Typizace českých chmelů z pohledu obsahu prenylflavonoidů

Classification of Czech Hops According to their Contents of Prenylflavonoids

Karel KROFTA[1], Světlana VRABCOVÁ[1], Lenka MRAVCOVÁ[1], Pavel DOSTÁLEK[2], Marcel KARABÍN[2], Lukáš JELÍNEK[2], Tereza HUDCOVÁ[2],
[1]Chmelařský institut, s.r.o., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec / *Hop Research Institute, Ltd., Kadaňská 2525, 438 01 Žatec, Czech Republic*
[2]Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, Praha 6, 166 28, Czech Republic*
e-mail: pavel.dostalek@vscht.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Krofta, K. – Vrabcová, S. – Mravcová, L. – Dostálek, P. – Karabín, M. – Jelínek, L. – Hudcová, T.: Typizace českých chmelů z pohledu obsahu prenylflavonoidů. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 3, s. 62–68

Prenylované flavonoidy patří mezi složky chmele s nejvýznamnějšími zdravotně prospěšnými účinky a znalost jejich obsahů a dynamiky jejich úbytku během zpracování chmele patří k nezbytným předpokladům pro produkci piva se zvýšeným obsahem těchto látek. Tato studie je zaměřena na dlouhodobé sledování obsahu prenylflavonoidů, alfa-hořkých kyselin a jejich vzájemného poměru v celém spektru tuzemských chmelových odrůd a také změn těchto parametrů v průběhu skladování a zpracování chmele.

Bylo potvrzeno, že nově vyšlechtěné odrůdy Agnus a Vital patří mezi odrůdy s nejvyšším obsahem prenylflavonoidů. Zejména odrůda Vital je díky svému chemickému složení velmi vhodná pro nepivovarské využití. Na základě sledování úbytku zmíněných látek během zpracování chmele bylo však zjištěno, že pro toto využití bude zcela zásadní vyvinutí nových, šetrnějších postupů, zejména pro sušení chmele, které by minimalizovaly riziko termické a oxidativní degradace.

Krofta, K. – Vrabcová, S. – Mravcová, L. – Dostálek, P. – Karabín, M. – Jelínek, L. – Hudcová, T.: Classification of Czech hops according to their contents of prenylflavonoids. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 3, pp. 62–68

The prenylated flavonoids are hop components with the most beneficial health effects. Information about their content and the dynamics of their decrease during hops processing is necessary for the production of beer with an increased content of these substances. This study deals with the long-term monitoring of the prenylflavonoids and α-bitter acids contents and their ratios in the whole spectrum of domestic hop varieties as well as with changes in these parameters during storage and hop processing.

It was confirmed that the newly cultivated Agnus and Vital varieties are the varieties with the highest contents of prenylated flavonoids. As a result, the Vital variety is particularly useful in non-brewing applications. Based on the monitoring of the decrease in the levels of these components during hop processing it was recognised that development of new gentler methods, particularly for the hop drying would be necessary. These methods should minimize the risk of thermal and oxidative degradation.

Krofta, K. – Vrabcová, S. - Mravcová, L. – Dostálek, P. – Karabín, M. – Jelínek, L. – Hudcová, T.: Typization der tschechischen Hopfen im Hinsicht auf Gehalt an Prenylflavonoiden. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 3, S. 62-68

Die Prenylflavonoide gehören zu den Hopfenkomponenten mit den bedeutendsten gesundheitlich nützlichen Wirkungen und die Kentnisse ihres Gehalts an ihre Abnahme und ihrer Dynamik während der Hopfenverarbeitung gehören zu den unerlässlichen Voraussetzungen fürs mit erhöhtem Gehalt an diese Stoffen Bier herzustellen. Der Artikel befasst sich mit der langfristigen Beobachtung des Gehalts an Prenylflavonoide, Alfa-Bittersäuren und ihren gegenseitigen Verhältnis im ganzen Spektrum von inländischen Hopfensorten und auch Parameteränderungen im Laufe der Lagerung und Hopfenverarbeitung. Es wurde bestätigt, das die neugezüchtete Hopfensorten Agnus und Vital zu den Sorten mit dem höchsten Gehalt an Prenylflavonoide gehören. Dank der chemischen Zusammensetzung ist die Sorte Vital für eine Anwendug auch ausser Brauindustrie geeignet. Auf Grund der Beobachtung der Abnahme von obig gennanten Stoffen während der Hopfenverarbeitung, wurde es jedoch festgestellt, dass eine Entwicklung der zur Minimierung des Risikos der termischen und oxidativen Degradation insbesonders während Hopfentrocknung vom neuen schonenden Verfahren nötig wird.

Klíčová slova: *chmel, alfa-hořké kyseliny, bioaktivní účinky, prenylflavonoidy, xanthohumol, desmethylxanthohumol, kapalinová chromatografie, sušení chmele, stárnutí chmele*

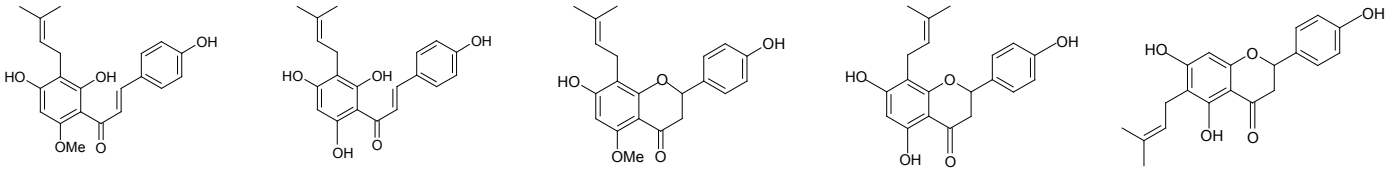
Keywords: *hops, α-bitter acids, bioactive effects, prenylflavonoids, xanthohumol, desmethylxanthohumol, liquid chromatography, hop drying, hop aging*

1 ÚVOD

Chmelové prenylflavonoidy patří ke specifické skupině chmelových polyfenolů chalkonové řady, jejichž syntézy je schopno pouze několik druhů vyšších rostlin. Chmelová rostlina biosyntetizuje a sekretuje prenylflavonoidy lupulinovými žlázkami spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi a díky strukturní podobnosti je lze poměrně snadno analyticky stanovit simultánně s alfa- a beta-hořkými kyselinami kapalinovou chromatografií. K nejdůležitějším prenylchalkonům chmele patří xanthohumol (XN) a desmethylxanthohumol (DMX), které se v průběhu výroby piva při chmelovaru transformují na izomerní flavanony. Xanthohumol se mění na isoxanthohumol, DMX na 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin (*obr. 1*), což je látka, která je v současné době považována za jeden z nejúčinnějších fytoestrogenů (Milligan, 1999). Fytoestrogeny jsou nesteroidní látky rostlinného původu, které vykazují estrogenní aktivitu. Estrogeny obecně patří mezi důležité regulátory mj. reprodukčního systému savců. Z pohledu nejnovějších vědeckých poznatků je výskyt fytoestrogenů konzumovaných v potravinách považován za pozitivní, protože snižují riziko vzniku rakoviny prsu, plic a prostaty, potlačují uvolňování vápníku z kostní hmoty, zmírňují průběh menstruálních

