

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav biotechnologie

STANOVENÍ OBSAHU PRENYLFLAVONOIDŮ VE CHMELOVÉM MATERIÁLU

Certifikovaná metodika

Tereza Hudcová, Hana Skoupá, Lukáš Jelínek, Marcel Karabín, Pavel Dostálek

Zástupce autorského týmu: Prof.Ing. Pavel Dostálek, CSc.

Praha 2014

Vznik metodiky byl podpořen TA ČR - Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků - TE02000177.

Recenzenti:

Oponentní posudek odborníka v daném oboru zpracoval:

RNDr. Jana Olšovská, PhD. – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Lípová
15, 120 44 Praha 2

Oponentní posudek ze státní správy zpracoval:

Ing. Olga Rozsypalová - Inspektorát SZPI, Za opravnou 300/6, 150 00 Praha 5

Uživatel metodiky:

Chmelařský institut s.r.o., Žatec, se kterým byla uzavřena smlouva o uplatnění
certifikované metodiky č. VŠCHT/2014-003-PRENYL

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014

ISBN 978-80-7080-912-9

OBSAH

Problematika	4
I.Cíl metodiky	5
II.Vlastní popis metodiky	5
1. Přístroje a zařízení	5
2. Chemikálie	6
3. Analyzovaný materiál	7
4. Postup přípravy vzorku	7
5. Příprav směsných roztoků prenylflavonoidů pro kalibraci	7
6. Podmínky HPLC analýzy	11
7. Opakovatelnost	11
8. Mez detekce a stanovitelnosti	13
9. Výpočet koncentrací prenylflavonoidů z naměřených hodnot.....	14
10. Vzorové chromatogramy	15
III. Srovnání novosti postupu	16
IV. Popis uplatněné metodiky	17
V. Ekonomické aspekty metodiky	17
VI. Seznam použité související literatury	17
VII. Seznam publikací, které předcházeli metodice	18
DEDIKACE	18

Problematika

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, a to především v souvislosti se svými prokázanými biologickými účinky [1 - 3].

Značná pozornost je v současné době věnována především prenylovanému chalkonu xanthohumolu, který má prokazatelné antikarcinogenní, protizánětlivé, antimikrobiální a antivirové účinky. Xanthohumol účinně inhibuje proliferaci nádorových buněk a zabraňuje tak růstu karcinomu a vzniku metastáz. Dalším významným účinkem prenylflavonoidů, zejména pak 8-prenylnaringenin, je jejich estrogení aktivita, díky které jsou schopny alternovat lidské steroidní hormony - estrogeny, a potlačovat tak klimakteriální symptomy či snižovat riziko vzniku nádorových onemocnění spojených s hormonálním systémem [4].

Díky potenciálnímu využití chmelových prenylflavonoidů v potravinářském a farmaceutickém průmyslu je nyní tlak na zdokonalení metod pro kvantifikaci těchto biologicky aktivních látek.

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je stanovení prenylovaných flavonoidů v chmelových materiálech. K tomuto účelu byla vyvinuta spolehlivá analytická metoda HPLC-PDA (vysokoučinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole) pro stanovení všech významných prenylovaných flavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) ve chmelových materiálech (chmel, chmelové výrobky, vedlejší produkty zpracování chmele, potravinové doplňky na bázi chmele). Proto tento účel byla modifikována a kombinována metoda pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chmelu [5] s chromatografickým stanovením podle Dhoooghe a kol. [6].

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Stanovené látky: xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin

Analytický postup

1. Přístroje a zařízení

- a. HPLC chromatograf 1100 Series (Agilent, USA)
- b. PDA detektor (Agilent, USA)
- c. Kolona ECLIPSE XDB-C18, 5 μm , 4,6 x 150 mm (Agilent, USA)
- d. Třepačka LT2 (Kavalier, ČSR)
- e. Vakuová odparka RWO6-ML (Ika Werke, SRN)
- f. Ultrazvuková lázeň (JP Selecta, Španělsko)
- g. Kalibrované laboratorní váhy, třída přesnosti I (Kern, SRN)

- h. Přístroj pro přípravu ultračisté vody MILLI Q RG (Millipore, USA)
- i. Teflonové filtry (PTFE, velikost pórů 0,2 μm) (Whatman, SRN)
- j. Erlenmayerova baňka 100 ml
- k. Srdcová baňka 100 ml
- l. Pipety (1000 μl , 10 ml)

