

Chmel – bohatý zdroj antioxidantů. Metody k posouzení antioxidační aktivity chmelové matrice

Hops – an Abundant Source of Antioxidants. Methods to Assessment of Antioxidant Activity of Hop Matrix

MARIE JURKOVÁ, VLADIMÍR KELLNER, DANUŠA HAŠKOVÁ, JIŘÍ ČULÍK, PAVEL ČEJKA, TOMÁŠ HORÁK, JOSEF DVOŘÁK

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*

Jurková, M. – Kellner, V. – Hašková, D. – Čulík, J. – Čejka, P. – Horák, T. – Dvořák, J.: Chmel – bohatý zdroj antioxidantů. Metody k posouzení antioxidační aktivity chmelové matrice. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 10, s. 366–370.

Príspevek jednotlivých sloučenin chmele k jeho celkové antioxidační aktivitě byl sledován metodou HPLC s CoulArray detekcí v širokém rozsahu potenciálů 250–900 mV. Látky se stejným elektrochemickým chováním jako epikatechin a katechin a od nich odvozené oligomerní proanthokyanogeny (OPC) bylo možné na základě nižších reakčních potenciálů (500 mV) odlišit od ostatních elektrochemicky aktivních sloučenin. Celkový obsah těchto OPC včetně katechinu a epikatechinu byl stanoven jako ekvivalent koncentrace katechinu užitého jako externího standardu. Výsledky byly korelovány jednak s hodnotami skupinových analýz pro stanovení celkových polyfenolů a pro stanovení anthokyanogenů, jednak s výsledky získanými moderní metodou elektronové spinové resonance (ESR – DPPH).

Jurková, M. – Kellner, V. – Hašková, D. – Čulík, J. – Čejka, P. – Horák, T. – Dvořák, J.: Hops – an abundant source of antioxidants. Methods to assessment of antioxidant activity of hop matrix. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 10, p. 366–370.

The contribution of individual hop compounds to the total antioxidant activity was studied by HPLC method with CoulArray detection in broad scale of the potentials 250–900 mV. The compounds with the same electrochemical manners as epicatechin and catechin and oligomeric proanthocyanogens (OPCs) related to catechin were distinguished from the other compounds according to their electrochemical responses on lower potential (500 mV). The total content of these OPCs including catechin and epicatechin was determined as an equivalent of concentration of the catechin used as an external standard. The results were correlated partly with the results obtained by using of the group analysis for determination of the total polyphenol and for the determination of the anthocyanogens, partly with results obtained by using of the modern method electron spin resonance (ESR) for determination of the antioxidant activity.

Jurková, M. – Kellner, V. – Hašková, D. – Čulík, J. – Čejka, P. – Horák, T. – Dvořák, J.: Hopfen – eine reiche Quelle von Antioxidanten. Methoden zur Beurteilung der Antioxidantenaktivität von Hopfenmatrizen. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 10, S. 366–370.

Durch die Methode HPLC mit CoulArray Detektion wurde der Einfluss der einzelnen Hopfenverbindungenzugaben auf die gesamte Antioxidantenaktivität des Hopfens im breiten Potentialsbereich 250–900 mV festgestellt. Die Stoffe mit identischem elektrochemischen Verhalten wie z.B. Epikatechin und Katechin und aus denen entwickelte oligomerische Proanthokyanogene (OPC) auf Grund einer niedrigeren Reaktionspotenzialen (500 mV) von anderen aktiv elektrochemischen Verbindungen absondern werden konnten. Der gesamte Gehalt an diesen OPC einschließlich Katechin und Epikatechin wurde als ein Äquivalent der Konzentration des als externer Standard angewandten Katechins festgestellt. Die Ergebnisse wurden erstmals mit den Werten von für Gruppenanalysen angewandten zur Bestimmung von Gesamtpolyphenolen und dann mit den durch moderne Methode Elektron-Spin-Resonance (ESR – DPPH) erworbenen Werten korreliert.

Klíčová slova: oligomerní proanthokyanogeny (OPC), HPLC-CoulArray, ESR – DPPH

Keywords: oligomeric proanthocyanogens (OPCs), HPLC-CoulArray, ESR – DPPH

1 ÚVOD

Chmel (*Humulus lupulus* L.), rostlina z čeledi *Cannabaceae*, kromě základních látek dodávajících vyrobenému pivu základní sensorické charakteristiky (hořkost, vůně a plnost) obsahuje i řadu dalších látek se zdravotním významem. Jedná se zejména o skupinu dimerů a trimerů, antioxidantů [1] odvozených od katechinu a epikatechinu, tzv. oligomerní proanthokyanogeny (OPC), a skupinu prenylovaných flavonoidů [2,3], z nichž nejvíce zastoupený je xanthohumol (tvoří 0,25–1,1 % hm.).

