

---

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

---

### STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH CHMELOVÝCH PRENYLFLAVONOIDŮ METODOU HPLC-PDA VE CHMELOVÉM MATERIÁLU

TEREZA HUDCOVÁ, HANA SKOUPÁ, LUKÁŠ  
JELÍNEK, MARCEL KARABÍN a PAVEL  
DOSTÁLEK

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
pavel.dostalek@vscht.cz

Došlo 9.6.14, přepracováno 17.10.14, přijato 18.11.14.

---

Klíčová slova: chmelové prenylflavonoidy,  
8-prenylaringenin, isoxanthohumol, xanthohumol

---

#### Úvod

Chmel je důležitým zdrojem biologicky aktivních sekundárních metabolitů, z nichž řada vykazuje pozitivní účinky na lidské zdraví. Farmaceuticky důležitými látkami obsaženými ve chmelu jsou především prenylované flavonoidy, řadí se mezi polyfenolové sloučeniny<sup>1–3</sup>. Majoritním prenylflavonoidem chmele je chalkon xanthohumol, jehož koncentrace v chmelových hlávkách se pohybuje v závislosti na odrůdě a ročníku sklizně v rozmezí 0,2–1,1 hm.% (cit.<sup>4</sup>).

Pozitivních zdravotních účinků prenylflavonoidů je známa celá řada. Působí antioxidantně a zpomalují tak průběh patologických procesů, jako je např. rakovina, ateroskleróza či infarkt myokardu. Značná pozornost je v současné době věnována především antikarcinogenním účinkům prenylflavonoidů. Xanthohumol a ostatní prenylflavonoidy účinně inhibují proliferaci nádorových buněk a zabraňují tak růstu karcinomu a vzniku metastáz, přičemž působí především na buňky lidského karcinomu prsu, vaječníku a tlustého střeva<sup>1–4</sup>. Mechanismus chemopreventivního účinku xanthohumolu a ostatních prenylflavonoidů na růst nádoru v rané fázi spočívá v inhibici metabolické aktivace prokarcinogenů a indukci karcinogendetoxifikačních enzymů. Mechanismus antikarcinogenních účinků prenylflavonoidů na růst nádoru v pokročilém stádiu zahrnuje inhibici DNA syntézy, inhibici angiogeneze a potlačení vzniku zánětů<sup>1</sup>.

Dalším významným účinkem prenylflavonoidů, zejména 8-prenylaringenu, je jejich estrogenní aktivita, díky které jsou schopny alternovat lidské steroidní hormony – estrogyeny, a potlačovat tak klimakteriální symptomy či snižovat riziko vzniku nádorových onemocnění spojených s hormonálním systémem<sup>4</sup>.

Jediný zdroj prenylflavonoidů v lidské výživě je pivo, ovšem vzhledem k jejich velice nízkým obsahům v konečném produktu je nutno konstatovat, že běžnou konzumací piva není možné dosáhnout koncentrace těchto látek v plazmě v takové míře, aby vykazovaly výraznější pozitivní účinky na lidské zdraví<sup>5</sup>. Xanthohumol je sice majoritní prenylflavonoid v chmelových hlávkách, ovšem v hotovém pivu se nachází jen ve velmi nízké koncentraci (většinou nižší než 0,1 mg l<sup>-1</sup>). Prostřednictvím isomerace, při které dochází k cyklizaci přes hydroxylovou skupinu, je xanthohumol v průběhu výroby piva přeměňován až z 95 % na isoxanthohumol, což je prenylflavonoid nejvíce zastoupený v konečném produktu.

Vzhledem k řadě pozitivních účinků chmelových prenylflavonoidů na lidské zdraví, jsou nejnovější výzkumy zaměřeny na to, jak zvýšit jejich příjem ve výživě. Možným řešením mohou být potravinové doplňky obsahující biologicky aktivní látky z chmele.

Vzhledem k využití chmelových prenylflavonoidů v potravinářském a farmaceutickém průmyslu je nyní kladen důraz na zdokonalení metod pro kvantifikaci těchto biologicky aktivních látek. Cílem naší práce byl vývoj spolehlivé analytické metody využívající HPLC-PDA (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem s diodovým polem) pro stanovení všech významných prenylovaných flavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylaringenin) ve chmelových materiálech (chmel, chmelové výrobky, vedlejší produkty zpracování chmele, potravinové doplňky na bázi chmele). Pro účel analýzy prenylflavonoidů byla vyvinuta metoda založená na kombinaci extrakčního postupu vycházejícího z běžně používaných metod pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chmelu<sup>6</sup> a modifikovaného chromatografického stanovení převzatého z metody Dhooghe a spol.<sup>7</sup>

