

## 🇬🇧 Hops - A source of natural antioxidants

## 🇨🇪 Chmel - zdroj přírodních antioxidantů

Pavel Hofta<sup>1,2</sup>, Björn Åkesson<sup>2</sup>, Pavel Dostálek<sup>1</sup>, Markéta Dvořáková<sup>1</sup> and Marcel Karabín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of fermentation chemistry and bioengineering, Chemical engineering university in Prague, Technická 5, Prague 6 – Dejvice, 166 28, Czech Republic,

<sup>2</sup>Biomedical Nutrition, Lund Institute of Technology, Lund University, P.O. Box 124, 221 00 Lund, Sweden

<sup>1</sup>Ústav kvasné chemie a bioženyřství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6 – Dejvice, 166 28, ČR

<sup>2</sup>Biomedical Nutrition, Lund Institute of Technology, Lund University, P.O. Box 124, 221 00 Lund, Švédsko

**H**ops (*Humulus lupulus* L.) are one of the basic raw materials for brewing beer. They contribute not only the so-called bitterness, the full taste and aroma, but also a number of substances that are the subject of medical and pharmaceutical research to beer. These remarkable substances also include polyphenols – natural antioxidants. Polyphenol substances generally contribute to the chemical-physical stability of beer, the formation of foam and the resistance towards aging and oxidation of beer. They also have a wide spectrum of beneficial effects on health, such as for example their anti-carcinogenic and anti-microbial effects, they regulate blood pressure and the blood glucose level.

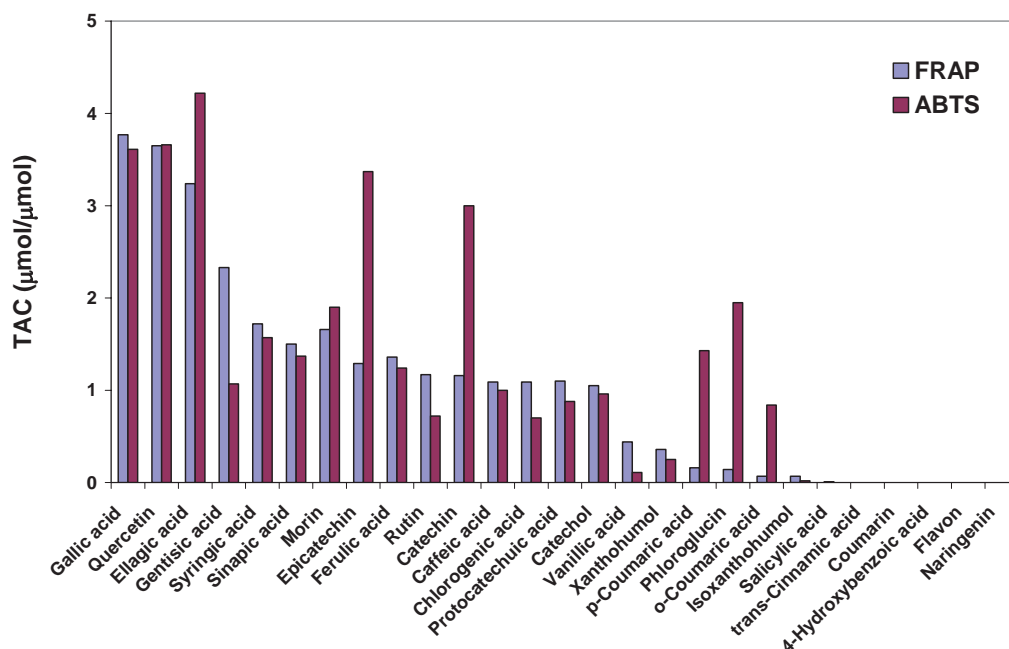
Of the total amount of polyphenols contained in beer, 30% of these come from hops and the remainder from malt. It is assumed that hop polyphenols are more effective antioxidants than malt polyphenols, because they are present during the process of beer brewing for a shorter period of time and consequently their anti-oxidation activity is better preserved. It has been proven that a number of polyphenol substances in hops have similar antioxidant effects to synthetic antioxidants or some vitamins. Consequently beer can increase the level of antioxidants in the human organism thereby prevent-

**C**hmel (*Humulus lupulus* L.) je jednou ze základních surovin na výrobu piva. Přináší do piva nejen tolik oblíbenou hořkost, plnost chuti a vůni, ale i řadu látek, jež jsou předmětem lékařského a farmaceutického výzkumu. Mezi tyto pozoruhodné látky patří polyfenoly – přírodní antioxidanty. Polyfenolové látky se obecně podílejí na chemicko-fyzikální stabilitě piva, na formování pěny a na odolnosti proti stárnutí a oxidaci piva. Dále mají široké spektrum zdraví prospěšných účinků, jako např. antikarcinogenní a antimikrobiální účinky, regulují krevní tlak a hladinu glukosy v krvi.