Obě skupiny látek mají schopnost léčivě působit na lidské zdraví nebo bránit vzniku chorob. Skupina antioxidantů OPC s nižšími potenciály potřebnými pro proběhnutí jejich oxidace chrání zejména buněčnou DNA před její oxidací, a tím brání organismus před vznikem řady civilizačních chorob, zejména nádorových onemocnění [4]. Skupina prenylflavonoidů se chová především tak, že je vnímána receptory v lidském organismu jako hormon estrogen, tyto látky tedy mají estrogenní účinky [5, 6]. Estrogenní aktivita těchto látek je využívána zejména ke zmírnění zdravotních potíží žen v období klimakteria, vrací organismus do normálního stavu, dále jsou tyto látky účinné při léčbě osteoporózy. Tyto látky na rozdíl od OPC mají vyšší oxidační potenciál, takže se na antioxidačních procesech podílejí menší měrou (daidzein a genistein) a jejich těžiště spočívá spíše v interakcích s tkáňovými receptory [7] ovlivňujícími estrogenní účinky a buněčné dělení.

Elektrochemická detekce CoulArray detektoru umožňuje rozlišit skupiny elektrochemicky aktivních látek na základě jejich voltametrického chování, a tak docílit dostatečné selektivity a sledovat jen určitou skupinu látek [8]. Je tedy možné odlišit látky s nižšími oxidačními po-

1 INTRODUCTION

The hop plant (*Humulus lupulus* L.) from *Cannabaceae* family contains beside primary compounds responsible for basic sensory features (bitterness, fragrance and fullness) also many compounds of health importance. There are especially a group of dimers and trimers, antioxidants [1] derived from catechin and epicatechin, so-called oligomeric proanthocyanogens (OPCs) and a group of prenylated flavonoids in hops [2,3], of which xanthohumol is the most abundant 0.5–1.1 %).

The both groups of these compounds have healing ability and protect human organism against development of many civilization diseases. The group of antioxidants OPCs with lower potentials to their oxidation shields the organism against oxidation of DNA and so protect human organism against tumor diseases [4]. Flavonoids are perceived by human receptors like hormone oestrogen, thus these compounds show the oestrogenic effect [5,6]. The oestrogenic activity of these compounds is using to the menopause anesis and thus return the organism to normal state. These compounds are also very effective for osteoporosis therapy. Prenylflavonoids are oxidized by higher potential (daidzein, genistein) so their contribution to antioxidant processes is lower and their main activities are interactions with tissue receptors influencing the oestrogenic activities and regulation of cell division [7].

The electrochemical detection of CoulArray detector enables a resolution of the electrochemically different groups of compounds based on their voltametric behavior.

The selectivity of this detection enables to analyze the target group of compounds [8] and we can distinguish analytes with lower oxidative potential 400–500 mV (catechin and from it derived OPCs) from an-

tenciály (400-500 mV), např. katechin a od něj odvozené OPC od látek vyžadujících vyšší oxidační potenciál, např. kyselina ferulová (700 mV) nebo kyseliny p-hydroxybenzoová a 4-hydroxyfenyloctová (900 mV) [8].

Tato studie byla zaměřena na stanovení antioxidační aktivity oligomerních proanthokyanidinů chmelu metodou kapalinové chromatografie s CoulArray detekcí a porovnání získaných výsledků s hodnotami stanovenými jednak moderní metodou elektronovou spinovou rezonancí (ESR), jednak klasickými metodami pro stanovení celkových polyfenolů a stanovení anthokyanogenů.

2 MATERIÁL A METODY

Předmětem studie byly chmely Harmonie, Rubín a nové odrůdy chmelů označené 4816, 4849 a 5008. Vzhledem k dostatečné polaritě oligomerních proanthokyanidinů a jejich dobré rozpustnosti ve vodě, byly použity studené výluhy chmele.

Z důvodu komplikovanosti a dosud neznámé chemické struktury jednotlivých složek frakce oligomerních proanthokyanidinů ve chmelu byla zvolena pro hodnocení technika fingerprintu, kde společným jmenovatelem všech složek je stejný oxidační potenciál (500 mV) s vymezením oblasti, v níž se tyto látky eluují mezi 20. a 40. minutou (obr. 1). Koncentrace všech OPC byla vyjádřena jako ekvivalent odpovídající koncentraci katechinu, případně epikatechinu, které byly použity pro kalibraci. Takto zjištěné hodnoty byly korelovány s hodnotami změřenými pro antioxidační aktivitu metodou (ESR – DPPH) a klasickými metodami pro stanovení celkových polyfenolů a stanovení anthokyanogenů.

alytes with higher oxidative potential, e.g. ferulic acid (700 mV) or 4-hydroxybenzoic acid or 4-hydroxyphenylacetic acid (900 mV) [9].