#### Experimentální část

##### Chemikálie

Pro extrakci chmelového vzorku byl použit methanol, p. a. (Sigma-Aldrich, SRN) a diethylether, p. a. (Lach-ner, ČR). Na okyselení roztoku byla použita kyselina chlorovodíková, p. a. (38%, Penta, ČR). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN) a demineralizovaná voda. Na okyselení mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí, p. a. (Penta, ČR). Standardy xanthohumolu (Hopsteiner, SRN), isoxantho-

humolu (Toroma Organics, SRN), a 8-prenylnaringenin (Toroma Organics, SRN) byly čistoty 98 % a vyšší.

#### Přístroje a zařízení

Všechny analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu 1100 Series (Agilent, USA) s kolonou s reverzní fází ECLIPSE XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  150 mm (Agilent, USA) a PDA detektorem (Agilent, USA). Na přípravu ultračisté vody byl použit přístroj MILLI Q RG (Millipore, USA). Při přípravě vzorku byly použity kalibrované laboratorní váhy (třída přesnosti I), třepačka LT2 (Kavalier, ČSR), vakuová odparka RWO6-ML (Ika Werke, SRN) a ultrazvuková lázeň (JP Selecta, Španělsko). Vzorky byly filtrovány přes teflonové (PTFE) filtry (velikost pórů 0,2  $\mu\text{m}$ ), (Whatman, SRN).

#### Analyzovaný materiál

K analýze prenylovaných látek byl použit zbytkový materiál získaný extrakcí chmelových hlávek české vysookoobsažné chmelové odrůdy Vital superkritickým oxidem uhličitým. Tato odrůda byla vyšlechtěna s ohledem na její využití ve farmaceutickém průmyslu, je charakteristická vysokým obsahem prenylovaných flavonoidů – především desmethylxanthohumolu (0,3–0,4 hm.%), xanthohumolu (0,7–1 hm.%) a alfa (12–16 hm.%) a beta (6–10 hm.%) hořkých kyselin. V důsledku své vyšší polaritě zůstávají prenylflavonoidy (na rozdíl od pryskyřic) v extrakčním zbytku, který se tak může stát vhodnou surovinou pro produkci materiálu s navýšeným množstvím látek s pozitivním účinkem na lidské zdraví<sup>8</sup>.

#### Postup přípravy vzorku

Chmelový materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku, a poté byl navážen 1 g s přesností na čtyři desetinná místa a extrahován směsí 20 ml methanolu a 100 ml diethyletheru po dobu 30 min na třepačce. Následně bylo do baňky přidáno 40 ml 0,1 M HCl a extrakce na třepačce pokračovala dalších 10 min. Poté byla směs ponechána v klidu po dobu 10 min, aby došlo k dobrému oddělení fází. 25 ml etherové fáze nad sedimentem bylo následně převedeno do 100ml srdcové baňky a veškerý diethylether byl odpařen na vakuové odparce do sucha při laboratorní teplotě. Po odpaření byl extrakt rozpuštěn v 5 ml methanolu a před převedením do vialky byl zfiltrován přes teflonový mikrofiltr.

Připravené vzorky byly analyzovány technikou vysoceúčinné kapalinové chromatografie.

#### Podmínky HPLC analýzy

Mobilní fáze: A – odplyněná demineralizovaná voda (0,05 hm.% mravenčí kyselina); B – odplyněný acetonitril (0,05 hm.% mravenčí kyselina). Gradient (tab. I): Od 0. do 42. minuty se podíl mobilní fáze B lineárně zvyšoval z 35 % na 95 %. Stacionární fáze: reverzní fáze C18, 5  $\mu\text{m}$ ,

Tabulka I

Gradient složení mobilní fáze (obj.%), A – demineralizovaná voda (0,05 hm.% mravenčí kyselina), B – acetonitril (0,05 hm.% mravenčí kyselina)

Čas [min]	A	B
0	65	35
40	38	62
42	5	95
47	5	95

4,6  $\times$  150 mm, teplota 30 °C, průtok 0,8 ml min<sup>-1</sup>, detektor PDA, nástřik 10  $\mu\text{l}$ .