Z celkového množství polyfenolů obsažených v pivu jich přibližně 30% pochází z chmele, ostatní pochází ze sladu. Předpokládá se, že chmelové polyfenoly jsou účinnějšími antioxidanty než polyfenoly sladové, protože se účastní procesu vaření piva kratší dobu, a mají tak více zachovanou antioxidantní aktivitu. Bylo prokázáno, že řada polyfenolových látek chmele má obdobné antioxidantní účinky jako syntetické antioxidanty či některé vitamíny. Pivo tak může zvyšovat hladiny antioxidantů v lidském organismu, a tím zabraňovat nežádoucím oxidacím volnými radikály, které jsou příčinou řady civilizačních chorob.

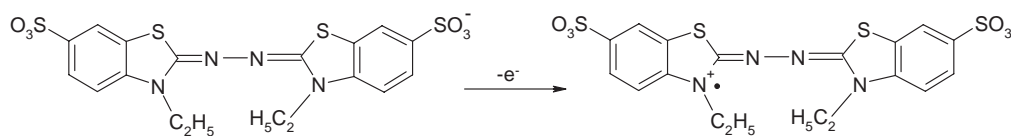
**Figure 1:** Comparison of Total Antioxidant Capacity (TAC) for 27 pure antioxidant substances (concentration in cuvette was 3.75  $\mu\text{mol/L}$ ) measured with the ABTS<sup>+</sup> method and the FRAP method. Results of TAC are expressed in micromoles per micromoles of Trolox.

**Obr. 1:** Porovnání celkové antioxidantní aktivity 27 čistých polyfenolových látek (koncentrace v kyvetě byla 3,75  $\mu\text{mol/l}$ ) měřených pomocí metody ABTS a FRAP. Výsledky jsou vyjádřeny v mikromolech na mikromol Troloxu.



**Picture 2:** Oxidation of ABTS to ABTS<sup>•+</sup>

**Obr. 2:** Oxidace ABTS na ABTS<sup>•+</sup>



ing undesirable oxidation by free radicals, which are the cause of a number of civilizational diseases.

Hops contain a large number of bioactive substances, which have strong antioxidant effects. The most important polyphenol substances in hops are epicatechin, catechin, ellagic acid, ferulic acid, gallic acid and rutin. Two various opinions of how to investigate these antioxidant properties of hops exist. The first possibility is precise determination of the amount of individual polyphenol substances and subsequent determination of their antioxidant activity. The second alternative is direct determination of the total antioxidant capacity (AC) of hop varieties.

To detect polyphenol substances in hops it is possible to use highly effective liquid chromatography (HPLC) for example. A UV detector is sufficient to detect majority substances, a weight detector (LC/MS) is more suitable for determination of minority substances. The results of HPLC determination of the contents of selected polyphenol substances in Czech varieties of hops are given in table 1. Determination of the antioxidant activity of individual polyphenol substances follows. Several analytical methods can be used to determine this. The most frequently used method is the simple ABTS or FRAP spectrophotometric method. A comparison of the antioxidant activity of selected polyphenol substances by ABTS and FRAP methods is given in picture 1.

The principle of the ABTS method is the reaction of 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), which in the presence of potassium diperoxodisulphate creates a green ABTS<sup>•+</sup> radical cation (Pic. 2), this slakes, i.e. decolours in the presence of antioxidants. The intensity of the resulting colouring measured at 734 nm is then equal to the degree of inhibition of the reaction. The cation may be dissolved both in water and in organic solvents.

The FRAP method is based on measuring the activity of antioxidants that cause a reduction of a ferric ion to a ferrous ion. The ferrous ion reacts with 2,4,6-tri(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) in a stoichiometric proportion of 1:2, a chelate originates, an intensely blue coloured complex of Fe<sup>2+</sup>-TPTZ (Picture 3). The amount of this complex in the system determines the effectiveness of the antioxidant because the more effective the antioxidant the more blue complex originates and the higher

Chmel obsahuje velké množství bioaktivních látek, které mají silné antioxidační účinky. Nejdůležitějšími polyfenolovými látkami chmele jsou epikatechin, catechin, kyselina ellagová, kyselina ferulová, kyselina gallová a rutin. Existují dva různé pohledy jak tyto antioxidační vlastnosti chmele zkoumat. První možností je přesné stanovení množství jednotlivých polyfenolových látek a následné určení jejich antioxidační aktivity. Druhou variantou je přímé stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC) odrůd chmele.

