH byla naměřena u vzorků Žateckého poloraného červeňáku se střední hodnotou 1,277 (aritmetický průměr) a rozmezím experimentálních hodnot 1,226 až 1,315. Hybridní odrůdy vykázaly vesměs nižší redukční aktivitu v pořadí Premiant (0,859) a Sládek (0,757), považujeme-li za střední hodnotu aritmetický průměr. Hodnocení redukční aktivity chmelů metodou dle Chapona poskytlo obdobné výsledky. Nejvyšší aktivita byla rovněž prokázána ve vzorcích Žateckého poloraného červeňáku. Aktivita hybridních odrůd je zřetelně nižší. Mezi odrůdami Premiant a Sládek nebyl nalezen zásadní rozdíl. Kromě ŽPC byla u ostatních odrůd zjištěna široká rozmezí hodnot redukční aktivity ve vzorcích z různých lokalit. Například obě metody prokázaly vyšší redukční aktivitu ve vzorcích odrůdy Premiant



Obr. 4 / Fig. 4 Průběh stanovení redukční aktivity s DPPH chmelů odrůdy Premiant z různých pěstebních lokalit / Course of assesment of DPPH reducing activity of hop variety Premiant of different growing localities



Obr. 3 / Fig. 3 Závislost redukční aktivity EPR-DPPH na ředění vzorku – limitace činidlem / Dependence of reducing activity EPR-DPPH on sample dilution – reagent limit

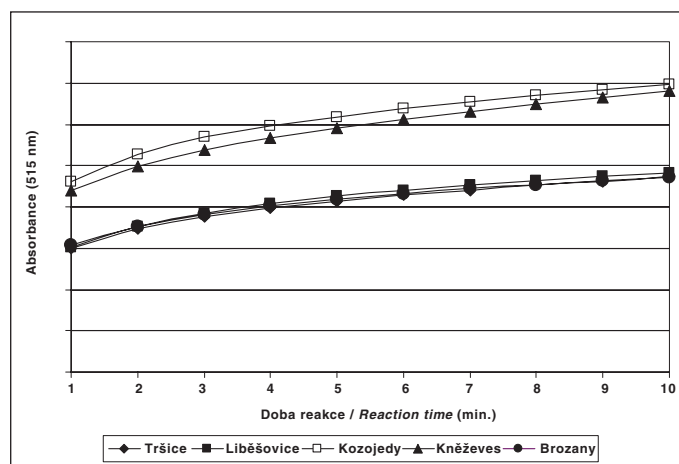
2.2.4 Limits of detection of DPPH reducing activity determination

Detection limits and linearity of concentration dependence of measuring reducing activity with DPPH were evaluated on the basis of measuring EPR-DPPH of concentration lines of extract of hop with a double weigh (10 g/l) versus the above presented method of the extract preparation. The sample was for determination diluted by degassed deionized water. As evident from Fig. 2, linear course of dependence of the reduction activity on concentration of the antioxidants in a sample in the range of RA = 90 % rel. to 10 % rel.

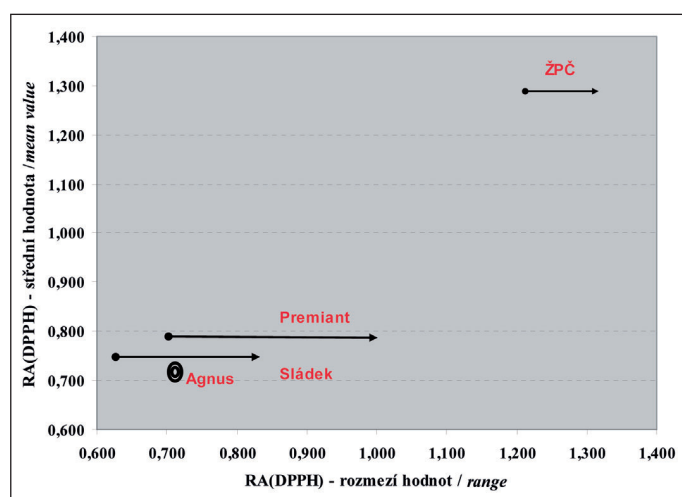
Above the limit of approximately $RA_{DPPH} = 90$ % rel. limitation by the agent was manifested. As evident from Fig. 3, content of quickly reducing substances in the sample above the limit of approximately RP1 = 40 % rel. can in the presence of comparable content of slowly reducing substances (RP2) lead to distortion of the result. When RP1 above the limit of about 40 % rel. is carried out, sample must be diluted.

