

## Simultánní stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů ve chmelu a pivu metodou HPLC-DAD: Studie aplikace homogenátu zeleného chmele v pivovarském procesu

### *Simultaneous Determination of Prenylflavonoids and Isoflavonoids in Hops and Beer by HPLC-DAD Method: Study of Green Hops Homogenate Application in the Brewing Process*

MARIE JURKOVÁ<sup>1</sup>, PAVEL ČEJKA<sup>1</sup>, MILAN HOUŠKA<sup>2</sup>, ALEXANDR MIKYŠKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting PLC, Brewing Institute Prague, Lípová 15, CZ – 120 44 Prague 2, Czech Republic*

<sup>2</sup> Výzkumný ústav potravinářský Praha / *Food Research Institute Prague – Rádiová 7, CZ – 102 31, Prague 10, Czech Republic*  
e-mail: jurkova@beerresearch.cz

**Jurková, M. – Čejka, P. – Houška, M. – Mikyška, A.: Simultánní stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů ve chmelu a pivu metodou HPLC-DAD: Studie aplikace homogenátu zeleného chmele v pivovarském procesu.** Kvasny Prum. 59, 2013, č. 2, s. 41–49.

Polyfenolové látky náležející do skupin prenylflavonoidů a isoflavonoidů mají účinky podporující zdraví a ochranu proti řadě civilizačních chorob. Působí jako antioxidanty, mají protirakovinné, antimikrobiální, protizánětlivé vlastnosti, některé jsou fytoestrogeny a působí proti osteoporóze. Byla vypracována nová analytická metoda HPLC-DAD pro simultánní stanovení prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin) a isoflavonoidů (daidzein, genistein, formononetin a Biochanin A) ve chmelu a pivu a byla provedena studie dopadu chmelení homogenátem zeleného chmele stabilizovaného vysokým tlakem na obsah těchto látek v pivu. Vypracovaná metoda může najít uplatnění při monitorování obsahu bioaktivních flavonoidů ve chmelových surovinách a pivu. Aplikace homogenátu zeleného chmele (20 % alfa kyselin na várku) v poslední dávce chmelení přinesla zvýšení obsahu xanthohumolu a 6-prenylnaringeninu v pivu o přibližně 50 % resp. 100 % v porovnání se sušeným chmelem. Aplikace do vířivé kádě zvýšila obsah xanthohumolu a 8-prenylnaringeninu v pivu o přibližně 55 % resp. 115 %. S výjimkou výrazného zvýšení hodnoty genisteinu aplikací do vířivé kádě nebyl zjištěn vliv nesusušeného chmele na obsah isoflavonoidů v pivu. Chmelení homogenátem zeleného chmele ukazuje zajímavou možnost přirozeného zvýšení obsahu xanthohumolu v pivu. Výsledky úvodní studie budou ověřeny v dalším výzkumu.

**Jurková, M. – Čejka, P. – Houška, M. – Mikyška, A.: Simultaneous determination of prenylflavonoids and isoflavonoids in hops and beer by HPLC-DAD method: Study of green hops homogenate application in the brewing process.** Kvasny Prum. 59, 2013, No. 2, p. 41–49.

Polyphenolic substances belonging to prenylflavonoids and isoflavonoids groups have health-promoting effects and protecting effects against many civilization diseases. They act as antioxidants, have anti-cancer, anti-microbial, anti-inflammatory effects, some of them are phytoestrogens and counteract osteoporosis. A novel analytical method HPLC-DAD for simultaneous determination prenylflavonoids (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin) and isoflavonoids (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) in hops and beer was developed, and a study on the impact of hopping by green hops homogenate stabilized high pressure on the content of these substances in beer was carried out. The elaborated method may find application in the monitoring of the bioactive flavonoids content in hop raw materials and beer. Application of green hops homogenate (20% alpha acids in batch) at the last dose of hopping results in increased contents of xanthohumol and 6-prenylnaringenin in beer by approx. 50% and 100% respectively compared with dried hops. Application into a whirlpool increased xanthohumol and 8-prenylnaringenin content in beer by approx. 55% and 115% respectively. With the exception of a significant increase in the value of genistein in whirlpool application, an influence of non-dried hops on the isoflavonoids content in beer was not found. Hopping by green hops homogenate shows an interesting possibility of natural increase in content of xanthohumol in beer. In further research the results of preliminary studies shall be verified.

**Jurková, M. – Čejka, P. – Houška, M. – Mikyška, A.: Durch die Methode HPLC-DAD eine Simultanbestimmung von Prenylflavonoiden und Isoflavonoiden, Studie der Grünhopfenhomogenatsapplikation im Brauprozess.** Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 2, S.41-49.