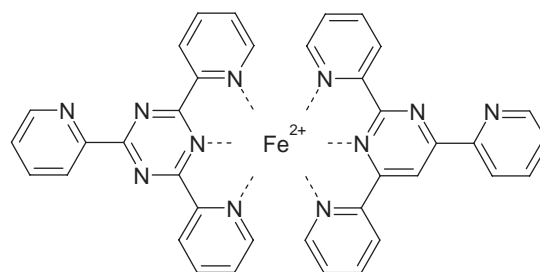
K detekci polyfenolových látek chmele lze použít například vysokoúčinnou kapalinovou chromatografi (HPLC). K detekci majoritních látek postačuje UV detektor, pro stanovení minoritních látek je vhodnější využít hmotnostní detektor (LC/MS). Výsledky HPLC stanovení obsahu vybraných polyfenolových látek v českých odrůdách chmele uvádí tabulka 1. Následuje určení antioxidační aktivity jednotlivých polyfenolových látek. K tomu lze využít několik analytických metod. Nejčastěji je používána jednoduchá spektrofotometrická metoda ABTS či metoda FRAP. Porovnání antioxidační aktivity vybraných polyfenolových látek metodami ABTS a FRAP je uvedeno na Obr. 1.

Principem metody ABTS je reakce 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonové kyseliny (ABTS), která v přítomnosti persíranu draselného vytváří zelený radikálový kation ABTS<sup>•+</sup> (Obr. 2), ten se v přítomnosti antioxidantů zhasí, tj. odbarvuje. Intenzita vzniklého zbarvení měřená při 734 nm je pak rovna míře inhibice reakce. Kation může být rozpuštěn jak ve vodném, tak i v organickém rozpouštědle.

Metoda FRAP je založena na měření aktivity antioxidantu, který způsobuje redukci železitého iontu na železnatý iont. Železnatý iont reaguje s 2,4,6-tri(2'-py-

**Picture 3:** Structure of the blue coloured Fe<sup>2+</sup>-TPTZ complex

**Obr. 3:** Struktura modře zbarveného komplexu Fe<sup>2+</sup>-TPTZ



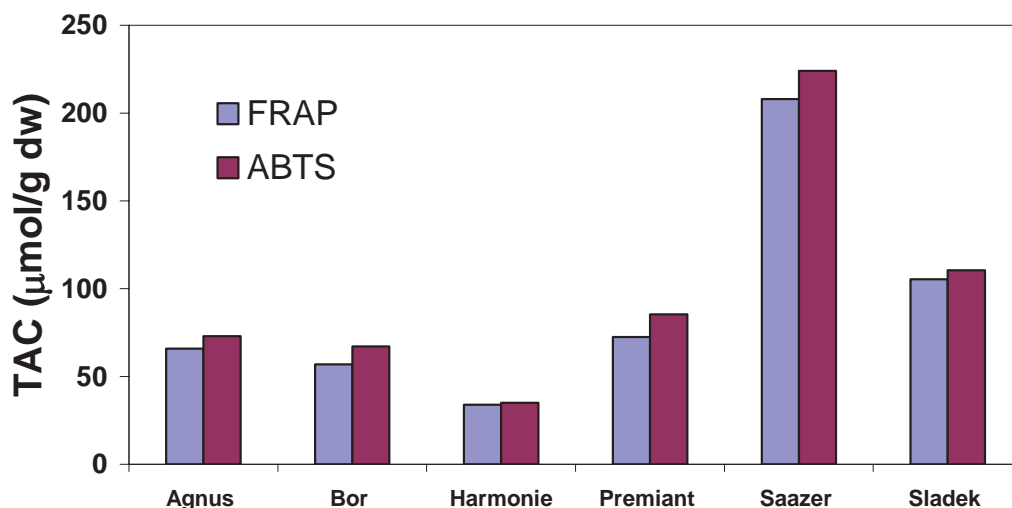
the absorbance of the solution. This complex is soluble in organic and water solutions, its absorbent maximum is at 593 nm. Optimum pH for origin of the blue colouring is in the range of 3.4 to 5.8. Both methods are most frequently calibrated to Trolox, a water-soluble analogue of vitamin E.