2.2.5 Comparison of the methods of determination of the reducing activity according to Chapon and Kaneda

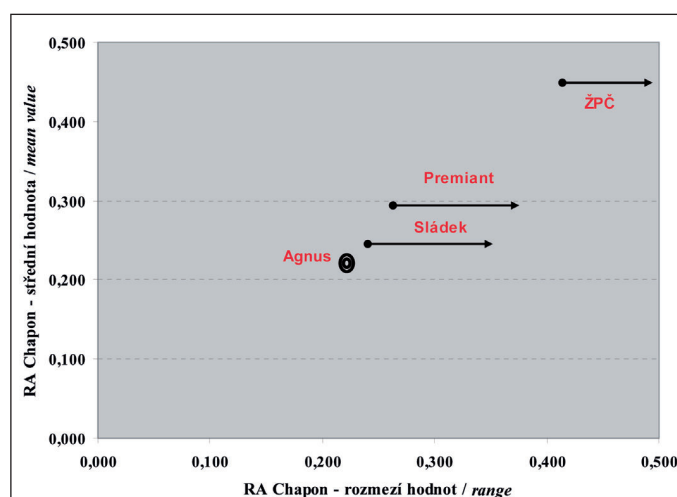
Comparison of both methods was carried out on the samples of Czech hop varieties (Saaz, Sládek, Premiant, Agnus). Selection of the samples was done so that it included all growing areas in the Czech Republic. Antioxidant properties were evaluated in hot water extracts with colorimetric methods according to Kaneda (DPPH) and Chapon. Course of the colorimetric reactions for the variety Premi-



Obr. 5 / Fig. 5 Průběh stanovení redukční aktivity dle Chapona chmelů odrůdy Premiant z různých pěstebních lokalit / Course of assesment of Chapon reducing activity of hop variety Premiant of different growing localities



Obr. 6 / Fig. 6 Střední hodnoty a rozpětí hodnot redukční aktivity českých odrůd chmele stanovené metodou DPPH, sklizeň 2005 / Mean values and range of reducing activity of Czech hop varieties accessed by DPPH method, crop 2005



Obr. 7 / Fig. 7 Střední hodnoty a rozpětí hodnot redukční aktivity českých odrůd chmele dle Chapona, sklizeň 2005 / Mean values and range of reducing activity of Czech hop varieties accessed by Chapon method, crop 2005

z Kozojed a Kněževsi. Toto zjištění naznačuje, že redukční aktivita chmele je významně ovlivněna pěstební lokalitou. Na druhé straně se z výsledků jeví nezávislost redukční aktivity na pěstební oblasti (Žatecká, Úštěcká, Tršická). Střední hodnoty a rozpětí hodnot redukčních aktivit českých odrůd chmele ze sklizně 2005 stanovené metodami DPPH a dle Chapona jsou uvedeny v tab. 6 a v obr. 6 a 7.

Porovnání testovaných analytických metod ukázalo, že výsledky obou metod silně korelují ($r = 0,973$, $n = 15$). Postup dle Chapona je pro chmele použitelný, ale méně citlivý nežli stanovení pomocí DPPH. Prakticky veškerá stanovení redukční aktivity všech odrůd byla v intervalu 0,240 až 0,460 absorbančních jednotek, což je pro postižení rozdílů mezi odrůdami a dalšími faktory nedostačující. Interval absorbančních u metody DPPH činil pro srovnání 0,320 až 1,170 absorbančních jednotek.

Redukční aktivity chmelů stanovené oběma diskutovanými postupy korelovaly s obsahem polyfenolových látek. Pro soubor hodnocených chmelů byla stanovena silná korelace, průkazná na hladině pravděpodobnosti 99 % RA_{DPPH} i RP_{Chapon} a všemi stanovenými skupinami polyfenolových látek (tab. 7).