2. Chemikálie

- a. Methanol, p. a. (Sigma-Aldrich, SRN)
- b. Diethylether, p. a. (Lach-ner, ČR)
- c. Kyselina chlorovodíková, p. a. (38%, Penta, ČR)
- d. Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, SRN)
- e. Kyselina mravenčí, p. a. (Penta, ČR)
- f. Demineralizovaná voda – MilliQ (Merck-Millipore, USA), vodivost menší než 0,5 μS
- g. Standard xanthohumolu (XH) (Hopsteiner, SRN)
- h. Standard isoxanthohumolu (IXH) (Toroma organics, SRN)
- i. Standard 8-prenylnaringenin (8-PN) (Toroma organics, SRN)

3. Analyzovaný materiál

K analýze prenylovaných látek byl použit zbytkový materiál získaný extrakcí chmelových hlávek české vysokoobsažné chmelové odrůdy Vital superkritickým oxidem uhličitým. Tato odrůda byla vyšlechtěna s ohledem na její využití ve farmaceutickém průmyslu, je totiž 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 [7].

4. Postup přípravy vzorku

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

Připravené vzorky jsou analyzovány technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

5. Příprava směsných roztoků prenylflavonoidů pro kalibraci

Ze standardů prenylflavonoidů jsou připraveny zásobní roztoky.

Zásobní roztok xanthohumolu (476 mg/l)

Je naváženo 11,9 mg xanthohumolu do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněno po značku methanolem.

Zásobní roztok isoxanthohumolu (50 mg/l)

Je naváženo 0,5 mg isoxanthohumolu do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno po značku methanolem.

Zásobní roztok 8-prenylnaringenu (80 mg/l)

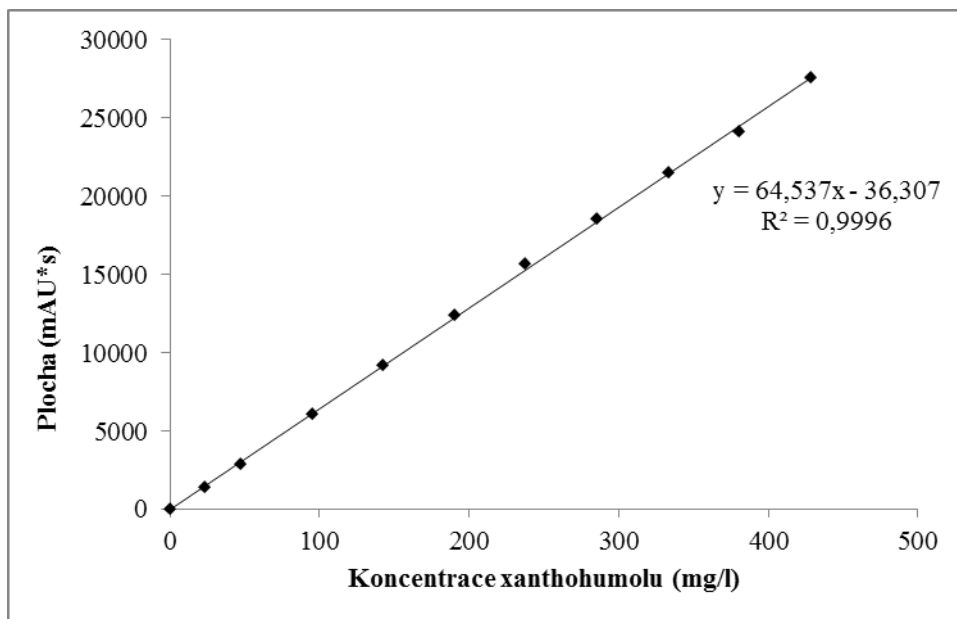
Je naváženo 0,8 mg isoxanthohumolu do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno po značku methanolem.

Ze zásobních roztoků jsou namíchány kalibrační roztoky o výsledných koncentracích jednotlivých prenylflavonoidů viz tabulka 1.