Die zur Gruppe Prenylflavonoide und Isoflavonoide gehörenden Polyphenolstoffe haben eine Gesundheitförende Wirkungen und Schutz gegen die Zivilisationskrankheiten. Die Polyphenolstoffe wirken als Antioxidante, wiesen eine Antikrebs-, Antimikrobielle- und Entzündungshemmendeigenschaften auf, einige davon sind Phytoestrogene und wirken gegen die Osteoporose. Eine neue analytische Methode HPLC – DAD für die simultane Bestimmung von Prenylflavonoiden (Xanthohumolon, Isoxanthohumol, 8-Prenylnaringenin, 6-Prenylnaringenin) und Isoflavonoide (Daidzein, Genistein, Formononetin und Biochanin A) im Hopfen und im Bier wurde erarbeitet und eine Studie der Hopfenzugabewirkung mit dem durch Hohe Druck stabilisierten Grünhopfenhomogenat auf den Gehalt an diese Stoffen im Bier. Die Zugabe des Grünhopfenhomogenats (20% Alpha – Säure im Sud) in der letzten Dosierung hat eine Gehaltserhöhung an Xanthohumolon und 6-Prenylnaringenin im Bier ungefähr um 50%, beziehungsweise um 100% im Vergleich mit dem getrockneten Hopfen verursacht. Die Dosierung in den Whirlpool hat den Gehalt an Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin im Bier etwa um 55 % respektive um 115 % erhöht. Mit einer Ausnahme der wesentlichen Erhöhung des Genisteinswertes durch die Applikation in den Whirlpool wurde kein Einfluss des getrockneten Hopfens auf den Gehalt an Isoflavonoide im Bier festgestellt. Die Hopfenzugabe durch Grünhopfenhomogenat zeigt eine interessante Möglichkeit der natürlichen Xanthohumolgehaltserhöhung im Bier an. Die Ergebnisse der Einleitungsstudie werden während der weiteren Forschung durchgeführt

**Klíčová slova:** isoflavonoidy, prenylflavonoidy, xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, HPLC-DAD, homogenát zeleného chmele, pivo

**Keywords:** isoflavonoids, prenylflavonoids, xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, HPLC-DAD, green hops homogenate, beer

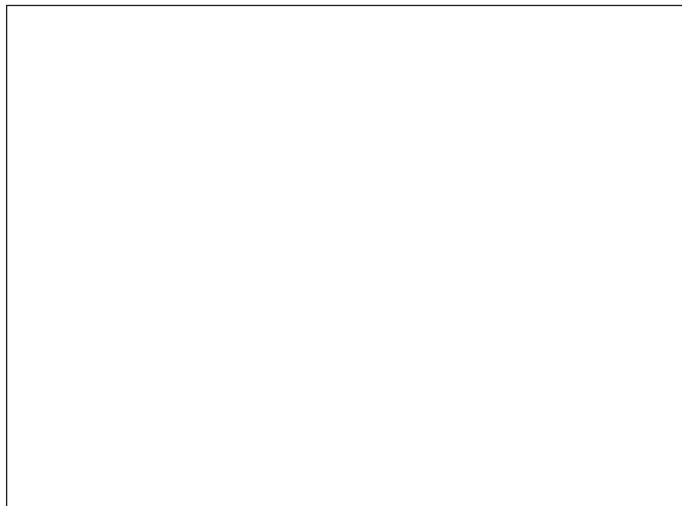
## 1 ÚVOD

Flavonoidy náležející do skupin prenylflavonoidů a isoflavonoidů prokazují vlastnosti podporující zdraví a ochranu proti řadě civilizačních chorob (Kondo, 2003; Stevens, Page, 2004). Jediným zdrojem prenylflavonoidů v pivu je chmel. Isoflavonoidy v pivu pocházejí z chmele i sladu (Mikyška et al., 2007).

## 1 INTRODUCTION

Polyphenolic substances belonging to prenylflavonoids and isoflavonoids groups have health-promoting effects and protecting effects against many civilization diseases (Kondo, 2003; Stevens and Page, 2004).

Xanthohumol is dominant prenylflavonoid in hops (Krofta et al., 2005), it inhibits the proliferation of certain types of cancer, has antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects (Miranda



Obr. 1 Struktura nejvýznamnějších prenylflavonoidů chmele a piva /  
Fig. 1 Structures of most important prenylflavonoids in hops and beer

Ve chmelu je dominantním prenylflavonoidem xanthohumol (Krofta et al., 2005), který působí inhibičně na některé typy rakovinného bujení, má antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky (Miranda et al., 2000; Gerhäuser, 2005). Xanthohumol společně s některými složkami chmelových pryskyřic působí inhibičně při vzniku osteoporózy (Tobe et al., 1997). Tepelnou izomerizací xanthohumolu vzniká v pivu výrazně převažující isoxanthohumol (Forster et al., 2002; Krofta, 2010), který je významným prekursorem 8-prenylnaringeninů vznikajícího působením bakterií ve střevním traktu (Possemiers et al., 2005). Spontánní transformací desmethylxanthohumolu z chmele vzniká 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin. Obě tyto látky, zejména 8-prenylnaringenin, jsou silnými fytoestrogeny (Milligan et al., 1999). Schéma transformací chmelových prenylflavonoidů je na obr. 1.

Isoflavonoidy daidzein, genistein a jejich prekursor formononetin a Biochanin A (obr. 2) jsou dlouho známými fytoestrogeny (Adlercreutz, 1990), inhibují růst a proliferaci některých typů nádorů, mají antioxidační a antimikrobiální účinky, působí proti osteoporóze (Adlercreutz et al., 1995; Foti et al., 2005; Medjakovic et al., 2008).