Látky byly identifikovány metodou porovnání retenčních časů a absorpčních maxim se standardy. Přesný obsah analyzovaných látek ve vzorcích byl stanoven metodou vnější kalibrace ( $n=4$ ). Rozsah kalibrační přímky byl v 0–420 mg l<sup>-1</sup> v případě xanthohumolu (což odpovídá 0–1001 mg/100 g vzorku), 0–15 mg l<sup>-1</sup> v případě isoxanthohumolu (0–36 mg/100 g) a 0–16 mg l<sup>-1</sup> (0–38 mg/100 g) v případě 8-prenylnaringenin. Retenční časy jednotlivých látek jsou uvedeny v tab. II. Ukázkové chromatogramy zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým jsou na obr. 1 a 2. Xanthohumol byl detegován a vyhodnocen při vlnové délce 370 nm (obr. 1), isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin při vlnové délce 290 nm (obr. 2), což jsou vlnové délky blízké jejich absorpčním maximům (cit.<sup>7,8</sup>).

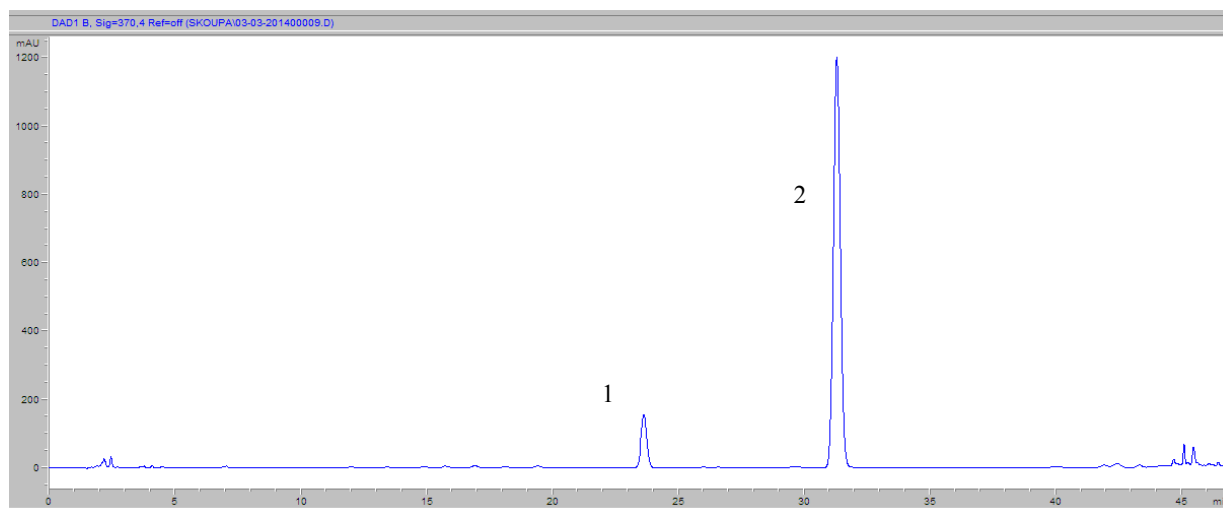
#### Výsledky a diskuse

Pro potvrzení robustnosti inovované metody byl proces izolace i analýzy prenylflavonoidů ve výchozím materiálu (zbytek po extrakci chmelových hlávek odrůdy Vital superkritickým oxidem uhličitým) opakován desetkrát ( $n=10$ ). Míra proměnlivosti výsledků (opakovatelnost) stanovení koncentrace prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) je nepřímo úměrná vyšší směrodatné odchylky. Průměrná koncentrace xanthohumolu, isoxanthohumolu a 8-prenylnaringenin ve chme-