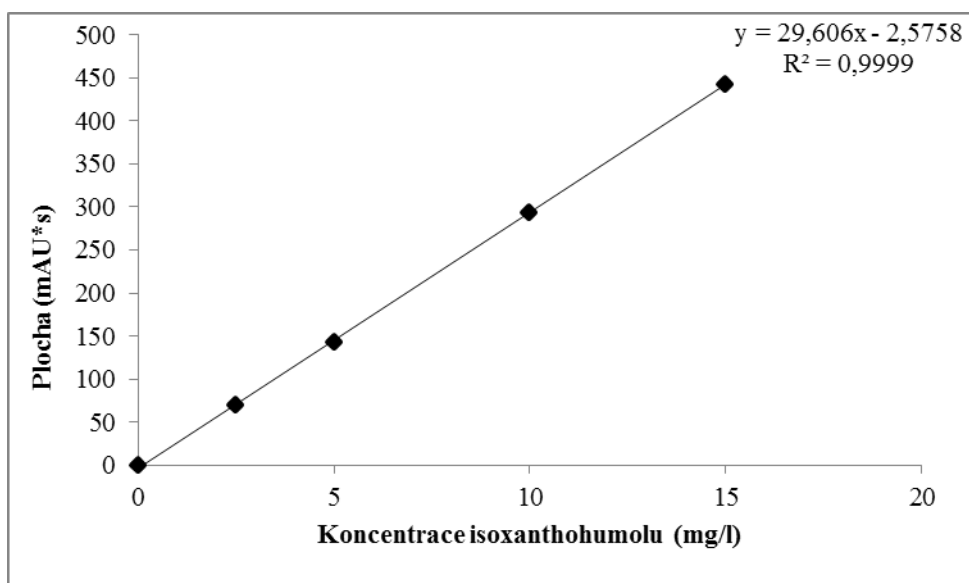
Tab. 1 Koncentrace jednotlivých prenylflavonoidů (mg/l) v kalibračních roztocích

Směsný roztok	Xanthohumol	Isoxanthohumol	8-prenylnaringenin
1	23,8	2,5	4
2	47,6	5	8
3	95,2	10	12
4	142,8	15	16
5	190,4	-	-
6	238	-	-
7	285,6	-	-
8	333,2	-	-
9	380,8	-	-
10	428,4	-	-

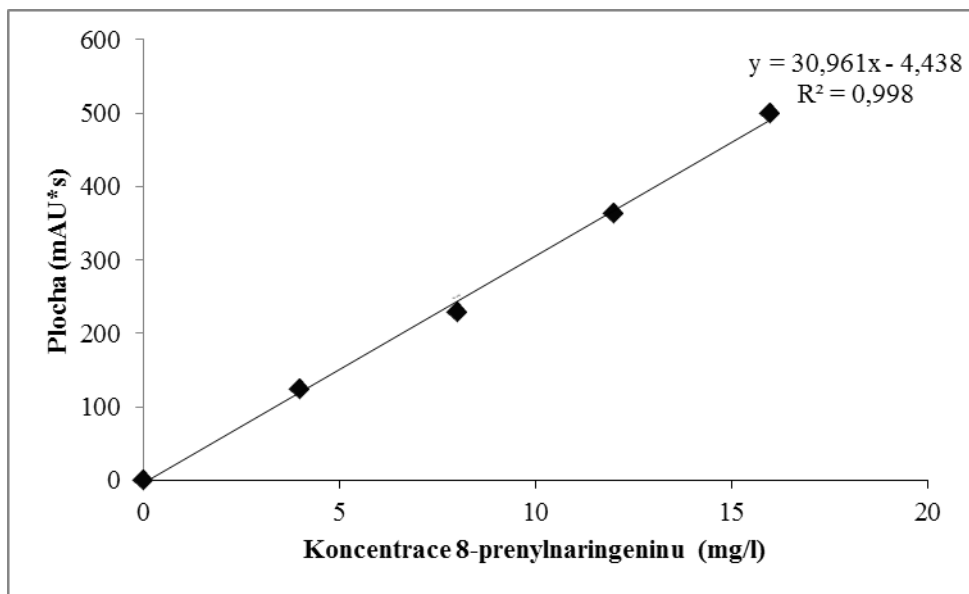
Ze směsných roztoků byly sestrojeny kalibrační křivky jednotlivých prenylflavonoidů (obr. 1-3).