Pro stanovení xanthohumolu a pěti dalších flavonoidů v komplexní matici piva a bylinných čajů s obsahem chmele vyvinuli (Stevens et al., 1999) metodu HPLC s MS-MS detekcí. Další vývoj techniky v oblasti HPLC-MS umožnil Česlové et al. (2009) stanovení xanthohumolu a prenylovaných flavonoidů současně s ostatními polyfenolickými sloučeninami a hořkými kyselinami v pivu a chmelových extraktech. Identifikace byla založena na kombinaci retenčních časů, UV a APCI-MS spekter. Obě detekční techniky UV- a APCI-MS byly použity pro kvantitativní stanovení a poskytly srovnatelné výsledky.

Magalhaes et al. (2007) sledovali obsah xanthohumolu a isoxanthohumolu ve chmelových produktech – peletách, ethanolickém a CO<sub>2</sub> extraktu metodou HPLC – DAD, kde pro potvrzení identifikace xanthohumolu a isoxanthohumolu použili HPLC-ESI-MS/MS. V další práci (Magalhaes et al., 2008) byly zmapovány jednotlivé fáze technologického procesu výroby piva a jejich vliv na izomerizaci xanthohumolu a studován dopad aplikace chmelových preparátů obohacených o xanthohumol. Obsah xanthohumolu a isoxanthohumolu v pivech a meziproduktech byl měřen metodou HPLC s UV detekcí. Byl potvrzen inhibiční vliv barevných sladů (karamelových a pražených) na isomerizaci xanthohumolu. Tento jev vysvětlil již dříve Walker et al. (2003) tvorbou komplexů xanthohumolu se složkami barevného sladu, chovajícími se odlišně od původního xanthohumolu. Koncentrace v tmavých pivech, naměřené pomocí LC-MS bez předchozího čištění SPE, proto mohou dosahovat až 10 mg/l a přesahují rozpustnost xanthohumolu (3,5 mg/l) v ethanolickém vodném roztoku. Wunderlich et al. (2009) vysvětlili nalezené vyšší koncentrace xanthohumolu v tmavých pivech bez předchozího SPE čištění ustanovením rovnovážných koncentrací mezi volným a v komplexu vázaným xanthohumulonem. Krofta (2010) k monitoringu obsahu isoxanthohumolu a xanthohumolu v českých světlých pivech a zahraničních pivech, sledování ztrát při výrobě piva a sledování stability během skladování piva použil HPLC-DAD metodu s čištěním a zakoncentrováním vzorků pomocí SPE.

Pro stanovení isoflavonoidů daidzeinu, genisteinu, formononetinu a Biochaninu A v pivu byly vypracovány metody založené na imunochemické detekci (Lapčík et al., 1998), plynové chromatografii po izolaci a derivatizaci sledovaných látek na těkavé sloučeniny (Miku-



Obr. 2 Struktura isoflavonoidů –  
fytoestrogenů / Fig. 2 Structures  
of isoflavonoids – phytoestrogens

et al., 2000; Gerhäuser, 2005). Xanthohumol together with some other components of hop resins inhibits the onset of osteoporosis (Tobe et al., 1997). Isoxanthohumol, a predominant prenylflavonoid occurs in beer, is formed by a thermal isomerization of xanthohumol (Forster et al., 2002; Krofta, 2010). Isoxanthohumol is an important precursor of 8-prenylnaringenin which is generated by the intestinal tract bacteria (Possemiers et al., 2005). By spontaneous transformation of hop desmethylxanthohumol 6-prenylnaringenin and 8-prenylnaringenin are formed. Both of these substances, in particular 8-prenylnaringenin, are potent phytoestrogens (Milligan et al., 1999). Hop prenylflavonoids transformations scheme is in the Fig. 1.

Isoflavonoids daidzein, genistein and their precursors formononetin and biochanin A (Fig. 2) have been long known phytoestrogens (Adlercreutz, 1990), inhibit the growth and proliferation of certain types of cancer, have an antioxidant and antimicrobial properties and are effective against osteoporosis (Adlercreutz et al., 1995; Foti et al., 2005; Medjakovic et al., 2008).

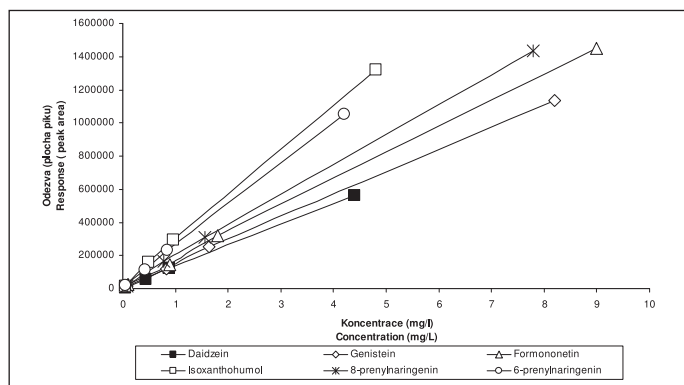
HPLC method with MS-MS detection to determine xanthohumol and five other flavonoids in a complex matrix of beer and herbal teas containing hops was developed by Stevens et al. (1999). Further technical development in the field of HPLC-MS enabled Česlová et al. (2009) xanthohumol and prenylated flavonoids together with other polyphenolic compounds and bitter acids determination in beer and hop extracts. Identification was based on a combination of retention times, UV spectra and APCI MS. Both detection techniques UV and APCI-MS were used for quantitative determination and provide comparable results.