1 INTRODUCTION

Prenylflavonoids in hops belong to a specific group of hop polyphenols, the chalconoids. Only some kinds of vascular plants are capable of the synthesis of chalconoids. The hop plant biosynthesizes and secretes prenylflavonoids through the lupulin glands along with resins and essential oils. Due to the structural similarity, they can be relatively easily analytically determined alongside the α- and β-bitter acids by means of liquid chromatography. Two of the most important prenylchalcons from hops are xanthohumol (XN) and desmethylxanthohumol (DMX). They are transformed to isomers of flavanones in the beer production during the wort boiling. Xanthohumol turns into isoxanthohumol and DMX into 6-prenylnaringenin and 8-prenylnaringenin (*Fig.1*). At present, 8-prenylnaringenin is considered to be one of the most powerful phytoestrogens (Milligan, 1999). Phytoestrogens are non-steroidal compounds of plant origin, which exhibit estrogenic activity. Generally, estrogens are important regulators in the reproduction system of mammals. According to the latest scientific findings, the presence of phytoestrogens in food is considered to be very positive. They reduce the risk of breast, lung and prostate cancers, suppress the excretion of calcium from bones and moder-



Obr. 1 Nejdůležitější prenylflavonoidy chmele / *Fig. 1 The most important prenylflavonoids in hops*

a menopauzálních potíží aj. (Karabín et al., 2012). Aktivita 8-prenylnaringeninu je podstatně vyšší než u genisteinu, daidzeinu a kumestrolu, látek obsažených v soji a jetelu.

Chmelové prenylflavonoidy jsou již řadu let předmětem intenzivního výzkumu díky prokázaným bioaktivním účinkům v podmínkách „*in vitro*" i „*in vivo*". Byly u nich objeveny významné antioxidační, protizánětlivé, antivirové a antikarcinogenní účinky. Xanthohumol, podobně jako humulon, inhibuje proces resorpce vápníku z kostí a působí tak proti vzniku osteoporózy (Tobe et al., 1997). Xanthohumol má také silné protirakovinné účinky, spočívající mimo jiné v silné inhibici specifických P450 enzymů, které způsobují konverzi prokarcinogenů na karcinogeny a vstupuje i do biochemických reakcí odbourávání řady škodlivých látek a napomáhá k jejich odstraňování z organismu přes netoxické metabolity (Henderson et al., 2000). Jako příklad lze uvést mechanismus odbourávání benzenu, známé karcinogenní látky (Miranda et al., 2000). Xanthohumol vykazuje rovněž inhibiční účinky proti iniciaci vzniku karcinomu tlustého střeva, prostaty a vaječníků v mikromolárních koncentracích (Miranda et. al., 1999). Z dalších pozitivních aktivit xanthohumolu je třeba zmínit protizánětlivé účinky, protože inhibuje aktivitu cyklooxygenáz (COX-1, COX-2), enzymů produkujících prostaglandiny, což jsou látky iniciující zánětlivé změny ve tkáních (Gernhauser, 2002). Další biologická aktivita xanthohumolu se týká inhibice aktivity diacylglycelrol transferázy, jaterního enzymu, který je odpovědný za syntézu triglyceridů mastných kyselin (Tabata, 2002). Tato interakce je spojena s pozitivními účinky proti vzniku hypertriglyceridemie a snížením rizika vzniku atherosklerózy a diabetu.

Bioaktivní účinky isoxanthohumolu jsou podobné jako u xanthohumolu, ale slabší. Tato nevýhoda je do značné míry vyvážena vyššími koncentracemi a snadnou biodostupností v pivu. Běžná konzumní piva obsahují do 2 mg/l isoxanthohumolu v závislosti na odrůdě chmele, způsobu chmelení a použité výrobní technologii. Koncentrace xanthohumolu v pivech nepřesahují hranici 0,10 mg/l, koncentrace 8-PN se pohybují do 50 µg/l (Krofta, 2010).

První podrobné informace o obsahu xanthohumolu v českých odrůdách chmele byly publikovány na stránkách tohoto

ate menstrual and menopausal difficulties (Karabín et al., 2012). The activity of 8-prenylnaringenin is considerably higher than that of genistein, daidzein and coumestrol which are present in soya and clover.

Due to the proven bioactive effects "*in vitro*" and "*in vivo*" conditions, the prenylflavonoids from hops have been subjects of intensive scientific research for several years. A number of antioxidative, anti-inflammatory, antiviral and anticancerogenic effects have been discovered. Xanthohumol as well as humulone inhibit the

Tab. 1 Průměrné obsahy alfa kyselin, xanthohumolu a DMX a jejich typické rozsahy pro české odrůdy chmele / *Table 1 Average contents of α-acids, xanthohumol and DMX in Czech hop varieties and their typical intervals*

Odrůda / *Variety*	**Parametr / *Parameters***	**alfa kyseliny (% hm. v pův.) / *alpha acids (% w/w)***	**Xanthohumol (% hm. v pův.) / *(% w/w)***	**DMX (% hm. v pův.) / *(% w/w)***
ŽPČ / *SAAZ*	průměr /*mean*	3.87	0.32	0.09
	medián / *median*	3.60	0.32	0.09
	interval / *interval*	2.9–5.2	0.26–0.39	0.06–0.12
Saaz Late	průměr /*mean*	4.47	0.36	0.09
	medián / *median*	4.35	0.35	0.09
	interval / *interval*	3.5–5.5	0.28–0.46	0.06–0.13
Saaz Special	průměr /*mean*	5.15	0.41	0.14
	medián / *median*	4.47	0.38	0.13
	interval / *interval*	3.7–6.9	0.34–0.49	0.06–0.20
Sládek	průměr /*mean*	7.11	0.63	0.15
	medián / *median*	6.80	0.62	0.14
	interval / *interval*	5.1–9.7	0.51–0.77	0.10–0.20
Harmonie	průměr /*mean*	7.21	0.52	0.12
	medián / *median*	7.33	0.52	0.12
	interval / *interval*	4.8–9.3	0.39–0.63	0.09–0.17
Bohemie	průměr /*mean*	5.40	0.60	0.16
	medián / *median*	5.18	0.62	0.16
	interval / *interval*	4.2–6.6	0.50–0.69	0.09–0.22
Kazbek	průměr /*mean*	6.29	0.35	0.15
	medián / *median*	6.15	0.34	0.14
	interval / *interval*	4.6–8.4	0.27–0.43	0.11–0.20
Bor	průměr /*mean*	7.67	0.39	0.07
	medián / *median*	7.64	0.39	0.07
	interval / *interval*	5.8–9.7	0.30–0.48	0.04–0.11
Premiant	průměr /*mean*	8.29	0.36	0.09
	medián / *median*	8.27	0.36	0.09
	interval / *interval*	6.3–10.4	0.27–0.45	0.05–0.14
Rubín	průměr /*mean*	11.65	0.54	0.08
	medián / *median*	11.80	0.54	0.08
	interval / *interval*	10.1–13.3	0.44–0.66	0.05–0.12
Agnus	průměr /*mean*	11.50	0.87	0.14
	medián / *median*	11.30	0.88	0.14
	interval / *interval*	9.9–13.2	0.77–0.99	0.11–0.17
Vital	průměr /*mean*	12.73	0.71	0.29
	medián / *median*	12.97	0.71	0.29
	interval / *interval*	11.0–14.1	0.59–0.82	0.22–0.37