The second, more frequently used alternative, is direct determination of the total antioxidant capacity (TAC

ridyl)-1,3,5-triazinem (TPTZ) ve stechiometrickém poměru 1:2, vzniká chelát, intenzivně modře zbarvený komplex  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ (Obr. 3). Množství tohoto komplexu v systému určuje účinnost antioxidantu, neboť čím účinnější je antioxidant, tím vzniká více modrého komplexu, a tím vyšší je absorbance roztoku. Tento komplex je rozpustný v organických i vodných roztocích, jeho absorpční maximum je při 593 nm. Optimální pH pro vznik modrého zbarvení je v rozmezí od 3,4 do 5,8.

**Figure 4:** Total Antioxidant Capacity (TAC) in hop water extract as measured with the ABTS<sup>+</sup> method and the FRAP method. Concentrations of hop in both cuvettes were 0.06 g/L. The results of TAC are expressed in micromoles per gram of dry hop.

**Obr. 4:** Celková antioxidační kapacita (TAC) naměřená metodou ABTS a metodou FRAP. Koncentrace chmele byla 0,06 g/L. Výsledky TAC jsou vyjádřeny v micromol/g sušeného chmele.



– total antioxidant capacity) in water extracts of hops. Again it is possible to use the ABTS or FRAP methods. By comparison of both methods of determination the total antioxidant capacity for Czech hop varieties is given in Picture 4. The picture shows that the highest total antioxidant capacity was measured in the fine aromatic variety Saaz (identified in the picture as Saazer). Using these methods it is simple to acquire an overall overview of the antioxidant capacities of individual hop varieties.

The ABTS and FRAP methods provide comparable results. In the case of precise determination of individual hop polyphenols using the HPLC method the disadvantage is the large number of detected analytes in the hop matrix and consequently the laboriousness and expense of this method. The advantage is precise determination of the individual analytes of known antioxidant activity. Using this method it is then possible to purposefully cultivate varieties with a higher content of specific polyphenol substances that are responsible for the effects of hops that are beneficial to health.

The advantage of direct determination of the antioxidant capacity (TAC) is fast screening of samples, simplicity and cheapness. Another positive factor is that the total antioxidant capacity is directly bound to the amount of total polyphenols in the given variety. Consequently it can be applied as determination of the total polyphenols. The comparison of the results of measuring of total

Obě metody se nejčastěji kalibrují na Trolox, ve vodě rozpustný analog vitamínu E.

Druhou častěji užívanou možností je přímé stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC – total antioxidant capacity) ve vodných extraktech chmele. Opět lze použít metodu ABTS a FRAP. Porovnání obou metod stanovení celkové antioxidační kapacity pro české odrůdy chmele je uvedeno na Obr. 4. Z obrázku je vidět, že nejvyšší celková antioxidační kapacita byla naměřena u jemné aromatické odrůdy Žatecký poloraný červeňák (v obrázku označena jako Saazer). Těmito metodami je snadné získat celkový přehled o antioxidační kapacitě jednotlivých odrůd chmele.

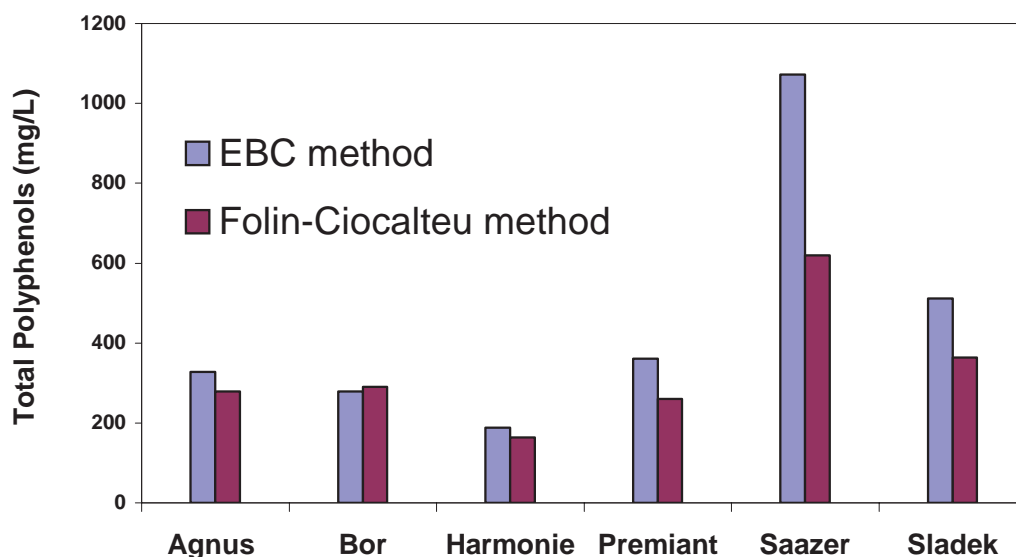
Metody ABTS a FRAP poskytují srovnatelné výsledky. V případě přesného stanovení jednotlivých polyfenolů chmele metodou HPLC je nevýhodou velké množství detekovaných analytů v chmelové matici, a tutíž i velká pracnost a finanční náročnost této metody. Výhodou je přesné stanovení jednotlivých analytů o známé antioxidační aktivitě. Pomocí této metody lze pak cíleně šlechtit odrůdy s vyšším množstvím konkrétních polyfenolových látek, jenž jsou odpovědné za zdraví prospěšné účinky chmele.