Magalhaes et al. (2007) investigated the isoxanthohumol and xanthohumol content in hop products – pellets, CO<sub>2</sub> and ethanol extract by HPLC – DAD method, for confirming the identification of xanthohumol and isoxanthohumol HPLC-ESI-MS/MS was used. In another work (Magalhaes et al., 2008) different stages of the technological process of beer production were mapped, their influence on the xanthohumol isomerization was studied and the impact of applying hop preparations enriched in xanthohumol. Isoxanthohumol and xanthohumol content in beer and intermediates was measured by HPLC with UV detection.

The inhibitory effect of colored malts (caramel and roasted) for xanthohumol isomerization was confirmed. This phenomenon explained previously Walker et al. (2003) by a xanthohumol complexation with components in colored malt, behaving differently from the original xanthohumol. Concentration in dark beers measured by LC-MS without prior purification of the SPE can therefore be up to 10 mg/L, exceed xanthohumol solubility (3.5 mg/L) in ethanol aqueous solution. Wunderlich et al. (2009) explained found higher xanthohumol concentrations in dark beers without SPE purification by an establishment of equilibrium concentrations between free and in complex bound xanthohumol. For monitoring the isoxanthohumol and xanthohumol content in Czech pale beers and foreign beers, tracking losses in the beer production and stability in the course of beer storage, Krofta (2010) used a SPE- HPLC-DAD method.

Methods based on immunochemical detection (Lapčík et al., 1998), gas chromatography after isolation and derivatization of controlled substances into volatile compounds (Mikulíková et al., 2005) and HPLC-CoulArray (Kellner et al., 2007) to determine of isoflavonoids daidzein, genistein, formononetin and Biochanin A in beer have been developed. Each of these methods have specific disadvantages.

Method HPLC-DAD to monitoring of isoxanthohumol and xanthohumol content in raw materials and their changes during brewing seems as sufficient. Simultaneous determination of other prenylflavonoids and some of the isoflavonoids allows getting a more comprehensive assessment of the content of biologically active flavonoids. To determine prenylflavonoids and isoflavonoids occurring in minority or lower concentrations, however, more efficient is HPLC coupling with MS-MS detection, due to the higher sensitivity and selectivity.



Obr. 3a Lineární odezva UV detektoru / Fig. 3a Linearity of UV detector response

líková et al., 2005) a HPLC-CoulArray (Kellner et al., 2007). Každá z těchto metod má specifické nevýhody.

Pro monitorování obsahu xanthohumolu a isoxanthohumolu v surovinách a jejich změn v průběhu výroby piva se jeví metoda HPLC-DAD jako postačující. Současné stanovení ostatních prenylflavonoidů a některých isoflavonoidů umožňuje získat komplexnější posouzení obsahu biologicky aktivních flavonoidů. Pro stanovení prenylflavonoidů i isoflavonoidů vyskytujících se v nižších nebo minoritních koncentracích je ovšem účinnější spojení HPLC s MS-MS detekcí, z důvodu vyšší citlivosti a selektivity.

V pivovarství je v posledním desetiletí věnována pozornost prenylflavonoidům. Jsou vypracovávány modifikované technologie pro výrobu pív s vyššími koncentracemi těchto biologicky aktivních látek aplikací chmelových preparátů obohacených xanthohumolem. Hlavními sledovanými složkami jsou xanthohumol a isoxanthohumol. Sušením chmele se část labilních sekundárních metabolitů chmele, ke kterým náleží i prenylflavonoidy a isoflavonoidy, ztrácí. Použití homogenátu zeleného chmele stabilizovaného vysokým tlakem může představovat netradiční postup pro zvýšení obsahu biologicky aktivních flavonoidů v pivu.

V tomto článku je popsána nově vypracovaná analytická metoda HPLC-DAD pro simultánní stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů ve chmelu a pivu a výsledky úvodní studie dopadu chmelení homogenátem zeleného chmele na obsah těchto látek v pivu.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Metoda simultánního stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů

#### Chemikálie

**Referenční standardy:** xanthohumol, 6 – prenylnaringenin, 8 – prenylnaringenin byly zakoupeny od firmy Phytochem (Německo), isoxanthohumol od firmy AAPIN Chemicals Limited (UK), formononetin a Biochanin A od firmy Fluka, daidzein a genistein od firmy Sigma.

**Kalibrační roztoky:** navážením 0,2 – 1 mg každé sloučeniny s přesností 0,1 mg do 5 ml odměrky a doplněním po značku methanolem (čistoty pro gradient, Merck) byl připraven zásobní kalibrační roztok. Jeho ředěním methanolem stejné čistoty 10x, 50x, 100x, a 1000x do 10 ml odměrek byly připraveny kalibrační roztoky.