Tab. 2 Průměrné obsahy alfa kyselin, xanthohumolu a DMX v odrůdě Sládek (žatecká oblast) v období 2004–2014 / *Table 2 Average contents of α-acids, xanthohumol and DMX in the Sladek variety harvested in the Saaz hop region from 2004 to 2014*

Parametr / *Parameter*	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
alfa kyseliny (% hm. v pův.) / *Alpha acids (% w/w)*	5.9	6.7	6.3	5.7	6.7	7.5	7.5	7.8	6.8	6.5	6.2
Xanthohumol (% hm. v pův.) / *(% w/w)*	0.69	0.60	0.58	0.54	0.69	0.64	0.65	0.70	0.57	0.56	0.58
DMX(% hm. v pův.) / *(% w/w)*	0.17	–	–	0.14	0.14	0.13	0.17	0.13	0.14	0.16	0.16

Tab. 3 Porovnání ročníkových obsahů alfa kyselin, xanthohumolu a DMX v odrůdě Premiant ve třech chmelařských oblastech ČR v letech 2010–2014 / *Table 3 Comparison of the contents of α- acids, xanthohumol and DMX in the Premiant variety harvested from 2010 to 2014 in three Czech hop regions*

Parametr / *Parameter*	Rok / *Year*	Chmelařská oblat / *Hop Region*		
		žatecká	úštěcká	tršická
Alfa kyseliny (% hm. v pův.) / *Alpha acids (% w/w)*	2010	9.3	9.5	7.6
	2011	9.7	9.5	9.5
	2012	8.7	7.2	7.9
	2013	7.8	7.1	6.3
	2014	8.2	7.1	6.8
Xanthohumol (% hm. v pův.) / *(% w/w)*	2010	0.40	0.39	0.32
	2011	0.40	0.42	0.39
	2012	0.40	0.33	0.36
	2013	0.33	0.33	0.27
	2014	0.32	0.32	0.30
DMX (% hm. v pův.) / *(% w/w)*	2010	0.11	0.13	0.09
	2011	0.07	0.08	0.05
	2012	0.08	0.08	0.08
	2013	0.13	0.13	0.09
	2014	0.12	0.13	0.10

časopisu v roce 2003 (Krofta, 2003). Týkaly se v té době registrovaných českých odrůd chmele (Žatecký červeňák, Bor, Sládek, Premiant, Agnus). Od té doby bylo registrováno dalších 7 odrůd chmele – Harmonie, Rubín, Bohemie, Kazbek, Saaz Late, Vital a Saaz Special a okruh sledovaných prenylflavonoidů rozšířen o desmethylxanthohumol (DMX). Předložený článek shrnuje informace o obsahu nejdůležitějších prenylflavonoidů chmele ve všech českých odrůdách, které byly shromážděny v průběhu několika let. Dále jsou prezentována data týkající se stability prenylflavonoidů v průběhu posklizňového zpracování chmele a dlouhodobého skladování chmelových výrobků.

2 MATERIÁL A METODY

Obsahy alfa-hořkých kyselin, beta-hořkých kyselin a prenylflavonoidů českých odrůd chmele byly stanoveny ve vzorcích hlávkových chmelů ze sklizní ročníků 2004–2014. Vzorky majoritních odrůd (Žatecký červeňák, Premiant, Sládek, Agnus) pocházely z produkčních chmelnic. Vzorky minoritních odrůd (např. Bor, Harmonie, Rubín, Saz Late, Saaz Special aj.) byly odebrány při sklizni rajonizačních pokusů, šlechtitelských ploch, poloprovozních chmelnic a registračních pokusů Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ). Velká část vzorků byla odebrána přímo u pěstitelů ze sklizňových linek. Část vzorků byla zanalyzována bezprostředně po odběru, jiné byly uchovány až do zpracování v klimatizovaném skladu při teplotách do +5 °C. Stabilitní studie chmelových prenylflavonoidů během sklizně a posklizňové úpravy chmele byla realizována za použití odrůdy Vital v průběhu 3 vegetačních sezón (2010 až 2012). Odrůda byla vybrána s ohledem na relativně vysoký obsah obou prenylflavonoidů (0,70–0,90 % hm. XN; 0,20–0,40% hm. DMX) v sušených hlávkách bezprostředně po sklizni.

Stejná odrůda byla použita i pro zkoumání stability XN a DMX v průběhu dlouhodobého skladování po dobu 12 měsíců v období 2011/2012. Pro tyto pokusy byl granulovaný chmel zabalen do sáčků z vícevrstvé hliníkové fólie a obsah evakuován. Sáčky s granule-

process of bone resorption and thereby prevent osteoporoses (Tobe et al., 1997). Additionally xanthohumol has strong anticancerogenic effects based on the inhibition of the specific P450 enzymes, which cause a transformation of procarcinogens into carcinogens. It is also involved in the biochemical degradation of many damaging substances and helps to remove them from the body by transforming them into nontoxic metabolites (Henderson et al., 2000). An example of this process is the degradation of the seriously dangerous carcinogenic substance benzene (Miranda et al., 2000). Xanthohumol in micro molar concentrations could also prevent the initiation of colon, prostate and ovarian carcinogens (Miranda et. al., 1999). The anti-inflammatory effects should also be mentioned. Xanthohumol inhibits the activity of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2). These enzymes produce prostaglandins, which initiate inflammatory changes in tissues (Gernhauser, 2002). Another positive effect is the inhibition of diacylglycerol tranferase activity. This enzyme is responsible for the synthesis of triglycerides of fatty acids in the liver. This interaction positively influences the development of hypertriglyceridemia and decreases the risk of atherosclerosis and diabetes (Tabata, 2002).

The bioactive effects of isoxanthohumol are similar but weaker than those of xanthohumol. This disadvantage is partially compensated by higher concentrations and an easier bioavailability in the beer. Ordinary beers contain up to 2 mg/l isoxanthohumol depending on the hop variety, hopping method and production technology used. On the contrary, the concentrations of xanthohumol in beer are generally less than 0.10 µg/l and the concentrations of 8-PN are up to about 50 mg/l (Krofta, 2010).