The aim of this study was the determination of antioxidant activity of hop oligomeric proanthocyanogens by the method of liquid chromatography with CoulArray detection and comparison with results obtained partly by modern method electron spin reverberation (ERS), partly by classical methods for determination of total polyphenols and determination of anthocyanogens.

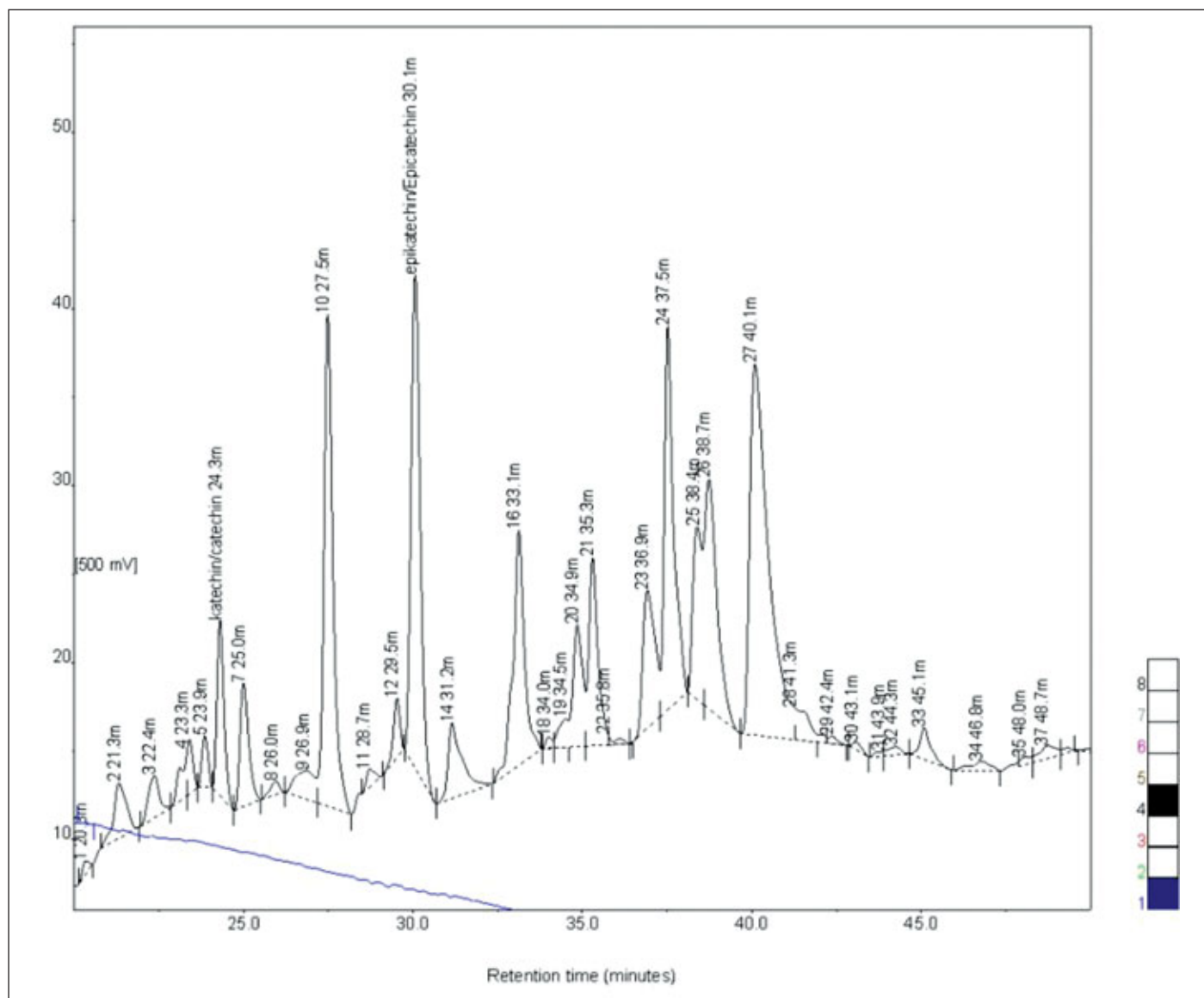
2 MATERIAL AND METHODS

The objects of this study were hop varieties Harmonie, Rubín and new varieties code-named 4816, 4849 and 5008.

With regard to sufficient polarity of oligomeric proanthocyanogens and good water solubility, we used the cold hop leaches in this study.