**Pomocné roztoky:** byly připraveny pomocí deionizované vody (Millipore, TOC < 5 ppb), methanolu p.a. (Merck), 85 % kyseliny fosforečné p.a. (Merck) a acetonu p.a. (Lachner).

Pro extrakci z piva:

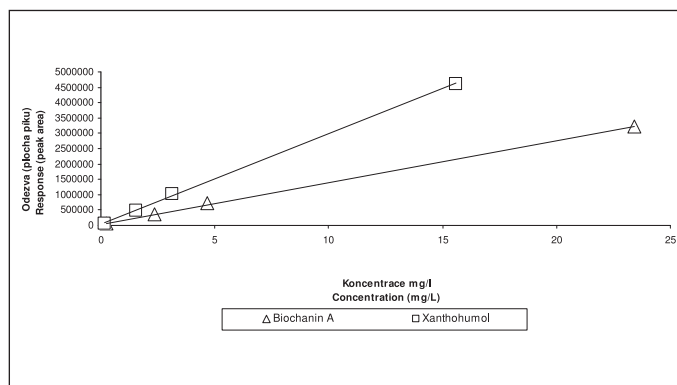
1. deionizovaná voda okyselená kyselinou fosforečnou (100 : 0,2, v/v)
2. methanol + voda + kyselina fosforečná (20 : 80 : 0,2, v/v/v)
3. methanol okyselený kyselinou fosforečnou (100 : 0,2, v/v)

4. Pro extrakci chmelových preparátů:

70% roztok acetonu ve vodě, extrakty byly filtrovány přes filtrační papír MUNKTELL kvality 1288

#### Analytický postup

Izolace flavonoidů z piva: vysoce hydrofobní isoflavonoidy a prenylflavonoidy byly extrahovány z piva na pevnou fázi (SPE, Strata C 18 – E, 500 mg/6ml, Phenomenex).



Obr. 3b Lineární odezva UV detektoru / Fig. 3b Linearity of UV detector response

In the brewing industry, attention is paid to prenylflavonoids in the last decade; modified technologies for the production of beers with higher concentrations of these biologically active substances applications xanthohumol-enriched hop preparations are being developed. Xanthohumol and isoxanthohumol are the main monitored components. Drying hops a part of unstable secondary hop metabolites including prenylflavonoids and isoflavonoids is lost. The high pressure stabilized green hops homogenate can be a non-traditional approach to an increase in a content of bioactive flavonoids in beer.

This article describes the recently developed analytical method HPLC-DAD for simultaneous determination of prenylflavonoids and isoflavonoids in hops and beer, and the results of preliminary study on an impact of hopping by green hops homogenate on a content of these substances in beer.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Method of simultaneous determination of isoflavonoids and prenylflavonoids

#### Chemicals

**Reference standards** xanthohumol, 6-prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin were purchased from Phytochem (Germany), isoxanthohumol from AAPIN Chemicals Limited (UK), formononetin and biochanin A were obtained from Fluka, daidzein and genistein from Sigma.

**Calibration solutions:** stock standard solution was prepared by weighting out 0.2–1.0 mg  $\pm$  0.1 mg exactly of each compound into 5 ml volumetric flask and made the contents up to volume with gradient grade methanol (Merck) at 20 °C. Calibration solutions were prepared by dilution of stock standard 10x, 50x, 100x and 1000 x into the 10 ml beakers in methanol. Flasks were stoppered and mixed by inversion at least four times.

**Other solutions** were prepared using deionized water (Millipore, TOC < 5 ppb), methanol analytical-reagent grade (Merck) and 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> analytical-reagent grade (Merck) and acetone analytical – reagent grade (Lachner).

For extraction of beers:

1. deionized water acidified H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100:0.2, v/v)
2. methanol + water + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20:80:0.2, v/v/v)
3. acidified methanol H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 : 0.2, v/v)

4. For extraction of hop and hop preparations:

70% solution of acetone in water, extracts were filtered using filter discs 1288 Grade (MUNKTELL)

#### Analytical procedure

**Isolation of beer flavonoids:** the high hydrophobic analytes as isoflavonoids and prenylflavonoids were extracted from beer using solid phase extraction column, SPE, (Strata C18-E, 500 mg/6 ml, Phenomenex).

The SPE column was equilibrated by 10 ml of methanol and subsequently by 10 ml of acidified water (solution No. 1).

50 ml of beer sample was defoamed by sonification and acidified by 0.1 ml of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and then the sample was applied on conditioned SPE column.



SPE kolony byly ekvilibrovány 10 ml methanolu a následně 10 ml okyselené vody (roztok 1). 50 ml vzorku piva bylo odpěněno v ultrazvukové lázni a okyseleno 0,1 ml kyseliny fosforečné a aplikováno na kondicionovanou SPE kolonku. Proplachem kolonky 10 ml roztoku 2 byly odstraněny nečistoty a kolonka vysušena prosátím vzduchu asi po dobu 5 minut. Analyty byly potom vyeluovány roztokem 3 do objemu 2,5 ml.