The first detailed information about the contents of xanthohumol in Czech hop varieties was published in this journal in 2003 (Krofta, 2003). It involved the Czech hop varieties registered at that time; Saaz, Bor, Sládek, Premiant and Agnus. Since then seven other hop varieties, namely Harmonie, Rubín, Bohemia, Kazbek, Saaz Late, Vital and Saaz Special have been registered and the prenylflavonoid DMX also became a subject of interest. The present study summarizes information regarding the contents of the most significant prenylflavonoids in all Czech hop varieties collected over several years. Furthermore, data regarding the stability of the hop prenylflavonoids during the course of post-harvest processing and long-term storage of hop products are presented.

2 MATERIALS AND METHODS

The contents of α-bitter acids, β-bitter acids and prenylflavonoids in Czech hop varieties were determined from samples of hop cones harvested in the years 2004 to 2014. The samples of the most prevalent varieties namely Saaz, Premiant, Sladek and Agnus came from normal hop gardens. The samples of the minor varieties such as Bor, Harmonie, Rubin, Saaz Late or Saaz Special were harvested from experimental hop gardens and selective cultivation areas, during pilot cultivation trials or during registration trials for the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture (CISTA). The major part of the samples was collected directly by the growers during the harvest. Some samples were analyzed immediately after collection, whereas

mi byly skladovány bez přístupu světla v klimatizovaném (2–3 °C) i neklimatizovaném (20 °C) prostoru. Část granulovaného chmele byla skladována volně na vzduchu, při pokojové teplotě bez přístupu světla (simulace protržení obalu a ponechání obsahu působení vnějších vlivů). Vzorkování chmelů bylo provedeno po 2, 4, 6, 8, 10 a 12 měsících skladování. Vzorky byly připraveny v takovém počtu, aby při každém vzorkování byl použit k analýzám nový, neporušený sáček. Dynamika procesů stárnutí chmele byla sledována na základě analýzy prenylflavonoidů, alfa-hořkých kyselin, beta-hořkých kyselin a stanovením indexu skladování chmele (HSI) metodou ASBC (Analytica ASBC, 1992). Index skladování chmele HSI byl měřen na UV-VIS spektrofotometru Shimadzu 1601. Obsah a složení chmelových pryskyřic a prenylflavonoidů byly stanoveny simultánně modifikovanou metodou EBC 7.7 (Analytica EBC, 1998). Analýzy byly provedeny na kapalinových chromatografech SHIMADZU LC 10A a LC 20A. K separaci analytů byla použita kolona Nucleosil 250 x 4 mm, 5 mm, RP C18 (Macherey Nagel, Germany). Mobilní fáze se skládala ze směsi methanol-voda-kyselina fosforečná (850:150:5 % obj.). Průtok mobilní fáze činil 0,8 ml/min. Cílové látky byly detekovány detektorem diodového pole při vlnových délkách λ = 314 nm (alfa- a beta-hořké kyseliny) a 370 nm (xanthohumol a DMX). Identifikace prenylflavonoidů byla ověřena porovnáním retenčních časů referenčních látek a shodou UV spekter. Kvantifikace xanthohumolu a DMX byla provedena metodou externí kalibrace pomocí analytických standardů obou látek. Xanthohumol byl zakoupen u firmy Hopsteiner, DMX byl získán darem z univerzity v Gentu (Belgie). Chromatografický záznam simultánního stanovení xanthohumolu, DMX, alfa- a beta-hořkých kyselin je na *obr. 2*. Statistické hodnocení analytických dat bylo provedeno pomocí programu QC-Expert, v. 2.5 (TriloByte Pardubice). Z každé odrůdy bylo analyzováno 30 až 70 nezávislých vzorků. Nejméně vzorků (20) bylo k dispozici u odrůdy Saaz Special. V jednotlivých souborech odrůdových vzorků byly stanoveny střední hodnoty (aritmetický průměr, medián). Typické intervaly obsahu xanthohumolu, DMX a alfa-hořkých kyselin pro každou odrůdu byly stanoveny jako minimální a maximální hodnoty v podsouborech, ve kterých bylo 10 % vzorků s nejnižším a nejvyšším obsahem příslušného analytu vyřazeno jako marginální hodnoty.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Průměrné obsahy a typické intervaly obsahu prenyflavonoidů xanthohumolu a DMX v českých odrůdách chmele jsou uvedeny v *tab. 1*. Obsahy xanthohumolu se pohybují v intervalu 0,26 (ŽPČ)-0,99 (Agnus) % hm. v pův. a obsahy desmethylxanthohumolu v rozmezí 0,04 (Bor) – 0,37 (Vital) % hm. Tyto intervaly jsou v dobré shodě s údaji, které uvádí Atlas českých odrůd chmele (Chmelařský institut Žatec, 2012). Množství xanthohumolu se nachází v intervalu srovnatelném s jinými světovými odrůdami chmele (Biendl, 2003; De Keukeleire, 2003): Nejvíce xanthohumolu z českých chmelů obsahují odrůdy Agnus (0,77–0,99 % hm.) a Vital (0,59–0,82 % hm.). DMX se v českých chmelech nachází v mnohem menším množství, většinou do 0,20 % hm. v pův. Výjimkou je odrůda Vital, která ho obsahuje přibližně dvojnásobek (0,22–0,37 % hm). Nadprůměrné obsahy prenyflavonoidů v odrůdě Vital ji předurčují jako perspektivní surovinu pro využití i mimo pivovarský průmysl (potravní doplňky, farmacie). Uvedené obsahy se vztahují na suchý chmel, sušený ve stávajících provozních sušárnách za podmínek, při kterých dochází ke značným ztrátám desmethylxanthohumolu (viz dále). Porovnatelné údaje o obsahu DMX se v literatuře objevují sporadicky, zřejmě z důvodu jeho nestability a obtížnou dostupností analytického standardu. De Keukeleire (2003; 2007), který zkoumal obsahy hořkých kyselin a prenylflavonoidů v pěti anglických odrůdách pěstovaných v Belgii, uvádí obsahy DMX ve zralých hlávkách v rozmezí 0,09–0,39 % hm. Horní hranice byla naměřena u odrůdy Wye Challenger, obsahy DMX v ostatních nepřesáhly hranici 0,20 % hm. Podstatné je, že se jedná o obsahy v nativním stavu, neboť vzorky byly k analýze připraveny lyofilizací.