Due to complexity and unknown chemical structures of particular components of hop oligomeric proanthocyanogens so far, the fingerprint technique was chosen for evaluation. All OPCs components eluted in range from 20 to 40 min. were evaluated on potential 500 mV (Fig. 1). The sum of concentrations of all OPCs was expressed using of the concentration of the catechin used for the calibration. The values obtained in this way were correlated with values obtained by other methods: modern ESR-DPPH and classical methods for determination of total polyphenols and determination of anthocyanogens.

The samples for all analytical methods were prepared by cold leaching: 5 g of milled hops were agitated in 250 ml of distilled water at laboratory temperature for 30 minutes. The leach was centrifuged (15 minutes, 10 000 rpm) and stored by freezing before analysis.



Obr. 1 Chromatogram měřené frakce OPC / Fig. 1 Chromatogram of measured fraction of OPCs

Pro všechny zkoušené metody byl připraven studený výluh: 5 g namletého chmelu smícháním v 250 ml destilované vody za laboratorní teploty po dobu 30 minut. Výluh byl odstředěn (15 min, 10 000 ot/min) a uchován zamražením pro analýzy.

HPLC

Příprava vzorku k analýze

Chmelový výluh se zředí v poměru 1:1 s mobilní fází A (viz chromatografická separace) a přefiltruje přes celulosový filtr 0,20 µm (Chromafil RC-20/25 Macherey Nagel) protlačením vzorku injekční stříkačkou do vialek pro analýzu.

Chromatografické podmínky

Základem mobilních fází **A** a **B** byl 0,005M octan amonný (Fluka) v ultračisté vodě, TOC < 5 ppb (Millipore). Fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu (pro gradient, Sigma Aldrich), fáze B obsahovala 50 % acetonitrilu stejné kvality. Obě fáze byly přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 0,2 µm a kyselinou mravenčí (Fluka) bylo upraveno pH na hodnotu 3,00. Čistota chemikálií byla pro MS aplikace.

Kolona

Purospher STAR RP-18e (5 µm), 250 x 4,6 mm (Merck).
Gradient: 0–10 min. 0% B, 10–18 min. 0–8% B, 18–40 min. 8–10% B, 40–77 min. 10–21% B 77–120 min. 21–85% B. Poté zvýšení na 100% B, vyčištění cel a 15 min. ekvilibrace.
Teplota kolony: 35 °C
Průtok: 0,8 ml/min
Nástřik 10 µl
Nastavené potenciály: 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mV.

Kalibrace

Katechin byl zvolen jako ekvivalent pro vyjádření koncentrace všech antioxidačních látek se stejnou aktivitou, tj. reagujících na stejném potenciálu (500 mV). Byla provedena externí kalibrace standardními roztoky katechinu o koncentracích 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 a 5,0 mg/l na základě měření výšek píků. Stanovení OPC bylo provedeno na základě měření a sečtení výšek všech píků odpovídajících elektrochemickými vlastnostmi katechinu ve sledovaném intervalu. Koncentrace OPC byla pak vyjádřena jako koncentrace katechinu (mg/l).

Stanovení antioxidační aktivity DPPH

Antioxidační aktivita jednotlivých chmelů byla stanovena technikou

HPLC

Sample preparation

Hop leach was diluted in ratio of 1:1 with mobile phase A used for chromatography separation and filtrated through cellulose syringe filter 0.20 µm (Chromafil RC-20/25, Macherey Nagel) into chromatographic vials.

Chromatographic conditions

The buffer 0.005 M ammonium acetate in ultraclean water, TOC < 5ppb was used for preparation of both phases A and B. The phase A contained 5 % acetonitrile (gradient grade, Sigma Aldrich), the phase B contained 50 % acetonitrile of the same quality. Both phases were filtered through membrane filter Nylon 66, 0,2 µm (Supelco) and pH was adjusted to 3.00 by formic acid (Fluka). All chemicals were for MS application.