Výtěžnost extrakčního postupu byla testována pomocí plzeňského piva. Na kolonkách byl extrahován jednak vzorek piva původního, jednak vzorek piva spikovaného. Podíl rozdílů koncentrací těchto vzorků a známého koncentračního navýšení o sledované analyty vyjádřený v procentech představuje výtěžnost extrakčního postupu na modelovém vzorku plzeňského piva. Získané výsledky pro jednotlivé analyty podává tab. 1.

Extrakce flavonoidů z chmelových preparátů: 0,8 g sušeného chmele nebo 8 g homogenátu bylo extrahováno na horizontální-podélné třepačce, 140 min<sup>-1</sup> (Bühler KS15A/B, Německo) ve 250 ml roztoku 4 po dobu 40 minut a extrakt přefiltrován. 10 ml extraktu sušeného chmele resp. 5 ml extraktu chmelového homogenátu bylo odpařeno do sucha na rotační vakuové odparce při 60 °C do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml methanolu čistoty pro gradient (Merck).

#### Chromatografické podmínky:

Analyty byly separovány na reverzní fázi Purospher STAR, RP-18e se zrněním částic 5 μm, rozměry kolony byly 250 x 4 mm (Merck).

K separaci byly použity mobilní fáze: A ultračistá voda (TOC < 5 ppb) okyselená kyselinou mravenčí pro MS na pH v rozmezí 3–4, B acetonitril pro gradient. Pro separaci byl použit gradient: 0–10 min. 40–52,5 % B, 10–20 min. 52,5–57,5 % B, 20–21 min. 57,5–40 % B, 21–26 min. 40 % B.

Chromatografická aparatura se skládala z kvarterní pumpy P4000, dávkovače AS3000 a DAD detektoru UV6000LP, vše od Thermo Separation Products (TSP, USA). Chromatografická data byla snímána a zpracována chromatografickým softwarem ChromQuest 2.1 (TSP, USA).

Pro hodnocení čistoty píků bylo použito skenování od 250 do 400 nm a softwarová funkce pro výpočet indexů vypovídajících o homogenitě eluční zóny. V retenčních časech sledovaných flavonoidů byla prokázána vysoká čistota elučních zón a tím i dostatečná selektivita chromatografického systému pro jejich měření a vyhodnocení.

Using of 10 ml of solution No. 2 more polar impurities were discard. Analytes were eluted by solution No. 3 into final volume 2.5 ml after 5 minutes of air drying up.

Pilsner beer was used for the recovery test in beer matrix. 50 ml of de-foamed beer was spiked by 0.5 mL stock solution. Spiked beer and unspiked beer, both 50 ml, were extracted on SPE columns. Both extracts were immediately analyzed by the HPLC method described above. Recoveries (R) of all analytes were calculated as  $R = (csp - cp)/c$ , where csp and cp are the concentrations of analytes in spiked and unspiked beer respectively, c is the spiked concentrations of analytes (Tab. 1).

Isolation of hops flavonoids: 0.8 g of dried hop samples or 8 g of wet hop samples were extracted using horizontal-orbital shaker, 140 RPM. (Bühler KS15A/B, Germany) in 250 ml of acetone solution for 40 min. The extract was filtered using porous filter (MUNKTELL 1288) and 10 ml of filtrate were dried on rotating vacuum evaporator at 60 °C to dryness and dissolved in 5 ml of gradient grade methanol (Merck).

#### Chromatography conditions

Analytes were separated on reverse phase Purospher STAR, RP-18e column, 250 x 4.6 mm, 5 μm particle size (Merck). Two mobile phase: A ultra-clean water (TOC < 5 ppb) acidified by formic acid grade for mass spectroscopy at pH 3–4, B acetonitrile gradient grade. The gradient used for separation: 0 – 10 min. 40–52.5% B, 10–20 min. 52.5–57.5% B, 20–21 min. 57.5–40% B.

Chromatographic experiments were performed using a modular chromatography system including the UV6000LP detector, the quaternary pump P4000 and the auto-sampler AS3000, all from Thermo Separation Products (TSP, U.S.A). Chromatographic data were collected and recorded on the chromatography data system ThermoQuest version number 2.1 (TSP, U.S.A).

The UV spectra were scanned from 250 to 400 nm to assessment peak purities using of software function to calculation of peak index homogeneity. High purity of analysed peaks was validate therefore also good system selectivity.

10 μl of a sample was injected onto the column that was kept on 35 °C and flow rate was 0.8 mL/min. Xanthohumol was detected at 370 nm and other analytes were detected at 290 nm.

Tab. 1 Výtěžnost extrakčního postupu pro vzorek plzeňského piva / Recovery of extraction procedure for Pilsner beer sample

Sloučenina / Compound	Koncentrační nárůst spikování (mg/l) / Concentration increase by spiking [mg/L]	I. Nespikované pivo (mg/l) / I. Unspiked beer [mg/L]	II. Spikované pivo (mg/l) / II. Spiked beer [mg/L]	Rozdíl II.–I. (mg/l) / Difference II.–I. [mg/L]	Výtěžnost % / Recovery %
daidzein	0.44	0.03	0.49	0.46	105.0
genistein	0.82	0.03	0.75	0.72	87.9
isoxanthohumol	0.48	0.74	1.15	0.41	84.7
formononetin	0.9	0.01	0.80	0.80	88.5
8-prenylaringenin	0.78	0.02	0.74	0.71	91.6
Biochanin A	2.34	0.00	2.10	2.10	89.8
6-prenylaringenin	0.42	0.00	0.43	0.43	102.3
xanthohumol	1.56	0.05	1.37	1.33	85.0