V *tab. 2* jsou shrnuty průměrné obsahy alfa-hořkých kyselin, xanthohumolu a DMX v odrůdě Sládek v žatecké oblasti v období 2004–2014. *Tab. 3* uvádí obsahy stejných látek v odrůdě Premiant v jednotlivých chmelařských oblastech ČR v letech 2010 až 2014. Z dat je zřejmé, že obsahy prenylflavonoidů meziročně kolísají a přibližně kopírují výkyvy v obsahu alfa-hořkých kyselin. Poměrně značné rozdíly v obsahu sledovaných látek existují v daném ročníku i mezi jednotlivými chmelařskými oblastmi ČR. Tyto meziroční a regionální rozdíly jsou zcela běžné a jsou z velké části determinovány povětrnostními podmínkami v průběhu vegetační sezóny. Pozitivní korelace mezi obsahem alfa-hořkých kyselin a xanthohumolu byla prokázána pro konkrétní ročník

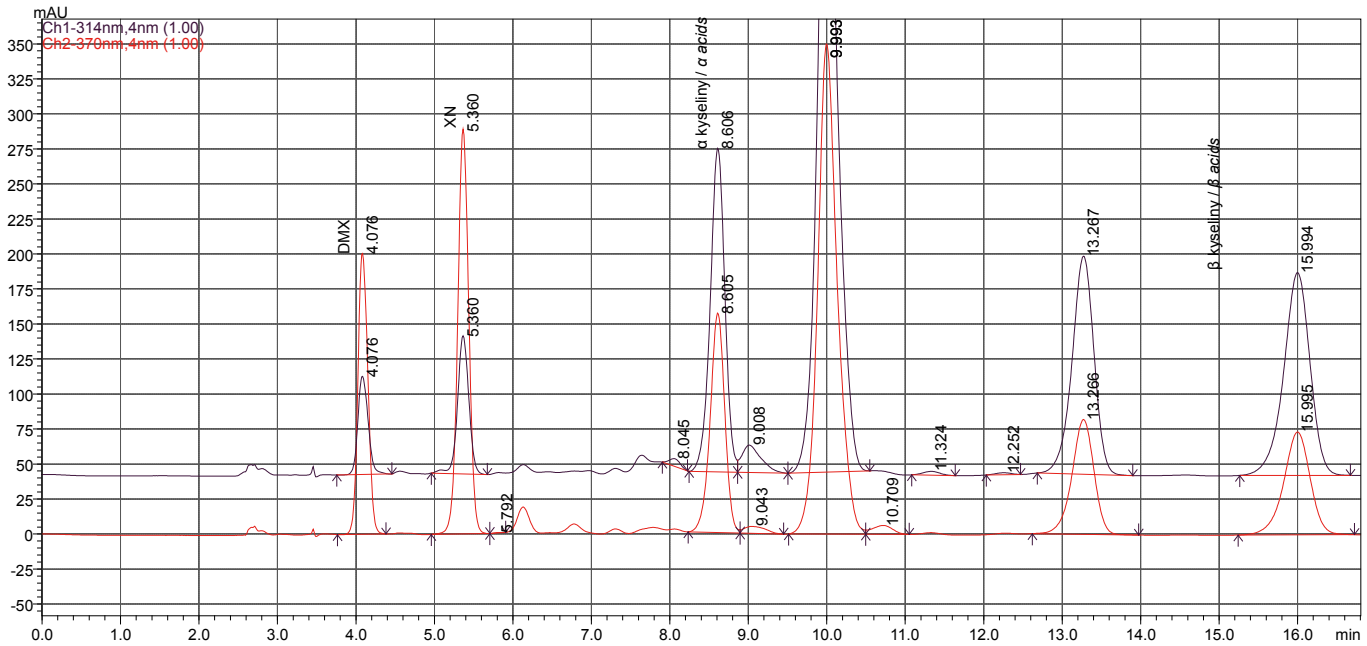
other samples were kept in an air-conditioned storage room at temperatures up to 5°C.

The Vital variety from three growing periods from 2010 to 2012 was used for the study concerning the stability of the hop prenylflavonoids during the harvest and following treatments. This variety was chosen due to its relatively high content of both prenylflavonoids, namely 0.70 to 0.90% for XN and 0.20 to 0.40% for DMX, measured in cones dried immediately after the harvest.

The same variety was used for the stability testing of XN and DMX during the course of 12-month long storage time during the period from 2011 to 2012. For these trials, the hop pellets were wrapped in bags made from multiple layers of aluminium foil and the content was then evacuated. The bags with the pellets were stored either in a dark air-conditioned room at a temperature between 2 and 3 °C or in an unconditioned room at 20 °C. A part of the hop pellets was stored, open to air at room temperature in the dark. These conditions are supposed to simulate the rupture of a bag and exposure of the contents to external influences. Samples were taken after 2, 4, 6 8 10 and 12 months of storage. The samples for analysis were always taken from a new intact bag. The analyses of the prenylflavonoids, α-bitter acids, β-bitter acids and the determination of Hop Storage Index (HSI) were all indicators of the aging process in hops. The analyses were done by using methods from The American Society of Brewing Chemists (ASBC) (Analytica ASBC, 1992). The HSI's were measured using a UV-VIS spectrophotometer Shimadzu 1601. The content and the composition of hop resins and prenylflavonoids were determined simultaneously using the modified method EBC 7.7 (Analytica EBC, 1998). The analyses were performed on a HPLC SHIMADZU LC 10A and LC 20A. The separation of the analytes was done using a column Nucleosil 250 x 4 mm, 5 mm, RP C18 (Macherey Nagel, D). The mobile phase was a mixture of methanol, water and phosphoric acid with the ratio of 850 : 150 : 5 % vol. For the following detection a diode array-detector (DAD) at a wavelength of λ = 314 nm for the α- and β-bitter acids and a wavelength of λ = 370 nm for XN and DMX was used. The identification of the prenylflavonoids was verified by comparison of the retention times with those of standard compounds and by comparison of the UV spectra. The quantification of XN and DMX was done using an external standard calibration method. The XN standard was purchased from the company Hopsteiner (Mainburg, D) and the DMX standard was obtained as a gift from the University Gent in Belgium. Figure 2 shows a chromatogram of XN, DMX and the α- and β-bitter acids. The statistical evaluation of the analytical results was done using the program QC-Expert, version 2.5 (TriloByte Pardubice, CZ). About 30–70 samples from each variety were analysed but only 20 samples were available from the Saaz Special variety. The results were expressed as arithmetic means and medians for each variety. Typical intervals for the XN, DMX, and α- and β-bitter acids contents for each variety were determined as minimum and maximum values in subgroups in which 10 % of samples with highest and lowest contents were rejected as marginal values.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The average values and the typical intervals for the contents of the prenylflavonoids, XN and DMX in the Czech hop varieties are shown in *Table 1*. The XN contents ranged from 0.26% for the Saaz variety to 0.99% for the Agnus variety. The contents of DMX varied from 0.04% for the Bor variety to 0.37% for the Vital variety. These values agree very well with the data in The Atlas of Czech Hop Varieties (Chmelařský institut Žatec, 2012). The amount of XN is comparable with other hop varieties used worldwide (Biendl, 2003; De Keukeleire, 2003). The Czech hop varieties with highest contents of XN are the Agnus variety with 0.77 to 0.99% and the Vital variety with 0.59 to 0.82%. The amount of DMX in Czech hops, mostly up to 0.20% is significantly lower when compared with other hops. The Vital variety containing 0.22 to 0.37% DMX, which is about twice as much, is an exception. The above standard contents of prenylflavonoids predispose the Vital variety also for use as a promising raw material outside the brewing industry, for example as food supplement or for the pharmaceutical industry. The contents given apply to hops dried under normal production conditions. The loss of DMX under these conditions is substantial (see below). Comparable data concerning DMX contents are very rare in the scientific papers, probably due to its instability and difficulties in obtaining the standard. According to De Keukeleire (2003, 2007), who studied the contents of bitter acids and prenylflavonoids in five English varieties grown in Belgium, the