Obr. 1 Kalibrační přímka xanthohumolu



Obr. 2 Kalibrační přímka isoxanthohumolu



Obr. 3 Kalibrační přímka 8-prenylnaringeninu

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 v případě xanthohumolu (což odpovídá 0-1001 mg/100 g vzorku) ($r = 0,9996$), 0-15 mg/l v případě isoxanthohumolu (0-36 mg/100 g) ($r = 0,9999$) a 0-16 mg/l (0-38 mg/100 g) ($r = 0,998$) v případě 8-prenylnaringeninu. Retenční časy jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 2. Ukázkové chromatogramy zbytku chmelového materiálu po extrakci oxidem uhličitým jsou na obr. 4 a 5. xanthohumol byl detekován a vyhodnocen při vlnové délce 370 nm (Obr. 4), isoxanthohumol a 8-prenylnaringenin při vlnové délce 290 nm (Obr. 5), což jsou vlnové délky blízké jejich absorpčním maximům.

Tab. 2 Retenční charakteristiky analyzovaných prenylflavonoidů

Látka	Retenční čas (min)
Xanthohumol	31,49
Isoxanthohumol	9,98
8-prenylnaringenin	18,24

6. Podmínky HPLC analýzy

Mobilní fáze:

A – odplyněná demineralizovaná voda s přidavkem 0,05 %hm. kyseliny mravenčí

B – odplyněný acetonitril s přidavkem 0,05 %hm. kyseliny mravenčí)

V tabulce 3 je průběh gradientu dvousložkové mobilní fáze.

Tab. 3 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

Stacionární fáze: reverzní fáze C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm

Teplota: 30 °C

Průtok: 0,8 ml/min

Detektor: PDA (Xanthohumol byl detekován při vlnové délce 370 nm, absorbance isoxanthohumolu a 8-prenylnaringenu při vlnové délce 290 nm).

Objem nástřiku: 10 μ l

7. Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla zjištěna opakovanou přípravou vzorku a analýzou deseti vzorků stejného chmelového materiálu. Míra proměnlivosti výsledků stanovení koncentrace prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin) je vyjádřena relativní

směrodatnou odchylkou. Opakovatelnost metody je nepřímo úměrná výši relativní směrodatné odchylky:

Aritmetický průměr:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

n počet opakování

x_i hodnota i -tého vzorku

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Relativní směrodatná odchylka:

$$RSD (\%rel.) = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$$

Průměrná koncentrace xanthohumolu, isoxanthohumolu a 8-prenylnaringeninů ve chmelovém materiálu, směrodatná odchylka a opakovatelnost v %rel. jsou znázorněny v tabulce 4.

Tab. 4 Opakovatelnost 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

8. Mez detekce a stanovitelnosti

Mez detekce (*LOD* – limit of detection) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. **Mez stanovitelnosti** (*LOQ* – limit of quantification) odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Meze detekce a meze stanovitelnosti jsou uvedené v tabulce 5-6.

Podle uzance se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek [šumu základní linie](#) a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie:

$$LOQ = \frac{10 * h}{a}$$

$$LOD = \frac{3 * h}{a}$$

h výška šumu

a směrnice kalibrační přímky

Tab.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti jednotlivých prenylflavonoidů v roztoku (mg/l)

Prenylflavonoid	LOD	LOQ
Xanthohumol	0,175	0,583
Isoxanthohumol	0,224	0,746
8-prenylnaringenin	0,297	0,990

Tab.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti jednotlivých prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100g)

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

9. Výpočet koncentrací prenylflavonoidů z naměřených hodnot

Koncentrace prenylflavonoidů v roztoku se vypočte dosazením do rovnice kalibrační přímky:

$$y = ax + c$$

$$C_v = \frac{A_{vz} - c}{a}$$

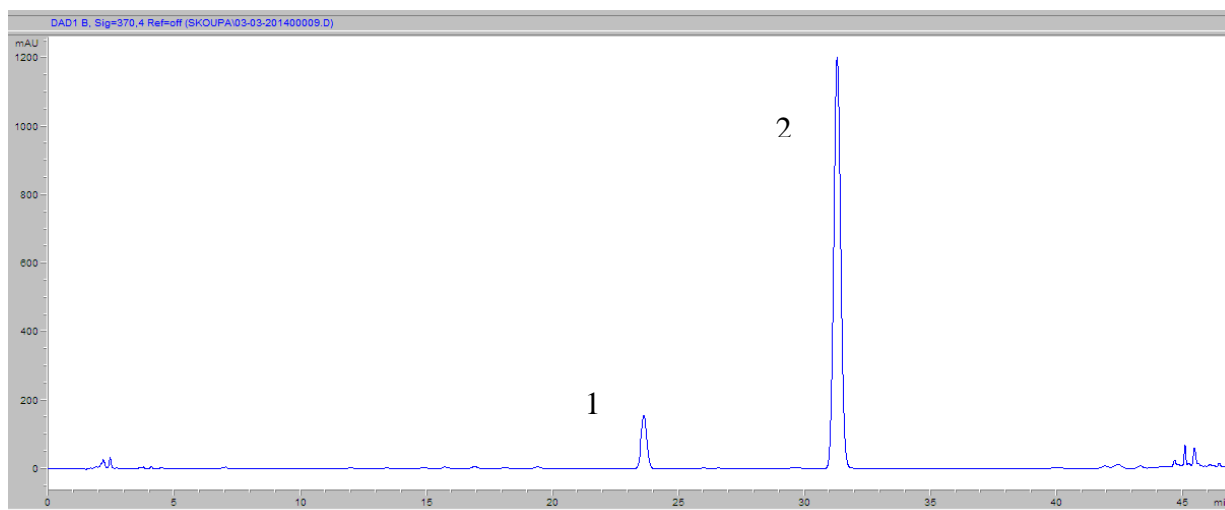
C_v koncentrace sloučeniny v roztoku (mg/l)
 A_{vz} plocha píku sloučeniny

Obsah prenylflavonoidů ve chmelovém materiálu (mg/100 g chmelového materiálu) se vypočte podle vzorce:

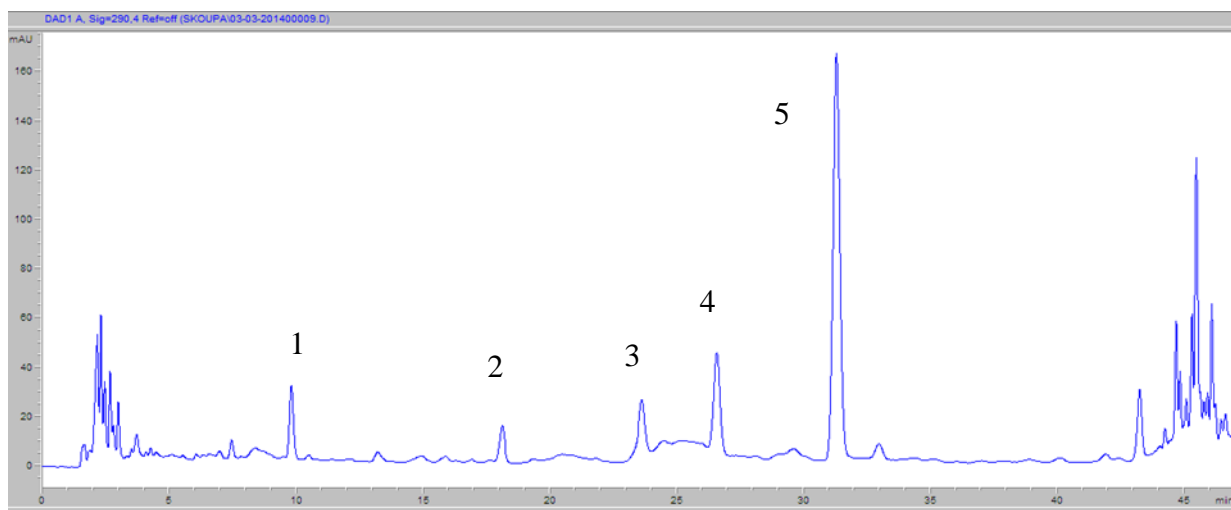
$$C_{vz} = \left(\frac{100}{m} * C_v * 0,005 * \frac{120}{25} \right) * 1000$$

C_{vz} koncentrace sloučeniny ve vzorku (mg/100 g chmelového materiálu)
 m navážka materiálu (g)