Tab. 2 Meze stanovení analyzovaných flavonoidů v matici piva a chmele / Limits of quantitation of analyzed flavonoids in beer and hop matrix

Flavonoid	směrnice / slope	Mez stanovení / Limit of quantification		
		pivo (μg/l) / beer (μg/L)	chmelový homogenát / hops homogenate (mg/kg)	sušený chmel / dried hops (mg/kg)
Daidzein	7.19E-06	1.7	1.06	5.31
Genistein	6.40E-06	3.67	2.29	11.5
Isoxanthohumol	3.16E-06	9.14	5.71	28.6
Formononetin	6.18E-06	3.73	2.33	11.7
8-Prenylaringenin	5.40E-06	0.78	0.49	2.45
Biochanin A	7.24E-06	4.41	2.75	13.8
6-Prenylaringenin	3.97E-06	2.02	1.26	6.32
Xanthohumol	3.36E-06	0.91	0.57	2.84

Na kolonu bylo dávkováno 10 µl vzorku, kolona byla udržována na teplotě 35 °C, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min. Xanthohumol byl detekován a vyhodnocen při vlnové délce 370 nm, ostatní flavonoidy při 290 nm.

## 2.2 Pivovarské pokusy

### Chmel

Homogenát nesusušeného chmele byl připraven patentovaným postupem (Houska et al., 2009). Zelené chmelové hlávky odrůd Žatecký poloraný červeňák a Agnus byly odebrány na začátku sušící linky na zpracování chmele a homogenizovány v mixeru v inertní atmosféře bez přístupu vzduchu. Homogenát byl plněn do bariérových obalů a sterilizován vysokým tlakem. Současně byly na výstupu sušící linky odebrány vzorky sušeného chmele. Vzorky byly uchovávány v evakuovaných obalech a před aplikací jemně rozemlety. V homogenátech a sušených chmelech byl stanoven obsah vody, α-kyselin, β-kyselin (Analytica EBC, 1998) a obsah prenylflavonoidů a isoflavonoidů.

### Várky

Byly připraveny dvě série várek 11% světlého piva. Pro hlavní chmelení byl použit chmelový extrakt superkritickým oxidem uhličitým, který má velmi nízký obsah prenylflavonoidů (Magalhaes et al., 2007). Celková dávka chmelových preparátů byla vypočítána na výslednou hořkost 25 B.U.

V první sérii pokusů bylo testováno použití chmelového homogenátu jako poslední dávky chmelení. Mladina chmelená CO<sub>2</sub> extraktem (80 % celkové dávky α kyselin) byla připravena ve 200 l pokusném pivovaru a byla rozdělena na podíly o objemu 40 l pro následný 15minutový chmelovar v menším pokusném pivovaru. Byly použity chmelové homogenáty (ŽPČ HT, Agnus HT) a referenční sušené chmele (ŽPČ SO, Agnus SO).

Druhá série pokusů byla zaměřena na „nízkoteplotní“ extrakci chmelových flavonoidů. Mladina chmelená CO<sub>2</sub> extraktem na 100 % celkové dávky alfa-kyselin byla opět připravena v objemu 200 l. Chmele ŽPČ HT a ŽPČ SO byly v dávce shodné s první sérií pokusů (20 % – α kyselin na várku) a byly aplikovány do sedimentační nádoby (doba kontaktu 1,5 hodiny) nebo při sudování (doba kontaktu 30 dnů při teplotě 0–2 °C). Piva byla filtrována celulózovými deskami a stočena do lahví pod oxidem uhličitým.

Chemický rozbor pív byl proveden metodami dle Analytiky EBC (Analytica EBC, 1998). Piva byla sensoricky hodnocena deskriptivní metodou VÚPS (Čejka et al., 2002).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Metoda stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů

#### Linearita odezvy detektoru

V rozsahu koncentrací 0,04 – 8,2 mg/l, v němž byly měřeny daidzein, genistein, formononetin, isoxanthohumol, 8 – prenylnaringenin a 6 – prenylnaringenin (obr. 3a), a v rozsahu koncentrací 0,15–23,4 mg/l, v němž byly měřeny Biochanin A a xanthohumol (obr. 3b),

## 2.2 Brewing trials

### Hops

Non-dried hop homogenate was prepared by a patented process (Houska et al., 2009). Green cones of Saaz and Agnus varieties were taken on the input of hops processing drying line. Hops were homogenized in a mixer in an inert atmosphere without air. The homogenate was placed in barrier packaging and sterilized with high pressure action. Dried hops samples were taken at the output of drying line at the same time. Samples were kept in the evacuated container and finely milled before usage. Water content, α-acids, β-acids (Analytica EBC, 1998) and prenylflavonoids and isoflavonoids content in homogenates and dried hops was determined.

### Brews

Two series of 11% pale lager brews were prepared. For main hopping hop extract with supercritical carbon dioxide containing very low amount of prenylflavonoids (Magalhaes et al., 2007) was used. The total dose of hop preparations for the resulting bitterness B.U. = 25 was calculated.