Column

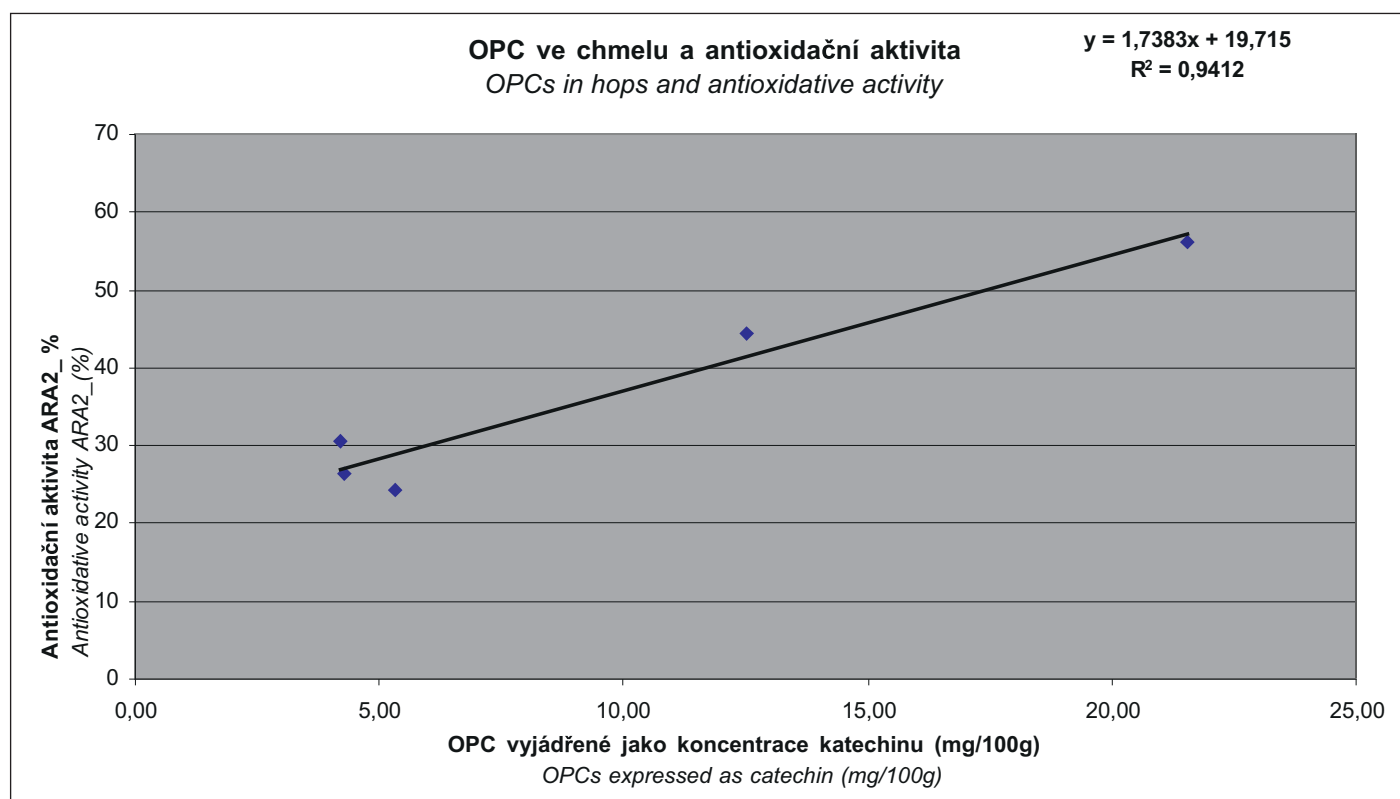
Purospher STAR RP-18e (5 µm) 250 x 4.6 mm (Merck)
Gradient: 0–10 min. 0% B, 10–18 min. 0–8 % B, 18–40 min. 8–10 % B, 40–77 min. 10–21 % B, 77–120 min 21–85 % B. The content of mobile phase B was increased to 100 %. The measuring cells were cleaned and the 15 min equilibration by phase A was applied afterwards.
Temperature of column: 35 °C
Flow: 0.8 ml/min.
Injection of the sample: 10 µl.
The measuring potentials setting in turn 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 and 900 mV.