10. Vzorové chromatogramy



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



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

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Jako výchozí metoda byla zvolena běžně užívaná metoda pro stanovení alfa a beta hořkých kyselin ve chmelu, 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 gramů na 1 gram, a v důsledku toho bylo nezbytně nutné zakoncentrovat vzorek v konečném kroku přípravy vzorku. Chromatografický krok byl založen na metodě publikované Dhooghe a kol. (2010). Z této metody bylo převzato složení mobilní fáze [6], ovšem délka analýzy byla prodloužena za účelem zmírnění gradientu vedoucího k lepšímu rozdělení píků 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, prozatím však z důvodu nedostupnosti čistých standardů nebyly tyto analyty zařazeny do kvantifikace při aplikaci použité metody. Nicméně výhodou této metody je to, že by umožňovala stanovit ve vzorku všechny prenylflavonoidy (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, desmethylxanthohumol a 6-prenylnaringenin) simultánně 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).

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je vhodná pro velké i malé laboratoře, průmyslové zkušební laboratoře a laboratoře státních kontrolních orgánů.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY METODIKY

Ekonomický přínos pro uživatele metodiky (Chmelařský institut, s.r.o. Žatec) je nesporný. Metodika poskytnutá VŠCHT Praha bude sloužit při rozbořech chmelových materiálů při řešení úkolů TA ČR - Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků - TE02000177. Laboratoře poskytovatele a uživatele metodiky jsou v úzké spolupráci a jsou jedinými referenčními laboratořemi pro řadu analytů ve chmelu. Aby bylo možno provádět mezilaboratorní porovnávací zkoušky, je nezbytné, aby tyto laboratoře používaly stejné metody.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. STEVENS J. F., PAGE J. E. (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65, 1317 – 1330.
2. GERHÄUSER C. (2005) Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 827 – 831.
3. MIRANDA C. L., STEVENS J. F., HELMRICH A., HENDERSON M. C., RODRIQUEZ R. J., YANG Y. H., DEINZER M. L., BARNES D. W., BUHLER D. R. (1999) Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 271 – 285.
4. KARABÍN, M., HUDCOVÁ, T., JELÍNEK, L., DOSTÁLEK, P. (2012) Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chemické listy*, 106, 1095 – 1103.

5. The American Society of Brewing Chemists: ASBC Methods of Analysis, Hops 14, α - and β -Acids in hops and hop extracts by HPLC (ASBC 2009).
6. DHOOGHE L., NAESSENS T., HEYERICK A., KEUKELEIRE D. D., VLIETNICK A. J., PIETERS L., APERS S. (2010) Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. *Talanta* 83, 448-456.
7. KROFTA K., PATZAK J., NESVADBA V., MIKYŠKA A., SLABÝ M., ČEJKA P. (2013) VITAL – česká hybridní odrůda chmele – část I. *Kvasný průmysl*, 59 (1), 2-13.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

1. DHOOGHE L., NAESSENS T., HEYERICK A., KEUKELEIRE D. D., VLIETNICK A. J., PIETERS L., APERS S. (2010) Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. *Talanta* 83, 448-456.
2. MAGALHAES P., GUIDO L. F., CRUZ J. M., BARROS A. A. (2007) Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1150,295-301.
3. The American Society of Brewing Chemists: ASBC Methods of Analysis, Hops 14, α - and β -Acids in hops and hop extracts by HPLC (ASBC 2009).
4. HUDCOVÁ T., SKOUPÁ H., JELÍNEK L., KARABÍN M., DOSTÁLEK P. (2014) Stanovení biologicky aktivních chmelových prenylflavonoidů metodou HPLC-PDA ve chmelovém materiálu. *Chemické listy* – v tisku

DEDIKACE

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

OPONENTI METODIKY:

Oponentní posudek odborníka v daném oboru zpracoval:

RNDr. Jana Olšovská, PhD. – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Lípová 15,
120 44 Praha 2

Oponentní posudek ze státní správy zpracoval:

Ing. Olga Rozsypalová - Inspektorát SZPI, Za opravnou 300/6, 150 00 Praha 5

Tereza Hudcová, Hana Skoupá, Lukáš Jelínek, Marcel Karabín, Pavel Dostálek

STANOVENÍ OBSAHU PRENYLFLAVONOIDŮ VE CHMELOVÉM MATERÁLU

Certifikovaná metodika

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Editoři: **Prof.Ing.Pavel Dostálek, CSc.**

Tisk: KANAG – TISK, s.r.o.
Technická 5, 166 28 Praha 6

Rok vydání: 2014

Počet stran: 19

Náklad: 20 ks