2.2.6 EPR stanovení antioxidační aktivity (T150) dle Ushidy [23]

Výsledky měření chmelových výluhů ukázaly, že průběh reakce u chmelů je zcela odlišný, nežli tomu je u mladiny či piv. Hodnota signálu prudce stoupne v prvních minutách po začátku reakce (prudkého ohřevu vzorku). Poté množství volných radikálů klesá až do

ant is shown in Fig. 4 and 5. The highest reducing activity according to the DPPH method was measured in the samples of Saaz hops with a medium value 1.277 (arithmetic average) and range of experimental values 1.226 to 1.315. The hybrid varieties showed generally lower reducing activity in the order Premiant (0.859) and Sládek (0.757), in case that the arithmetic average is taken as the middle value. Evaluation of the reducing activity of hops with the method according to Chapon provided similar results. The highest activity was as well proved in the samples of Saaz hops from Žatec. Activity of the hybrid varieties is significantly lower. No significant difference was found between the varieties Premiant and Sládek. Except of Saaz variety, a wide range of reducing activity values was found in the other varieties in samples from different localities. For example both methods proved a higher reducing activity in samples of the variety Premiant from Kozojedy and Kněževs. This finding suggests that reducing activity of hop is significantly affected by a growing locality. On the other hand, the results show independence of reducing activity on the growing area (Žatecká, Úštěcká, Tršická). Middle values and range of values of reduction activities of Czech hop varieties from the harvest 2005 determined with the methods DPPH and according to Chapon are given in the table 6 and Fig. 6 and 7.

Comparison of the tested analytical methods showed that the results of both methods strongly correlate ($r = 0.973$, $n = 15$). The method according to Chapon is usable for hops but it is less sensitive than determination with DPPH. Practically all determination of the reducing activity of all varieties was in the interval of 0.240 to 0.460 absorbance units which is not sufficient for distinguishing the differences between the varieties and other factors. For comparison, the interval of absorbances in the DPPH method was 0.320 to 1.170 of absorbance units.

Antioxidant activities of hops determined with both the studied methods correlated with the content of polyphenolic substances. For the set of the assessed hops strong correlation was determined, significant on the level of probability 99 % RA_{DPPH} as well as RP_{Chapon} and with all determined groups of polyphenolic substances (tab. 7).

Antioxidant activities of hops determined with both the studied methods correlated with the content of polyphenolic substances. For the set of the assessed hops strong correlation was determined, significant on the level of probability 99 % RA_{DPPH} as well as RP_{Chapon} and with all determined groups of polyphenolic substances (tab. 7).

2.2.6 EPR determination of the antiradical activity (T150) according to Ushida [23]

The results of measurement of hop extracts showed that the course of the reaction in hops is totally different than that in worts or beers. The value of a signal sharply rises in the first minutes after the

Tab. 6 Střední hodnoty redukční aktivity českých odrůd chmele / Mean values of reducing activity of Czech hop varieties

	ŽPČ / Saaz	Sládek	Premiant
RA_{DPPH} (Kaneda, 1995)			
Aritmetický průměr / Arithmetic mean	1.277	0.757	0.859
Medián / Median	1.289	0.773	0.785
RA_{Chapon} (Chapon, 1971)			
Aritmetický průměr / Arithmetic mean	0.445	0.307	0.281
Medián / Median	0.439	0.294	0.241

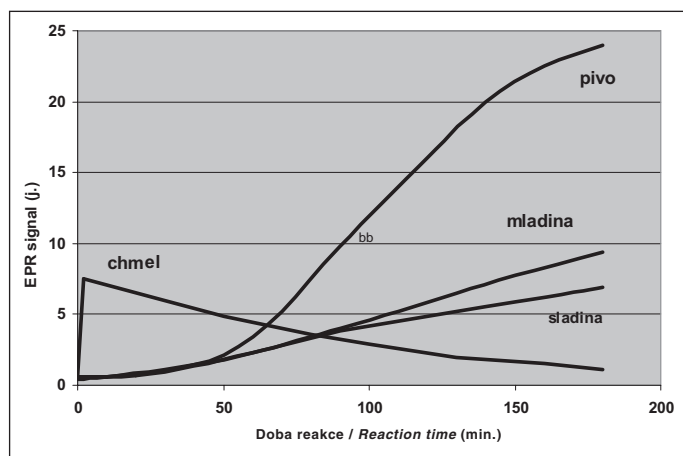
Tab. 7 Korelace mezi redukční aktivitou a polyfenoly / Correlation between reducing activity and polyphenols

	Polyfenoly / Polyphenols (mg/l)		
n = 15	TP	ANT	F
RA_{DPPH}	0.947	0.818	0.956
RA_{Chapon}	0.912	0.752	0.966

TP – Celkové polyfenoly / Total polyphenols

ANT – Anthokyanogeny / Anthocyanogens

F – Flavanoidy / Flavanoids



Obr. 8 / Fig. 8 Typický průběh stanovení EPR-T150 pro různé pivo-
varecké matrice / Typical course of EPR-T150 assesment of different
brewing matrix

konce měření. Pokles má přibližně lineární průběh. Typické průběhy měření chmele, sladiny, mladiny a piva přibližuje obr. 8.