Calibration

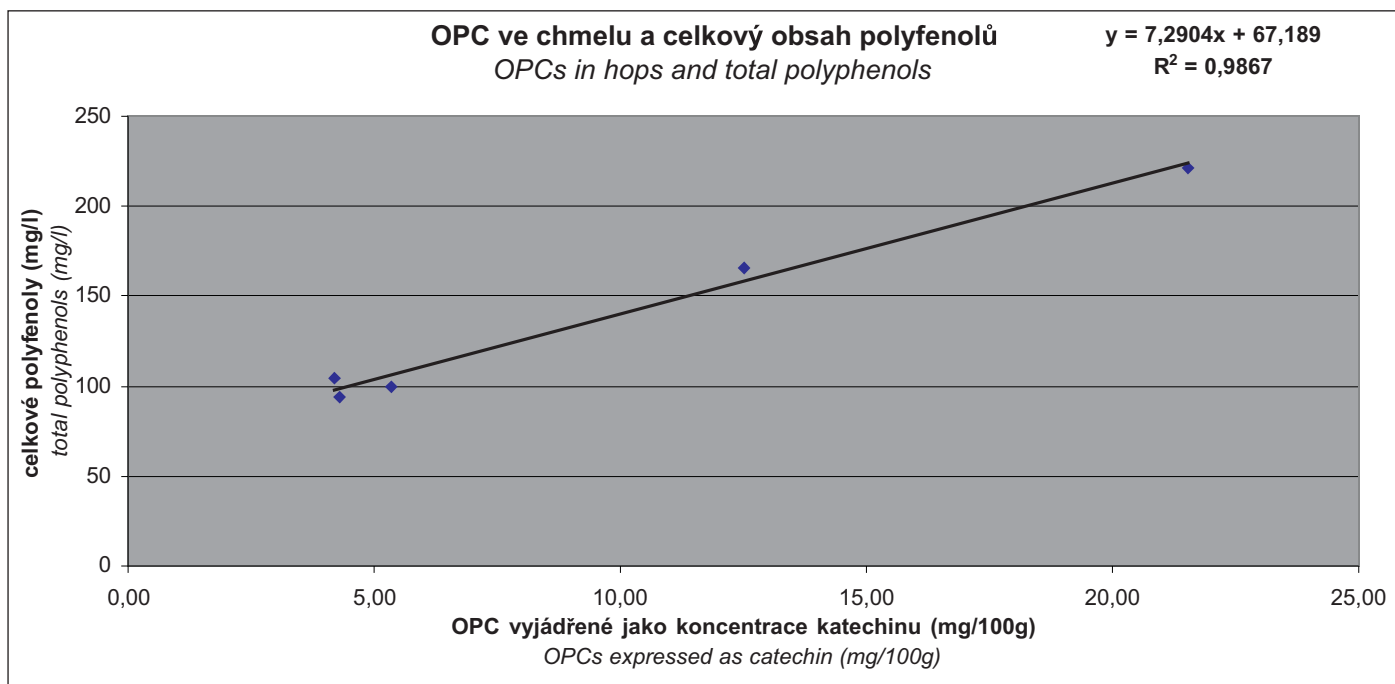
The catechin was chosen as the equivalent to express the concentration of all compounds with the same antioxidant activity on reaction potential 500 mV. The standard solutions of catechin 0.01; 0.1; 0.5; 1.0 and 5.0 mg/l were used for the external calibration. The determination of all OPCs was realized by the measuring and checking-out of heights of all peaks with the same electrochemical features like catechin. The concentration of OPCs was expressed as catechin (mg/l) according to external calibration.

Determination of the antioxidant activity DPPH

The antioxidant activity of individual hops was determined using the technique of electron spin resonance (ESR). The method is based



Obr. 2 Elektrochemická metoda s CoulArray detekcí v porovnání s metodou ESR-DPPH pro kvantitativní vyjádření antioxidační aktivity matrice chmelu / Fig. 2 Comparison of electrochemical method with CoulArray detection and ESR-DPPH method for quantification of antioxidative activity of hop matrix



Obr. 3 Elektrochemická metoda s CoulArray detekcí v porovnání s metodou pro stanovení celkových polyfenolů jako míra antioxidačního potenciálu matrice chmelu / Fig. 3 Comparison of electrochemical method with CoulArray detection and method for determination of total polyphenols as a rate of antioxidative potential hop matrix

elektronové spinové rezonance (ESR). Metoda je založena na reakci stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-picrylhydrazylu (DPPH) s antioxidanty přítomnými v měřeném vzorku. Antioxidační aktivita vzorků (ARA 2) je vyjádřena jako relativní pokles koncentrace DPPH po 10 minutách reakce.

Všechna měření volných radikálů byla provedena na spektrometru MiniScope MS 200 firmy Magnetech GmbH, Germany.

Vlastní stanovení: ke 14 ml činidla DPPH se přidá 1 ml vzorku, směs se okamžitě promíchá, vloží do autosampleru vyhřátého na 30 °C. Ihned se spustí příslušný měřicí program, který řídí transport reakční směsi v minutových intervalech do měřicí kyvety spektrometru. Hodnota signálu volného radikálu DPPH je zaznamenávána po dobu 10 minut. Po ukončení analýzy jsou naměřené hodnoty zpracovány pomocí matematického programu spektrometru. Výsledkem je časová závislost hodnoty ESR-signálu DPPH. Antioxidační aktivita ARA2 je vyjádřena v procentech úbytku hodnoty DPPH po 10 minutách reakce.

Stanovení celkových polyfenolů

Celkové polyfenoly byly stanoveny podle Analytiky EBC [10].

Stanovení anthokyanogenů

Anthokyanogeny byly stanoveny podle Pivovarsko-sladařské analitiky [11].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Byla zjištěna korelace výsledků stanovených popsanou metodou HPLC s elektrochemickou detekcí pro skupinu látek oligomerních proanthokyanidinů a výsledků změřených metodami: ESR – DPPH pro antioxidační aktivitu ($R^2 = 0,9412$), pro celkové polyfenoly ($R^2 = 0,9867$) a pro anthokyanogeny ($R^2 = 0,991$). Grafické vyjádření korelací se srovnávanými metodami podávají obr. 2, 3, 4. Koeficienty determinace R^2 byly vypočítány statistickým programem Microsoft Office Excel 2003.