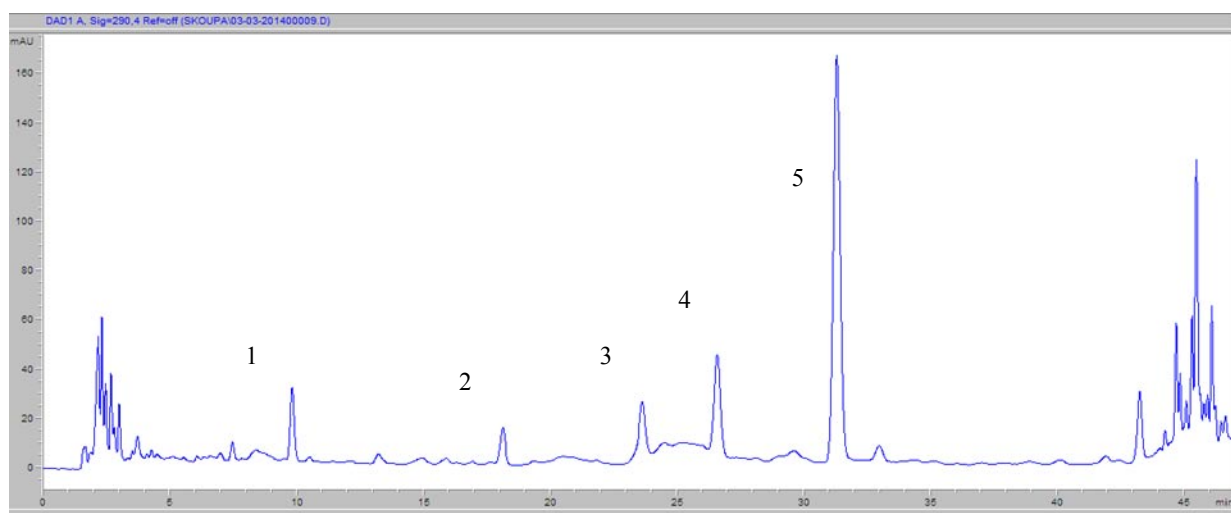
Tabulka II

Základní údaje o retenčních časech jednotlivých prenylflavonoidů při HPLC analýze. Kolona: ECLIPSE XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  150 mm, detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), průtok 0,8 ml min<sup>-1</sup>, vlnová délka  $\lambda = 370$  nm pro xanthohumol,  $\lambda = 290$  nm pro isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin

Látka	Retenční čas [min]
Isoxanthohumol	9,9
8-Prenylnaringenin	18,2
Xanthohumol	31,5



Obr. 1. Chromatogram vzorku připraveného ze zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým. Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  150 mm, průtok 0,8 ml  $\text{min}^{-1}$ , detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), vlnová délka  $\lambda = 370$  nm; 1 – desmethylxanthohumol, 2 – xanthohumol



Obr. 2. Chromatogram vzorku připraveného ze zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým. Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  150 mm, průtok 0,8 ml  $\text{min}^{-1}$ , detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), vlnová délka  $\lambda = 290$  nm; 1 – isoxanthohumol, 2 – 8-prenylningenin, 3 – desmethylxanthohumol, 4 – 6-prenylningenin, 5 – xanthohumol

lovém materiálu, směrodatná odchylka a opakovatelnost v rel.% jsou uvedeny v tab. III.

Relativní směrodatná odchylka byla pro všechny stanovené prenylflavonoidy nižší než 4 rel.%, pro isoxanthohumol odpovídá pouhým 1,61 rel.%. Tuto metodu lze považovat za spolehlivou a tedy i za vhodnou pro stanovení prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu.

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantificati-

on) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Podle uzance se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie<sup>10</sup>.

Meze detekce (3S/N) a meze stanovitelnosti (10S/N) (cit.<sup>9</sup>) jednotlivých prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100 g) jsou uvedeny v tab. IV.

Jako výchozí metoda byla zvolena běžně užívaná metoda pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chme-

Tabulka III

Opakovatelnost metody při stanovení jednotlivých prenylflavonoidů ( $n=10$ )

Prenylflavonoid	Průměrná koncentrace [mg/100 g]	Směrodatná odchylka	Opakovatelnost [rel.%]
Xanthohumol	918,01	32,22	3,51
Isoxanthohumol	26,11	0,42	1,61
8-Prenylnaringenin	16,59	0,54	3,28

Tabulka IV

Mez detekce a mez stanovitelnosti metody stanovení jednotlivých prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100g). Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm, detektor PDA, mobilní fáze acetonitril-voda (gradient uvedený v experimentální části), průtok 0,8 ml min<sup>-1</sup>, vlnová délka  $\lambda = 370$  nm pro xanthohumol,  $\lambda = 290$  nm pro isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin

Prenylflavonoid	LOD	LOQ
Xanthohumol	0,420	1,398
Isoxanthohumol	0,537	1,791
8-Prenylnaringenin	0,713	2,375

lu, a to z důvodu podobné chemické struktury prenylflavonoidů a hořkých kyselin. Z této metody byl převzat způsob přípravy vzorku, založeného na extrakci vzorku směsí diethylether: methanol, 5:1 (v/v), okyselenou kyselinou chlorovodíkovou, ovšem některé kroky tohoto postupu byly upraveny. Vzhledem k tomu, že námi vyvinutá metoda má sloužit k analýze prenylflavonoidů i v relativně drahých chmelových materiálech, jako jsou potravinové doplňky na bázi chmele, zvolili jsme kvůli nižší finanční náročnosti snížení navážky materiálu z původních 10 g na 1 g, a v důsledku toho bylo nezbytně nutné zakoncentrovat vzorek v konečném kroku přípravy vzorku. Chromatografický krok byl založen na metodě publikované Dhooghe a spol. (2010). Z této metody bylo převzato složení mobilní fáze<sup>7</sup>, ovšem délka analýzy byla prodloužena za účelem zmírnění gradientu vedoucího k lepšímu rozdělení pík v průběhu chromatografické analýzy. Vyvinutá analytická metoda HPLC-PDA je kombinací dvou metod a má pro stanovení koncentrací prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu několik zásadních výhod. Příprava vzorku je rychlá a spotřeba rozpouštědel a vzorků je relativně nízká. Zvolená úprava vzorků a metodika stanovení je vhodná i pro stanovení velmi nízkých koncentrací prenylflavonoidů.