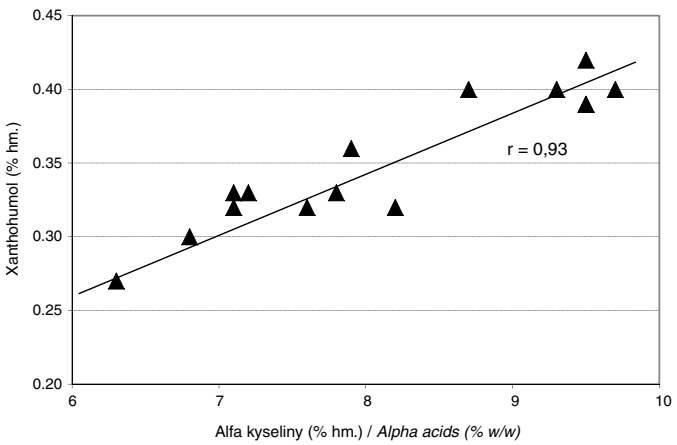
Obr. 2 Chromatografický záznam simultánního stanovení xanthohumolu, DMX, alfa- a beta-hořkých kyselin / *Fig. 2 Chromatographic record of simultaneous determination of xanthohumol, DMX, alpha- and beta- bitter acids*

Tab. 4 Výsledky dlouhodobého testu stárnutí odrůdy Vital – granulovaný chmel, sklizeň 2011 / *Table 4 Results of long-term aging tests for the Vital variety – hop pellets, harvested in 2011*

Vícevrstvá fólie, vakuum, klimatizovaný sklad (2 °C) / *Multiple-layer foil – vacuum – air-conditioned stock –2°C*							
Analytický parametr / *Analytical parameter*	**Termíny průběžných analýz skladovaného chmele / *Dates of the ongoing analysis of the stored hops***						
	7. 12. 2011	**10. 2. 2012**	**10. 4. 2012**	**14. 6. 2012**	**15. 8. 2012**	**15. 10. 2012**	**10. 12. 2012**
HSI	0.413	0.453	0.444	0.422	0.424	0.426	0.476
α-hořké kyseliny* / *α-bitter acids*	9.30	9.01	8.91	8.93	8.85	8.90	8.82
β-hořké kyseliny* / *β-bitter acids*	6.03	5.88	5.94	5.98	5.87	5.98	5.94
xanthohumol*	0.66	0.65	0.63	0.64	0.63	0.62	0.63
DMX*	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12
*** % hm. v pův.**							
Vícevrstvá fólie, vakuum, laboratorní teplota (20 °C) / *Multiple-layer foil – vacuum – room temperature 20°C*							
Analytický parametr / *Analytical parameter*	**Termíny průběžných analýz skladovaného chmele chmele / *Dates of the ongoing analysis of the stored hops***						
	7. 12. 2011	**10. 2. 2012**	**10. 4. 2012**	**14. 6. 2012**	**15. 8. 2012**	**15. 10. 2012**	**10. 12. 2012**
HSI	0.413	0.444	0.415	0.484	0.564	0.573	0.619
α-hořké kyseliny* / *α-bitter acids*	9.30	8.69	8.57	8.03	6.96	7.01	6.57
β-hořké kyseliny* / *β-bitter acids*	6.03	5.87	5.64	6.16	5.86	6.13	5.86
xanthohumol*	0.66	0.63	0.63	0.62	0.61	0.61	0.59
DMX*	0.12	0.10	0.08	0.07	0.05	0.05	0.04
*** % hm. v pův.**							
Granule volně na vzduchu, bez přístupu světla, laboratorní teplota (20 °C) / *Pellets free on air, without access of light (20 °C)*							
Analytický parametr / *Analytical parameter*	**Termíny průběžných analýz skladovaného chmele / *Dates of the ongoing analysis of the stored hops***						
	7. 12. 2011	**10. 2. 2012**	**10. 4. 2012**	**14. 6. 2012**	**15. 8. 2012**	**15. 10. 2012**	**10. 12. 2012**
HSI	0.413	0.812	1.585	2.185	2.338	2.289	2.45
α-hořké kyseliny* / *α-bitter acids*	9.30	5.72	1.87	0.51	0.24	0.24	0.14
β-hořké kyseliny* / *β-bitter acids*	6.03	3.69	1.13	0.42	0.25	0.30	0.22
xanthohumol*	0.66	0.56	0.39	0.29	0.24	0.23	0.23
DMX*	0.12	0.09	0.06	0.05	0.04	-	-
*** % hm. v pův.**							

a odrůdu (Krofta, 2003). Na základě údajů v *tab. 3* je možno obecně prohlásit, že pro určitou odrůdu existuje přímá úměra mezi obsahem alfa-hořkých kyselin a obsahem xanthohumolu, protože hodnota korelačního koeficientu zmíněných parametrů v odrůdě Premiant, pěstované ve třech chmelařských oblastech ČR v období 2010 až 2014, je 0,93, což postačuje pro potvrzení korelace na hladině významnosti 99 %. Obsahy prenylflavonoidů a poměr xanthohumol/alfa-hořké kyseliny lze využít pro typizaci českých odrůd jako chemotaxonomické parametry, které společně s dalšími mohou přispět k identifikaci odrůdy. Odrůda Vital se vyznačuje mimořádně vysokým obsahem desmethylxanthohumolu a současně nadprůměrným obsahem xanthohumolu. Vysoký obsah xanthohumolu je typický pro odrůdu Agnus a je srovnatelný s odrůdami Taurus (SRN), Admiral, Target (Anglie) (Biendl, 2003). Vysoký poměr xanthohumolu a alfa-hořkých kyselin v rozmezí (9–11).10^{-2} je typický pro odrůdy Bohemie a Sládek.