Nově vypracovaná chromatografická metoda s elektrochemickou detekcí může být použita pro porovnání antioxidační aktivity chmelu a chmelových preparátů vedle již používané moderní ESR-DPPH pro stanovení antioxidační aktivity a klasických metod pro stanovení celkových polyfenolů a anthokyanogenů pro hodnocení antioxidační aktivity komplexních matic. Nejtěsnější shody ($R^2 = 0,991$) bylo dosaženo s metodou pro stanovení anthokyanogenů, tedy skupiny sloučenin svou strukturou i povahou substituentů na benzenovém jádře velmi podobných katechinům a jejich oligomerům. Korelační koeficienty s ostatními metodami svědčí o uplatnění i jiných struktur

on the reaction of the stable radical of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with antioxidants present in the sample.

The antioxidant activity of samples (ARA 2) is expressed as the decline of the concentration of DPPH after 10 minutes of the reaction.

All the measurements of the free radicals were performed on the Spectrometer MiniScope MS 200, Magnetech GmbH, Germany.

The assay: the aliquot of 14 ml of the DPPH stock solution is mixed with 1 ml of the sample in the test tube without delay. The tube is then inserted into the autosampler which is tempered to 30 °C. The measuring program controlling the transport of the reaction mixture in the interval of 1 minute is then immediately triggered. The value of the free radical DPPH signal is then monitored during the following 10 minute interval. After completion of the analysis the measured values are processed by the particular analytical software of the spectrometer. The result of these calculations is a dependence of the value of the DPPH signal of the sample on time. The antioxidant activity ARA2 is expressed in the percent proportion of the DPPH value decline after the 10 minute reaction.

Determination of the total polyphenol

Total polyphenols were determined according to EBCAnalytica [10].

Determination of the anthocyanogens

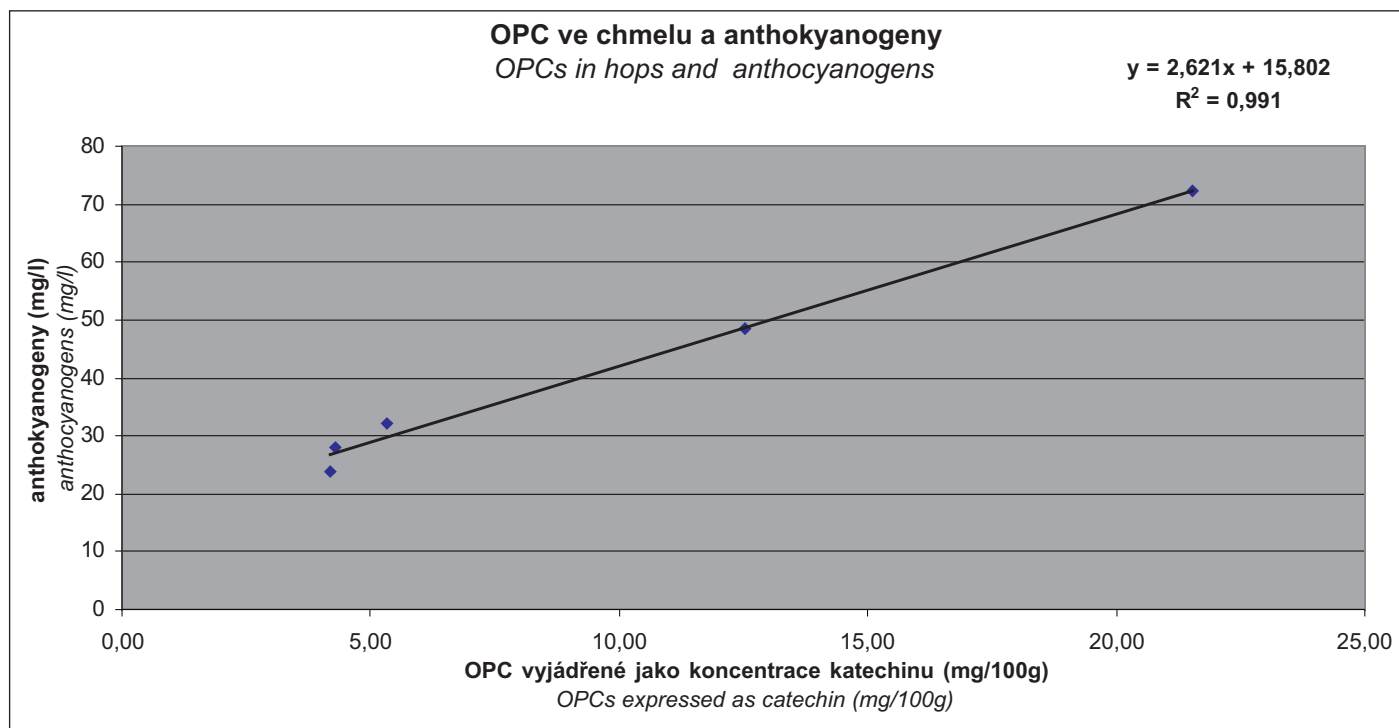
Anthocyanogens were determined according to „Pivovarsko-sladařská analytika“ [11].