Výhodou přímého stanovení antioxidační kapacity (TAC) je rychlý screening vzorků, jednoduchost a finanční nenáročnost. Dalším pozitivním faktem je, že celková antioxidační kapacita je přímo spjata s množ-



**Figure 5.** Comparison of methods for determination of total polyphenols in hop. The results from EBC method are expressed as milligrams per litre of hop extract (20 g/L). The results from Folin-Ciocalteu method are expressed as milligrams gallic acid equivalent (GAE) per litre of hop extract (20 g/L).

**Obr. 5:** Porovnání metod určení obsahu polyfenolů ve chmelu. Výsledky metody EBC jsou vyjádřeny v miligramech na litr chmelového extraktu (20g/L). Výsledky metodou Folin-Ciocalteu jsou vyjádřeny jako miligramy (GAE) na litr chmelového extraktu (20g/L).



polyphenols in Czech hop varieties using the method according to EBC and the method according to Folin-Ciocalteu is given in Picture 5.

stvím celkových polyfenolů v dané odrůdě. Lze ji proto aplikovat jako stanovení obsahu celkových polyfenolů. Porovnání výsledků měření celkových polyfenolů v českých odrůdách chmele metodou podle EBC a metodou podle Folin-Ciocalteu je uvedeno na Obr. 5.

**Table 1. Polyphenol Content in Water Extracts from Czech Hop Samples, harvest 2004 (average, n = 2)**  
**Tabulka 1: Obsah polyfenolů v českých odrůdách chmele (2004)**

no.	compound	retention time (min)	variety					
			Agnus	Bor	Harmonie	Premiant	Saazer	Sladek
1	gallic acid	2.6	15.9	14.4	15.7	8.7	9.1	18.8
2	protocatechuic acid	4.9	6.2	14.0	11.0	nd	3.0	12.1
3	4-hydroxybenzoic acid	9.0	2.5	1.5	1.2	2.2	1.9	3.6
4	(+)-catechin	10.7	10.0	6.3	2.2	nd	41.7	nd
5	vanillic acid	12.5	17.0	6.8	3.1	6.1	8.5	12.8
6	caffeic acid	14.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	syringic acid	15.2	0.7	nd	nd	0.6	0.8	1.5
8	(-)-epicatechin	17.1	25.6	22.9	10.3	11.8	22.6	25.9
9	p-coumaric acid	19.2	4.4	3.5	2.7	0.6	5.2	4.0
10	ferulic acid	21.5	32.6	33.0	14.5	18.7	28.0	66.0
11	sinapic acid	22.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	o-coumaric acid	26.1	0.5	nd	nd	nd	0.5	nd
13	rutin	28.6	54.8	44.2	39.2	12.4	103.7	76.4
14	ellagic acid	29.3	14.4	12.4	9.2	6.9	15.9	11.9
15	trans-cinnamic acid	32.4	3.7	3.4	3.5	1.1	4.4	6.6
16	quercetin	35.6	1.8	0.7	2.5	0.9	0.9	3.5
<b>Sum of polyphenols (mg/100 g dw)</b>			<b>189.9</b>	<b>163.1</b>	<b>115.1</b>	<b>70.0</b>	<b>246.2</b>	<b>243.3</b>

<sup>a</sup>results are expressed in milligrams per 100 grams of dry hop; nd - not detected