Porovnáním absorpčních spekter je možné identifikovat i desmethylxanthohumol a 6-prenylnaringenin, nicméně prozatím z důvodu nedostupnosti čistých standardů nebyla kvantifikace těchto dvou prenylflavonoidů náplní tohoto článku. Výhodou této metody je také to, že umožňuje stanovit ve vzorku všechny prenylflavonoidy (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, pří-

padně desmethylxanthohumol, 6-prenylnaringenin) v průběhu jedné analýzy, a jelikož se jedná o upravenou metodu na stanovení hořkých kyselin, je pravděpodobné že by tato metoda mohla sloužit i ke stanovení dalších biologicky a technologicky významných látek (alfa a beta hořké kyseliny).

## Závěr

Pro účely stanovení prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) ve chmelových materiálech byla vyvinuta metodika, která pomocí systému HPLC-PDA umožňuje kvalitativní i kvantifikační analýzu všech sledovaných prenylflavonoidů. V rámci vývoje metodiky byly stanoveny její validační parametry (opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti).

*Tato práce byla podpořena TA ČR – Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků – TE02000177.*

## LITERATURA

1. Stevens J. F., Page J. E.: *Phytochem.* 65, 1317 (2004).
2. Gerhäuser C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 827 (2005).
3. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Bughler D. R.: *Food Chem. Toxicol.* 37, 271 (1999).
4. Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P.: *Chem. Listy* 106, 1095 (2012).
5. Jelínek L., Karabín M., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: *Chem. Listy* 107, 209 (2013).
6. The American Society of Brewing Chemists: *ASBC Methods of Analysis, Hops 14,  $\alpha$ - and  $\beta$ -Acids in hops and hop extracts by HPLC.* ASBC, Washington 2009.
7. Dhooghe L., Naessens T., Heyerick A., Keukeleire D. D., Vlietnick A., Pieters L., Apers S.: *Talanta* 83, 448 (2010).
8. Krofta K., Patzak J., Nesvadba V., Mikyška A., Slabý M., Čejka P.: *Kvasny Prum.* 59, 2 (2013).
9. Hořta P., Dostálek P., Basařová G.: *Chem. Listy* 98, 825 (2004).
10. Validační program pro statistické zpracování analytických dat [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/ana/validace.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf)

**T. Hudcová, H. Skoupá, L. Jelínek, M. Karabín, and P. Dostálek** (*Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Determination of Bioactive Prenylflavonoids in Hop Materials by HPLC-PDA**

In recent years, an interest in the health-promoting activities of derivatives of hop constituents has grown.

Pharmaceutically important substances in hop are primarily prenylated flavonoids, in the context with their proven biological effects. A reliable analytical method using HPLC-PDA for determination of all prenylated flavonoids (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) in hop materials was developed.



## Kvalitní chemikálie CARL ROTH

Špičková kvalita za rozumnou cenu

- **Klasické chemikálie a reagenty pro analytickou chemii**  
kyseliny, hydroxidy, soli a rozpouštědla
- **Speciální chemikálie**  
rozpouštědla pro HPLC, GC, analýzy DNA, ultra čisté chemikálie pro stopovou analýzu, standardy pro AAS a ICP
- **Normanály a pufrů k okamžitému použití**
- **Přírodní látky, biochemikálie a biologické pufrů**
- **Nosiče, činidla a referenční standardy pro chromatografii**
- **Barvicí roztoky, barviva a indikátory**
- **Detergenty a silikonové oleje**

Kompletní sortiment laboratorních chemikálií CARL ROTH na [www.carlroth.com](http://www.carlroth.com) nebo v katalogu. Napište si o něj. Objednávejte u P-LABu.



Víme, co Vám nabízíme

[www.p-lab.cz](http://www.p-lab.cz) | [info@p-lab.cz](mailto:info@p-lab.cz)