3 RESULTS AND DISCUSSION

The correlations of results obtained by described electrochemical method with CoulArray detection and results obtained using methods: ESR – DPPH ($R^2 = 0,9412$), determination of total polyphenols ($R^2 = 0,9867$) and determination of anthocyanogens ($R^2 = 0,991$) were found. These correlations are shown in Fig. 2, 3, 4. Coefficients of determination were calculated using of statistical programme Microsoft Office Excel 2003.

The newly developed chromatographic method with electrochemical detection can be used to comparison of hops and similar materials with antioxidant activity. This method can be used for evaluation of antioxidant activity like the modern ESR-DPPH method and the classical methods for determination of total polyphenols and for determination of anthocyanogens.

But the best match ($R^2 = 0,991$) was achieved with the method for determination of anthocyanogens, this group of compounds is similar to catechins and their oligomers due to structures and substituents on benzene ring. The correlative coefficients with other methods re-



Obr. 4 Elektrochemická metoda s CoulArray detekcí v porovnání s metodou pro stanovení anthokyanogenů jako míra antioxidačního potenciálu matrice chmelu / Fig. 4 Comparison of electrochemical method with CoulArray detection and method for determination anthocyanogens as a rate of antioxidative potential hop matrix

s antioxidační povahou, přesto hodnoty jejich korelace 0,9867 a 0,9412 vypovídají o poměrně dobré shodě. Z toho lze usuzovat, že látkami zodpovědnými za antioxidační vlastnosti chmele jsou katechiny, oligomery katechinů a anthokyanogeny. Ostatní struktury v důsledku vyšších oxidačních potenciálů antioxidační aktivitu ovlivní méně výrazně, např. již zmíněné kyseliny ferulová, p-hydroxybenzová nebo 4-hydroxyfenyloctová.

Poděkování

Tato práce je součástí Výzkumného záměru MSM 6019369701. Autoři také děkují subjektům sdruženým v ČSPS za podporu při řešení tohoto úkolu.

flect the enforcement other compounds with antioxidant activity, nevertheless their values 0.9867 and 0.9412 confirm a good agreement. It can be concluded that the main groups responsible for the hop antioxidant features are catechins, their oligomers and anthocyanogens. Other structures like ferulic acid, p-hydroxybenzoic and 4-hydroxyphenylacetic acids have the lower contribution to the antioxidant activity due to their higher oxidative potentials.

Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project MSM 6019369701) and by members of the Czech Beer and Malt Association is gratefully acknowledged.

LITERATURA / REFERENCES

1. Krofta, K., Mikyška, A., Hašková, D.: Antioxidant characteristics of hops and hop products. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 160–166.
2. Hofta, P., Dostálek, P., Basařová, G.: *Chem. Listy* **98**, 2004, 825–830.
3. Magalhaes, P. J., Dostálek, P., Cruz, J. M., Guido, L. F., Barros, A. A.: The impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: a pilot scale approach. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 246–256.
4. Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R.: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hop, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **30**, 2000, 235–251.
5. Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keukeleire, D.: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1999, 2249–52.
6. Miranda, C. L., Stevens, J. F., Hemrich A., Henderson, M. C., Rodrigues, R. J., Yang, Y. H., Deinzer, M. L., Barnes, D. R., Buhler, D. R.: Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **37** (4), 1999, 271–285.
7. Medjakovic, S., Jungbauer, A.: Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**, 2008, 171–177.
8. Acworth, I., Waraska, J., Gamache, P., Mohindra, D.: The application of electrochemistry to the measurement of polyphenols in natural products and animal tissues: target and metabolomic studies. ESA-A Dionex Company, Chelmsford, MA, USA; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA.
9. Jurková, M., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., Karásek, P.: Analýza polyfenolů v pivovarských surovinách s využitím PSE (Pressurized Solvent Extraction) – tlakové extrakce rozpouštědlem a metodou HPLC s CoulArray detekcí. *Kvasny Prum.* **56**, 2010, 18–23.
10. Analytica EBC, European Brewery Convention, European Brewery Convention. Analytica EBC, Method 9.11 – Total Polyphenols in Beer by Spectrophotometry Nürnberg, Germany, 2002.
11. Basařová, G. et al.: Pivovarsko-sladařská analytika 2, Merkanta s. r. o, Praha, 1993.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 12. 6. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 29. 8. 2011