Změny obsahu prenylflavonoidů v průběhu dozrávání, sklizně, sušení, granulace a extrakce byly v letech 2010 až 2012 monitorovány na vzorcích odrůdy Vital. Na *obr. 4* a *5* jsou ve sloupcových diagramech uvedeny obsahy XN a DMX v čerstvých, nesušených hlávkách při sklizni, dále v suchých hlávkách po usušení na stávajících provozních sušárnách, ve chmelových granulích T90 a ve zbytkovém materiálu po extrakci chmele nadkritickým oxidem uhličitým. Z grafů je patrné, že xanthohumol je látka velmi stabilní a jeho množství se v průběhu zpracování na chmelové výrobky významně nemění. Naproti tomu DMX je látka tepelně velmi labilní a jeho množství ve chmelu má v celém zpracovatelském řetězci klesající tendenci. Monitoring obsahu DMX v čerstvých hlávkách při sklizni ukázal, že obsah tohoto prenylflavonoidu je velmi vysoký, srovnatelný s obsahem XN, a dosahuje úrovně 0,50–0,70 % hm. v suš. K významnému poklesu obsahu DMX o přibližně 50 % rel. dochází již při sušení na stávajících pásových i komorových sušárnách, kde je chmel vystaven teplotám v rozmezí 55–60 °C po dobu 6–8 hodin. K dalšímu poklesu obsahu DMX dochází při granulaci a extrakci oxidem uhličitým. S ohledem na využití chmelových prenylflavonoidů je CO_2-extrakce jedním z vhodných způsobů zpracování, protože při ní dochází k separaci pryskyřic do extraktu a prenylfalvonoidy zůstávají ve zbytkovém chmelu po extrakci. Vedlejší produkt po extrakci se tak stává potencionálně cennou druhotnou surovinou. Celkové ztráty DMX v řetězci čerstvé hlávky-sušení-granulace-extrakce dosahují až 70 % rel. původního obsahu. I přes velké ztráty se množství DMX po usušení odrůdy Vital pohybuje v rozmezí 0,25–0,40 % hm. v suš., ve zbytkovém chmelu po extrakci pak v rozmezí 0,15–0,20 % hm. Ztráty xanthohumolu jsou naproti tomu zanedbatelné. Jasně se ukazuje, že pro zachování obsahu některých látek obsažených ve chmelu jsou podmínky sušení na stávajících technologických zařízeních nepříznivé. Kromě DMX to bezpochyby platí i pro chmelové silice. Okamžitým opatřením umožňujícím zachování tepelně labilních látek chmele je uskladnění sušeného chmele a chmelových výrobků v klimatizovaných skladech při teplotách do +5 °C. Koncepčním řešením je vhodná rekonstrukce stávajících sušících kapacit a vypracování nové technologie „nízkoteplotního“ sušení chmele, která by se mohla využít při sušení chmelů typu Vital nebo speciálních aromatických odrůd z kategorie „flavour hops“. Tepelná labilita desmethylxanthohumolu může být také využita jako indikator šetrnosti sušícího procesu chmele.



Obr. 3 Korelace mezi obsahem alfa-hořkých kyselin a xanthohumolu v odrůdě Premiant ve chmelařských oblastech ČR v období 2010–2014 / *Fig. 3 Correlation between contents of alpha-bitter acids and xanthohumol in Premiant variety grown in three Czech Republic regions, from 2010 to 2014*

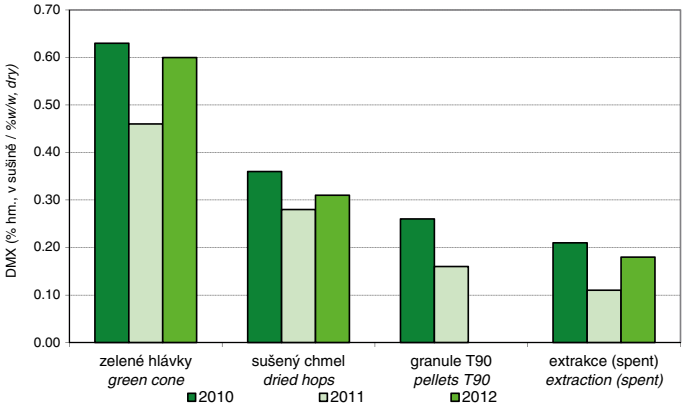
contents of DMX in ripe hop cones ranged from 0.09 to 0.39%. The highest content was measured in the Wye Challenger variety. The contents in the other varieties did not exceed 0.20%. One significant fact here is that the samples were prepared by lyophilization (freeze-drying) and therefore the hop cones were almost in their native condition.

The contents of the α-bitter acids, XN, and DMX in the Sladek variety grown in the Saaz hop region from 2004 to 2014 are summarized in the *Table 2*. *Table 3* presents the contents of the same substances in the Premiant variety grown in Czech hop regions from 2010 to 2014. The contents of the prenylflavonoids varied each year roughly to the same extent as the contents of the α-bitter acids. The contents of the compounds analysed from hops harvested in the same year but grown in different Czech hop regions also differed considerably. These year-to-year and regional differences are entirely normal. They are determined by weather conditions during the growing period. A positive correlation between the contents of the α-bitter acids and XN was proven for a particular variety from a particular year (Krofta, 2003). According to the data summarized in *Table 3*, the value of the correlation coefficient for the Premiant variety grown in three Czech hop regions during the period from 2010 to 2014 was 0.93. Therefore, it is possible to establish a general hypothesis regarding a direct correlation between the contents of the α-bitter acids and XN at a 99% confidence level. The content of prenylflavonoids and the ratio of XN / α-bitter acids are applicable as chemotaxonomic parameters for the classification of Czech hop varieties. Together with other parameters, they can contribute to the identification of a particular variety. The Vital variety is characterized by a particularly high content of DMX together with an above normal content of XH. High contents of XN are typical for the Agnus variety. It is comparable with the German Tarus variety and English Admiral and Target varieties (Biendl, 2003). A high ratio of XN / α-bitter acids of 0.09 to 0.11 is typical for the Bohemia and Sladek varieties.

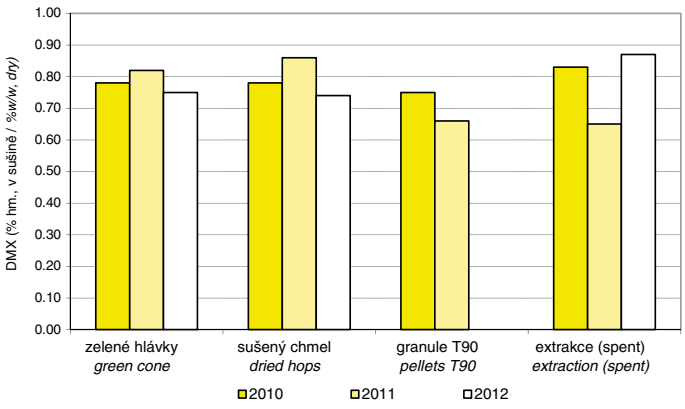
Changes in the contents of prenylflavonoids during ripening, harvest, granulation and extraction were followed using samples of the Vital variety from the years 2010 to 2012. *Figures 4* and *5* represent, in the bar charts the contents of XN and DMX in freshly harvested cones, in cones dried under normal production conditions, in T90 hop pellets and in spent hops after hop extraction by supercritical carbon dioxide. According to the diagrams, XN is a rather stabile compound and its content did not change significantly during the processing. On the contrary, DMX is a very thermo labile compound and its content in the hops decreases continually during the production process. Monitoring of the DMX contents in the freshly harvested cones showed that the amount of this prenylflavonoid was very high. It reached up to 0.50 to 0.70% in dry matter, which was comparable with the contents of XN. A significant drop of about 50 % rel. in the DMX contents already happens during drying in commonly used band ovens or in hop drying cabinets since the temperature varies between 55 and 60 °C during the drying period of 6 to 8 hours. The next reduction in the DMX content follows during pelletizing and carbon dioxide extraction.