Na rozdíl od sladiny či piva, které obsahují podstatně širší spektrum látek (sacharidy, polysacharidy, proteiny, polyfenoly a další), je výluh chmele tvořen především hořkými látkami a polyfenoly a má tak nižší „ústožnou schopnost“. Po ohřevu vzorku výluhu se prakticky skokem vytvoří volné radikály, které jsou postupně eliminovány přítomnými antioxidanty. Rozdíly hodnot T150 mezi vzorky jedné hodnocené odrůdy byly malé, pohybovaly se v řádu desetin jednotky ESR signálu. Hodnocení je obtížné, při takto atypickém průběhu reakce selhává vyhodnocovací software ESR spektrometru, odečet je nutno provést ručně. V rámci jedné odrůdy je patrný trend k vyšším hodnotám T150 (nižší antiradikálové aktivitě) pro chmele odrůdy Agnus s nižší hodnotou EPR-DPPH.

Za zjednodušujícího předpokladu lineárního průběhu reakce a maxima volných radikálů na počátku měření jsou patrné určité rozdíly mezi odrůdami v průměrných hodnotách měření. Hybridní odrůdy Agnus a Premiant s vysokým obsahem hořkých látek mají oproti Žateckému červeňáku a hybridní odrůdě Sládek s nižším obsahem hořkých látek vyšší počáteční i konečnou hodnotu volných radikálů. Rozdíly v průběhu reakce mohou tedy souviset s obsahem hořkých látek ve chmelu (obr. 9).

Testovaná metoda stanovení antiradikálové aktivity chmele se jeví pro hodnocení chmelů jako omezeně použitelná.

3 ZÁVĚR

Pro hodnocení antioxidačních vlastností chmele a chmelových výrobků bylo zkoušeno několik postupů přípravy vzorků a metod stanovení. K extrakci antioxidantů byly použity horká voda a methanol za studena. Pro horkovodní výluhy byl odzkoušen přímý (30 minut) i nepřímý (2 hodiny) ohřev. Bylo zjištěno, že redukční aktivita methanolových výluhů je vyšší než výluhů horkovodních. Důvodem je odlišné spektrum extrahovaných látek. Pro další studium redukčních aktivit různých chmelů a chmelových výrobků byl zvolen způsob extrakce vroucí vodou z důvodu simulace podmínek chmelovaru. Způsob ohřevu neměl na redukční aktivitu výluhů průkazný vliv, z důvodu časových úspor byly výluhy připravovány přímým varem.

Redukční aktivita byla stanovena postupy vycházejícími z metod dle Ushidy (stanovení hod-

beginning of the reaction (sharp heating of the sample). Afterwards the amounts of free radicals decline until the end of the measurement. The decline has approximately a linear course. Typical courses of the measurement of hop, wort, unhopped wort and beer are shown in Fig. 8.

Unlike wort or beer that contain a substantially wider spectrum of substances (saccharides, polysaccharides, proteins, polyphenols and others) hop extract is formed mainly by bitter substances and polyphenols and thus it has a lower buffer capacity. After the sample of extract is heated, free radicals are formed practically at a jump; they are gradually eliminated by the present antioxidants. The differences of T150 values among the samples of one evaluated variety were small, they moved within the order of tenths of the EPR unit of a signal. Evaluation is difficult; the evaluation of software of ESR spectrometer fails with this atypical course of the reaction, reading has to be carried out manually. Within one variety there is an evident trend towards higher values of T150 (lower antiradical activity) for hops of the variety Agnus with a lower value of EPR-DPPH.

