ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V CHMELU A PIVU

Martin Fidler, Lenka Kolářová, Michal Holčapek

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko.technologická, Univerzita Pardubice,
nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
E-mail: martin.f@centrum.cz

Úvod

V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků o úloze volných radikálů na živé organismy. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Reakce iniciované radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Jednou z možností, jak chránit organismus před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty prodlužují trvanlivost potravin, které chrání před oxidací, redukují vzniklé hyperoxidy, váží do komplexů katalyticky působící kovy a eliminují přítomný kyslík. Mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají spolu s potravou mají antioxidační vlastnosti. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, víno, chmel, pivo, aromatické a léčivé rostliny a další. Vzhledem k vysoké spotřebě představuje pivo jeden z nejvýznamnějších zdrojů přírodních antioxidantů u nás. Polyfenolické látky, jako nejširší skupina antioxidantů v pivovarství, hrají navíc významnou úlohu i v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování.

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními. Chemické metody mohou být založeny na použití činidel poskytující s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zbarvení se většinou měří spektrofotometricky.

Jednou ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity je metoda využívající zhášení radikálového kationtu $ABTS^{+\cdot}$ (2,2´-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát). Radikál kation se připravuje reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem v poměru 2:1 za vzniku modrozeleného roztoku, jehož zbarvení je měřitelné při 734 nm. Reakční směs je složena z radikálu ABTS a nezreagovaného ABTS. Přítomnost nezreagovaného ABTS vede ke stabilitě absorbance reakčního směsi. Generování $ABTS^{+\cdot}$ lze provést rovněž pomocí

MnO_2, AAPH (2,2´-azobis (2-amidinopropan) dichlorid) či systémem H_2O_2/peroxidasa. Vlivem antixidantů dochází k odbarvení modrozelené reakční směsi, přičemž úbytek absorbance je úměrný antioxidační aktivitě. Další metoda využívá zhášecí schopnost radikálu DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), což je stabilní volný radikál, který může být díky své struktuře akceptorem atomu vodíku a přejít do formy stabilní diamagnetické molekuly. DPPH v methanolu má intenzivní fialové zbarvení měřitelné při 515 nm. Působením antioxidantů se intenzita jeho zbarvení snižuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Pro měření antioxidační kapacity lze dále využít metody založené na zhášení fluorescence (ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity) a metody na principu redoxní reakce (FRAP – Ferric Reducting Antioxidant Potential), kde je u antioxidantu měřena spíše jeho redukční schopnost. Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů (např. Fe^{III}-TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)), které jsou téměř bezbarvé a po redukci vytváří fialové barevné produkty, které jsou měřitelné spektrofotometricky při 793 nm.

Existují i fyzikální metody, které však nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Zabývají se změnou fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází. Příkladem je elektronová spinová rezonance, stanovení redox potenciálu či chemiluminiscence.

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí látek byl zaveden pojem celková antioxidační kapacita (TAC - total antioxidant capacity). Existuje velké množství metod pro stanovení TAC, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). TEAC odpovídá antioxidační aktivitě vzorku, která je vztažena ke standardní látce - Troloxu. Relativní antioxidační kapacita se vyjadřuje jako koncentrace Troloxu se stejnou antioxidační kapacitou jako má 1 mmol, 1 ml či 1 g stanovovaného vzorku.

Tabulka I: Seznam studovaných vzorků piv

P1	Braník ležák	P11	Velkopopovický kozel - medium
P2	Budweiser - sv. ležák	P12	Klasik
P3	Velkopopovický kozel - premium	P13	Krušovice Mušketýr
P4	Staropramen ležák	P14	Zlatopramen 11°
P5	Gambrinus premium	P15	Bud Superstrong
P6	Pilsner Urquell	P16	Krušovice jubilejní ležák
P7	Stella Artois	P17	Staropramen černý
P8	Radegast premium	P18	Krušovice černé
P9	Starobrno ležák	P19	Radegast Birell - nealko
P10	Pernštejn - sv. ležák	P20	Staropramen nealko

Tato práce je zaměřena na sledování antioxidační aktivity u 20 vybraných vzorků piv, které se lišily jednak způsobem výroby (Pilsner Urquell, Radegast, atd.), a také druhem piva (ležáky, výčepní piva, nealkoholická, tmavá a speciální piva). Seznam studovaných vzorků piv je uveden v tabulce 1. Dále se sledovala antioxidační aktivita vzorků chmelových granulí a extraktů z chmele.