The recommended method regarding an optimal utilization of hop prenylflavonoids is extraction with CO_2. During this process, the hop resins separate into the extract and the prenylflavonoids remain in the spent hops. Therefore, the spent hops as a by-product after the extraction, turns out to be a potentially valuable raw product. The total reduction in the DMX content during the processing chain – fresh cones – drying – pelletizing – CO_2-extraction – can reach up to 70% rel. Despite the substantial losses, DMX contents in dry cones of the Vital variety range from 0.25 to 0.40% in dry matter and after hop extraction, the contents of DMX in the spent hops varied from 0.15 to 0.20%. On the contrary, the losses of XN are negligible. The conclusion is that the conditions for hop drying using current technological equipment are unfavourable for the preservation of sensitive compounds such as DMX or hop oils. An immediate mearure for the preservation of the thermo labile compounds in hops would be storage in air-conditioned stores at a temperature of up to 5 °C. A conceptual solution would be a suitable reconstruction of the current hop kilns and the development of new technologies for low-temperature hop drying. These could be used for drying the Vital hop variety or for specific aromatic varieties from the category ‘flavour hops’. The thermolability of DMX could be also utilized as a “gentleness” indicator of the drying process.

The content of prenylflavonoids in hops is also negatively affected by inappropriate conditions during long-term storage. An aging test was carried out with pellets of the Vital hop variety from the years 2011 and 2012. The results summarized in *Table 4* show that the ag-



Obr. 4 Obsah DMX v odrůdě Vital v průběhu posklizňové úpravy v řetězci „zelené hlávky-sušení-granulace-spent/CO_2 extrakce“ po sklizni v letech 2010–2012 / *Fig. 4 DMX content in Vital variety during aftercrop modification in chain “green cone – drying – pelletization – spend/CO_2 extraction” after crops 2010 to 2012*



Obr. 5 Obsah XN v odrůdě Vital v průběhu posklizňové úpravy v řetězci „zelené hlávky-sušení-granulace-spent/CO_2 extrakce“ po sklizni v letech 2010–2012 / *Fig. 5 XN content in Vital variety during aftercrop modification in chain “green cone – drying – pelletization – spend/CO_2 extraction” after crops 2010 to 2012*

Obsah prenylflavonoidů ve chmelu negativně ovlivňují i nevhodné podmínky dlouhodobého skladování. Výsledky testů stárnutí vzorků odrůdy Vital v granulované formě z období 2011/2012 jsou shrnuty v *tabulce 4*. Data jasně ukazují, že nejrychleji stárne granulovaný chmel, skladovaný volně na vzduchu při normální teplotě. Příčinou je narušení struktury lupulinových zrn, ke kterému dochází již při sušení, ale největší mechanickou zátěž představují pro chmel mletí a granulace. Chmelové pryskyřice, prenylflavonoidy i silice v deformovaných a potrhaných lupulinových zrnech rychle podléhají degradačnímu působení kyslíku a zvýšené teploty. Obsah DMX ve volně skladovaných granulích poklesne po několika měsících na neměřitelné hodnoty. Dynamika stárnutí granulovaných chmelů skladovaných bez přístupu vzduchu je podle očekávání podstatně pomalejší.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla finančně podpořena projektem Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QI111B053 „*Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli*“ při Ministerstvu zemědělství ČR.

ing process is quickest in hop pellets stored under open air at room temperature. The reason for this is damage to the lupulin glands, which already happens during drying. Hop resins, prenylflavonoids and hop oils from damaged lupulin glands quickly become subjects of the degradation effects of oxygen and higher temperatures. Nevertheless, the biggest mechanical stresses are from milling and pelletizing. The contents of DMX in pellets stored under open air drop to undetectable values after few months. The aging of hop pellets stored without the access to air is, as expected, much slower.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was financially supported by The National Agency for Agricultural Research of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic as a Project No. QI111B053 “*New Approaches for the Utilisation of Agricultural Raw Materials and for the Production of Main Food Types with Increased Quality, Safety, Competitiveness and Nutritional Benefit for the Consumer*”.

LITERATURA / *REFERENCES*

Analytica EBC, 1998: 5th edition, European Brewery Convention, Carl-Hans Verlag, Nürnberg.

Atlas českých odrůd chmele, 2012: Chmelařský institut, Žatec, ISBN 978-80-87357-11-8.

Basařová, G., 1994: Pivovarsko sladařská analytika, Merkanta, Praha.

Biendl, M., 2003: Research on the xanthohumol content in hops. HopfenRundschau Int. 2002/2003: 72–75.

De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., De Keukeleire, D., 2003: Formation and Accumulation of a-Acids, b-acids, Desmethylxanthohumol and Xanthohumol during Flowering of Hops (*Humulus lupulus* L). J. Agric. Food Chem. 51: 4436–4441.

De Keukeleire, J., Janssens, I., Heyerick, A., Ghekiere, G., Cambie, J., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., De Keukeleire, D., 2007: Relevance of Organic Farming and Effect of Climatological Conditions on the Formation of α-Acids, β-Acids, Desmethylxanthohumol and Xanthohumol in Hop (*Humulus lupulus* L). J. Agric. Food Chem. 55: 61–66.

Gernhauser, C., Alt, A. P., Klimo, K., Knauft, J., Frank, J., Becker, H., 2002: Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolics compounds of beer. Phytochem. Rev. 1: 369–377.

Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R., 2000: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L). Xenobiotica 30: 235–251.

Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., Dostálek, P., 2012: Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. Chem. Listy 106(12): 1095–1103.

Krofta, K., 2003: Obsah xanthohumolu v českých chmelech. Kvasny Prum. 49: 62–69.

Krofta, K., 2010: Obsah prenylovaných flanonoidů chmele v českých a zahraničních pivech. Kvasny Prum. 56: 2–9.

Methods of Analysis of the ASBC, 8th Revised Edition, St. Paul, Minnesota, 1992, Method Hops-6.

Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., De Cooman, A., De Keukeleire, D., 1999: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84: 2249–2252.

Miranda, C. L., Stevens, J. F., Helmrich, A., Henderson, M. C., Rodriguez, R. J., Yang, Y. H., Deinzer, M. L., Barnes, D. W., 1999: Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) in human cancer lines. Food Chem. Toxicol. 37: 271–285.

Miranda, C. L., Aponso, G. L. M., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R., 2000: Prenylated chalkones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. Cancer Lett. 149: 21–29.

Tabata, N., Ito, M., Tomoda, H., Omura, S., 1997: Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from Humulus lupulus. Phytochemistry 46(4): 683–687.

Tobe, H., Muraki, Y., Kitamura, K., Komiyama, O., Sato, Y., Sugioka, T., Maruyama, H. B., Matsuda, E., Nagai, M., 1997: Bone Resorption Inhibitors from Hop Extract. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 158–159.

Do redakce došlo / Manuscript received: 20. 11. 2014
Přijato k publikování / Accepted for publication: 15. 1. 2015