With a simplifying prerequisite of a linear course of the reaction and maximum free radicals at the beginning of the measurement, certain differences between the varieties are evident in the average values of measurement. The hybrid varieties Agnus and Premiant with high content of bitter substances have in comparison with the Saaz hops and hybrid variety Sládek with a lower content of bitter substances higher initial and final value of free radicals. Differences in the course of the reaction can therefore be connected with content of bitter substances in hop (Fig. 9).

The tested method of determination of antiradical activity of hop seems to be liminary usable for evaluation of hops.

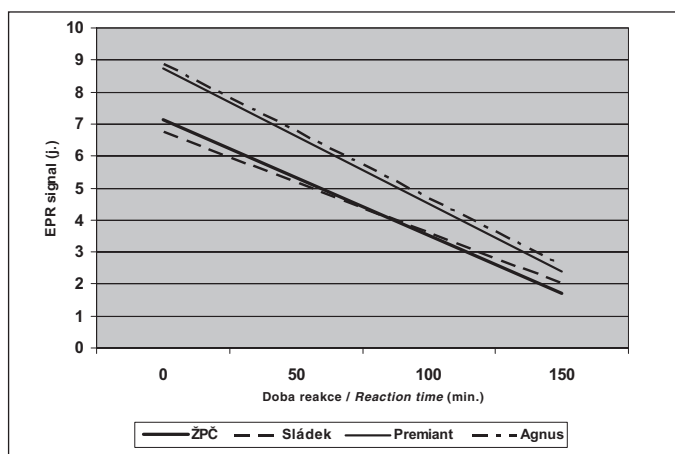
3 CONCLUSION

We tested several techniques of sample preparation and assessment methods for evaluation of antioxidant properties of hop and hop products. Hot water or methanol was used for extraction of antioxidants. For hot water extracts direct (30 minutes) and indirect (2 hours) heating was used. It was found that reduction activity of methanol extracts is higher than that of hot water extracts. The reason for it is a different spectrum of extracted substances. Hot water extraction was chosen for further study of reducing activities of different hops and hop products due to simulation of wort boiling conditions. The heating procedure did not significantly affect reducing activity of extracts, for time saving reasons the extracts were prepared with direct boiling.

The reducing activity was determined with the methods following the methods according to Ushida (determination of the value of EPR-T150), Chapon (photometric determination with dipyrilid – ferric complex) and Kaneda (determination with free radical DPPH). Determination with DPPH was performed with photometric and EPR detection, results of both manners of detection correlated well. The technique according to Ushida is liminary usable due to slight differences of reducing activities of individual samples. The method according to Chapon is basically usable but less sensitive in comparison

with the method according to Kaneda (DPPH). Both these methods correlate together well. For the evaluation of reducing activities of various hops and hop products the technique with the DPPH was used. Repeatability of the designed analytical method was 3.1% rel.. Significant differences of reducing activities among Czech hop varieties were proved. Definitely the best results were determined for Saaz hops. No substantial differences of reducing activities were found among the hybrid varieties, Sládek, Premiant, and Agnus.

The results were acquired in the framework of the solution of the research project NAZV 1B44061



Obr. 9 / Fig. 9 Linearizovaný průběh stanovení EPR-T150 českých
odrůd chmele / Linearized course of EPR-T150 assesment of Czech
hop varieties

noty EPR-T150), dle Chapona (fotometrické stanovení pomocí dipyridil-železitého komplexu) a Kanedy (stanovení pomocí volného radikálu DPPH). Stanovení s DPPH bylo provedeno fotometrickou i EPR detekcí, výsledky obou způsobů detekce dobře korelovaly. Postup dle Ushidy je omezeně použitelný pro malé difference redukčních aktivit jednotlivých vzorků. Postup dle Chapona je v principu použitelný, ale méně citlivý v porovnání s metodou dle Kanedy (DPPH). Obě tyto metody spolu dobře korelují. Pro hodnocení redukčních aktivit různých chmelů a chmelových výrobků byl zvolen postup s DPPH. Opakovatelnost vypracované analytické metody byla 3,1 % rel. Byly prokázány velké rozdíly redukčních aktivit mezi českými odrůdami chmele. Jednoznačně nejlepší výsledky byly zjištěny pro Žatecký poloraný červeňák. Mezi hybridními odrůdami, Sládek, Premiant a Agnus nebyly nalezeny podstatné rozdíly redukčních aktivit.

Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumného projektu NAZV 1B44061

Literatura / Literature

- Piendl, A., Biendl, M.: Brauwelt Int. **18**, 2000 (4), 310–317.
- Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, H., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I., Ozaki, M.: Med. Sci. Res. **15**, 1987, 831–832.
- Kitagawa, S., Fujisawa, H., Sakurai, H.: Chem. Pharm. Bull. **40**, 1992 (2), 304–307.
- Vianna, M., Barbas, C., Bonet, B., Castro, M., Fraile, M., Herrera, E.: Atherosclerosis. **123**, 1996, 83–91.
- Teissedre, P.L., Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H.: J. Sci. Food Agric. **70**, 1996, 55–61.
- Fantozzi, P., Montanari, L., Mancini, F.: J. Food Sci. and Technol. **31**, 1998, 221–227.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K.: Biofactors, 1997, Vol. 6, 399–402.
- Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., Kawakishi, S.: Biochem. Pharmacol. **45**, 1993, 265–267.
- Miranda, C.L., Stevens, J.F., Frei, B., Deinzer, M.L.: J. Agric. Food Chem. **48**, 2000, 3876–3884.
- Punchard, N.A., Kelly, J.F.: Free radicals – a practical approach, Oxford University Press, New York, 1996
- Bamforth, C.W.: Brauwelt Int. **17**, 1999 (2), 98–110.
- Wackenbauer, K., Hardt, R.: Brauwelt **136**, 1996 (40/41), 1880–1889.
- Lermusieau, G., Liégeois, C., Collin, S.: Cerevisia **26**, 2001, 33–41.
- Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H., Koshino, S.: Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am. **32**, 1995 (2), 90–94.
- Noel, S., Liegeois, C., Lermusieau, G., Bodart, E., Badot, C., Collin, S.: J. Agric. Food Chem. **47**, 1999 (10), 4323–4326.
- Mikyška, A., Hašková, D., Hrabák, M., Šrogl, J., Horák, T.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Budapest 2001, **28**, Fachverlag Hans Carl: Nurnberg, CD ROM 2001, Contribution 59.
- Mikyška, A., Hrabák, M., Hašková, D., Šrogl, J.: J. Inst. Brew. **108**, 2002 (1), 78–85.
- Liégeois, C., Lermusieau, G., Collin, S.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Nancy 1999, IRL Press **27**, 1999, 461–468.
- Moll, M.: Monatsschrift Brauwiss. **54**, 2001, 28–32, 64–69.
- Kaneda, H., Kobayashi, N., Takashio, M., Tamaki, T., Shinotsuka, K.: Tech. Q. Master Brew Assoc. Am. **36**, 1999, 41–47.
- Liégeois, C., Lermusieau, G., Collin, S.: J. Agric. Food Chem. **48**, 2000, 1129–1134.
- Uchida, M., Ono, M.: J. Amer. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, 198–204.
- Uchida, M., Suga, S., Ono, M.: J. Amer. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, 205–211.
- Andersen, M., Outtrup, H., Skibsted, L.: J. Agric. Food Chem. **48**, 2000, 3106–3111.
- Uchida, M., Ono, M.: J. Amer. Soc. Brew. Chem. **58**, 2000, 8–13.
- Kunz, T., Stephan, A., Methner, F.J., Kappl, R., Huettnerman, J. Monatsschr. Brauwiss. **55**, 2002, 140–153.
- Franz, O., Back, W.: Monatsschr. Brauwiss. **55**, 2002, 156–162.
- Chapon, L., Louis, C.: Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Estoril, 1971, **13**, 307–322.
- Analytica EBC, European Brewery Convention, 5. vydání. Hans Carl, Ge-trnke-Fachverlag; Nürnberg 1998.
- Basařová, G. et al.: Pivovarsko-sladařská analytika, Merkanta, Praha, 1994.
- Krofta, K.: Kvasny Prum. **49**, 2003, 62–69.
- Nesvadba, V., Krofta, K.: Atlas českých odrůd chmele. Chmelařský institut, Žatec, 2004.

Lektoroval Doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc.
Do redakce došlo 19. května 2006

Norit Haffmans
leading in purification

**Nový standard
v procesní
analytice**

CO₂ + O₂



REGOM
INSTRUMENTS

Brabcova 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206
☎ 241 400 290

✉ regom@regom.cz
🌐 www.regom.com