Experimentální část

Metoda používající radikál ABTS: Tableta ABTS diamonné soli byla rozpuštěna v destilované vodě a k ní bylo přidáno ekvivalentní množství peroxodisíranu draselného. Roztok byl ponechán reagovat 12 – 16 hodin za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při vlnové délce 734 nm proti destilované vodě ve srovnávací kyvetě. Ke 2 ml tohoto roztoku bylo přidáno 25 µl vzorku (piva, standardu, extraktu). Absorbance byla odečtena před začátkem měření a po 30 minutách od přidání vzorku. Byl vypočten úbytek absorbance v % a přepočten na ekvivalenty Troloxu.

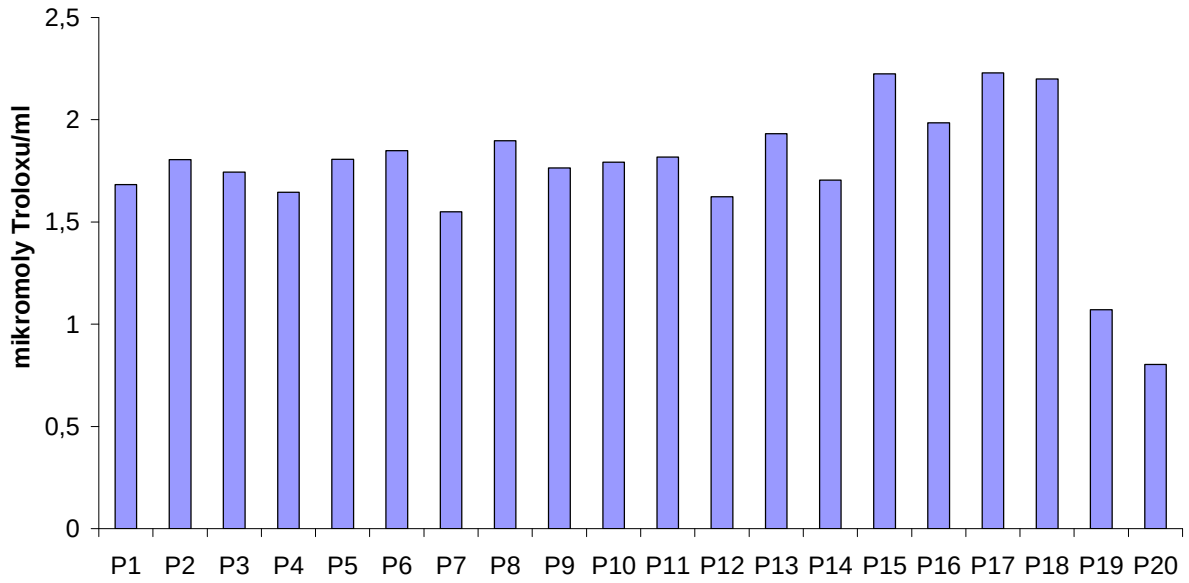
Metoda používající radikál DPPH: Zásobní roztok DPPH o koncentraci 1mmol/l byl smíchán s acetátovým pufrem v poměru 1:2. Ke 1,9 ml tohoto roztoku bylo přidáno 100 µl vzorku (piva, standardu, extraktu) a byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce 515 nm proti methanolu, který byl ve srovnávací kyvetě. Absorbance byla měřena každých 30 s po dobu 10 minut (kinetika reakce) a dále po 30 minutách. Byl vypočten úbytek absorbance v % a přepočten na ekvivalenty Troloxu.

Metoda FRAP: Byl připraven 20 mM roztok $FeCl_3$ ve vodě, dále 10 mM roztok komplexu TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) ve vodě s přídavkem HCl. Měření probíhalo v prostředí octanového pufru o pH 3,6. Reakční směs vznikla smícháním roztoků $FeCl_3$, TPTZ a pufru v poměru 1:1:10. Reakce byla měřena při vlnové délce 593 nm. Bylo smícháno 2 ml reakční směsi s 25 µl standardu Troloxu či piva. Po 10 minutách od začátku reakce byla odečtena absorbance.

Výsledky a diskuze

Všechny výsledky byly zpracovány v jednotkách TE (Trolox Equivalent) kvůli porovnatelnosti jednotlivých vzorků i metod. Srovnání bylo provedeno pomocí standardu Troloxu. U každé metody byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance (úbytku/nárustku) na koncentraci Troloxu. Výsledky jsou uvedeny v µmol Troloxu na jednotku vzorku (ml, g).

Na obr. 1 jsou uvedeny antioxidační aktivity jednotlivých vzorků piv (seznam – viz tabulka 1), proměřených pomocí radikálu ABTS. Na obr. 1 je vidět, že výčepní piva a ležáky mají skoro stejnou antioxidační aktivitu, zatímco piva speciální, např. P15 (16-ti stupňové pivo), mají antioxidační aktivitu mnohem vyšší, což může být způsobeno větším obsahem mladiny. Nejmenší aktivitu mají piva nealkoholická (P19, P20), která se od ostatních piv zcela liší svým technologickým postupem výroby. Velice zajímavá je vysoká hodnota antioxidační aktivity u černých piv (P17, P18), pro jejichž přípravu se využívá jiný typ sladu a chmelu.

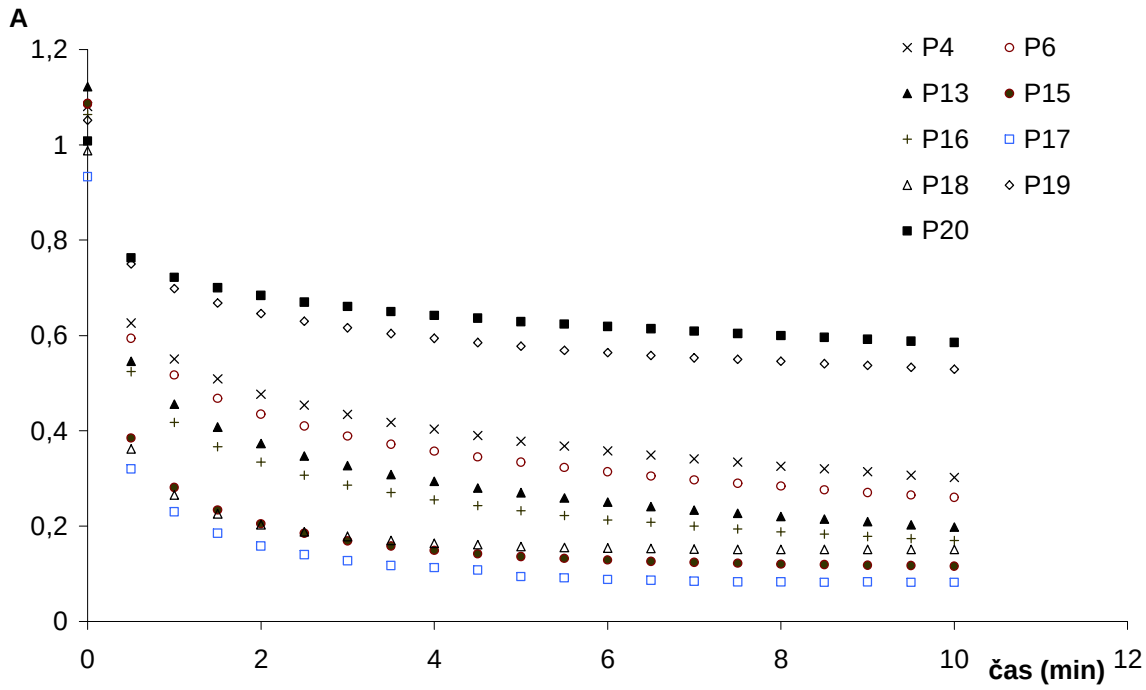


Obr. 1: Antioxidační aktivita studovaných vzorků piv – metoda ABTS.

Na obr. 2 je vidět kinetický průběh reakce vzorků piv s radikálem DPPH. Graf je závislost absorbance na čase. Ve 30 minutě, kdy měření končí, mají piva skoro stejnou antioxidační aktivitu, ale průběh reakce je u každého druhu odlišný. Nealkoholická piva (P19, P20) mají malou pomalý pokles absorbance. Piva černá (P17, P18) i piva speciální (P15) mají na počátku prudký pokles absorbance a po uplynutí 10. minuty se jejich absorbance už prakticky nemění a je konstatní.

U metod DPPH a ABTS byly proměřeny vzorky piv, granulí a extraktů z chmele. U metody FRAP byly proměřeny pouze vzorky piv. Pokusy o měření chmelových granulí a extraktů z chmele, ale kvůli rozpustnosti to nebylo možné. Metoda FRAP pracuje ve vodném prostředí, po přídavku vzorku extraktů z chmele rozpuštěných v methanolu došlo k zakalení. Aplikovat metodu FRAP do prostředí methanol/vodný pufr se nezdařilo, vznikal jiný

komplex, který byl nestabilní a docházelo k samovolné redukci. Metoda tak byla vyhovující jen pro standard Trolox a pivo.



Obr. 2: Kinetický průběh reakce DPPH s vybranými vzorky piv.

Poděkování

Tato práce byla podporována grantovým projektem č. MSM0021627502 sponzorovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektem č. 203/05/2106 sponzorovaný Grantovou agenturou České republiky.

Literatura

1) Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: Chem. Listy *100*, 184 (2006).

2) Zloch Z., Čelakovský J., Aujezdská A., Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu, Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu Danone (2004)

3) Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Chem. Listy *98*, 174 (2004).

4) Cano A., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Acosta M., Arnao M.B.: Phytochemical Analysis *9*, 196 (1998).

5) Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Free Radical Biology & Medicine *26*, 1231 (1999).