In the first series of experiments hop homogenate usage in last hop dose was tested. Hopped wort (CO<sub>2</sub> extract, 80% of total α acids dose) was prepared in 200 L experimental brewery. It was divided into shares with a volume of 40 L for the subsequent 15-minute wortboiling in a smaller of experimental breweries. Hop homogenates (Saaz hops HT, Agnus HT) and reference dried hops (Saaz hops SO, Agnus SO) were applied.

The second series of experiments was focused on „low-temperature“ extraction of hop flavonoids. Hopped wort (CO<sub>2</sub> extract at 100% of the total dose of α acids) was prepared in a volume of 200 L again. Saaz hops HT and Saaz hops SO in a dose identical with the first series of experiments (20% α acids per batch) and were applied to the wirpool (contact time 1.5 hours), or at the beginning of maturation (contact time 30 days at 0–2 °C). Beer was filtered by cellulose plates and bottled under carbon dioxide.

Chemical analysis was carried out by methods of beers according to EBC methods (Analytica EBC, 1998). Beers were sensory evaluated using descriptive VÚPS (Čejka et al., 2002).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Method for the determination of isoflavonoids and prenylflavonoids

Linear response of UV diode array detector: The UV detector shown excellent linearity response in the range of concentrations 0.04–8.2 mg/L for daidzein, genistein, formononetin, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin and 6-prenylnaringenin (Fig. 3a) and in range concentrations 0.15–23.4 mg/L for biochanin A and xanthohumol (Fig. 3b). The areas of peaks were plotted against concentration of each compound in calibration standard.

#### Limits of detection and quantification

The detection limit of each compound was calculated from the amount required to give signal/noise = 3 and the quantification limit from the amount required to give signal/noise = 10 and were established from calibration curves extrapolated to zero. Slopes of calibra-

Tab. 3 Obsah hořkých látek (%) a flavonoidů ve chmelech (mg/kg sušiny) / Bitter acids (%) and flavonoids content in hops (mg/kg D.M.)

	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	Agnus	Agnus
	SO	HT	SO	HT
α-kyseliny / α-acids	3.4	3.3	10.5	12.0
β-kyseliny / β-acids	5.8	8.0	7.3	9.2
XN : Alfa / XN vs Alpha	0.87	0.79	0.58	0.61
Daidzein	2.7*	5.6	19.4	6.2
Genistein	21.2	10.9	10.8*	11.1
Formononetin	14.4	15.4	53.4	21.3
Biochanin A	16.8	ND	51	24.3
Xanthohumol	2974	2620	6045	7356
Iso-xanthohumol	19.7*	17.6*	75.3	51.1
8-Prenylnaringenin	14.0	19.6	10.5	22.3
6-Prenylnaringenin	64.7	48.6	161.6	97.3

SO – sušený chmel/ dried hops

HT – homogenát zeleného chmele/ green hops homogenate

\*) hodnoty pod mezí stanovení metody/ values below the limit of quantification

vykazoval detektor lineární závislost odezvy na koncentraci. Odezva byla vyjádřena plochou píku.

### Meze stanovení a meze detekce

Meze stanovení a meze detekce byly určeny pro každý analyt z příslušné kalibrační závislosti. Poměr signál/šum odpovídal hodnotě 3 pro mez detekce a hodnotě 10 pro mez stanovení. Směrnice jednotlivých kalibračních přímků procházejících počátkem a vypočítané meze stanovení pro pivo v návaznosti na extrakční postup podává *tab. 2*. V této tabulce jsou dále uvedeny meze stanovení odpovídající metodickému postupu pro extrakce z matrice chmelového homogenátu a matrice suchého chmele.

Vypracovaná HPLC metoda s UV detekcí a ověřenou čistotou píků odpovídající sledovaným analytům poskytuje velmi dobrý nástroj k posouzení obsahu prenylflavonoidů a isoflavonoidů v matrici použitých sušených chmelů a chmelových preparátů. Stejná metoda vykazuje v případě analýzy piva uspokojivé výsledky pro kvantifikaci daidzeinu, xanthohumolu, isoxanthohumolu, 8-prenylarigeninu a 6-prenylarigeninu. Hodnoty koncentrací pro genistein, formononetin a Biochanin A se však u analyzovaných piv nacházejí pod mezí stanovení použité metody. V matrici sledovaných chmelů byly zjištěné výsledky pod mezí stanovení ojediněle (*tab. 3*). Vzorový chromatogram pořízený pro matrici chmele podává *obr. 4*, chromatogram pro matrici piva je na *obr. 5*.

V případě chmelové matrice, kde je extrakční prostředí tvořeno 70 % acetonu, který vykazuje střední polaritu, nelze zařadit další čisticí kroky na reverzní fázi a vzorek je proto odpařen a rozpuštěn v methanolu pro další HPLC stanovení. Docílení snížení mezí stanovení je možné řešit zvýšením navážky analyzovaného vzorku při zachování ostatních analytických podmínek.

V případě matrice piva, kde jsou látky extrahovány z vodně alkoholického prostředí (4 % alkoholu) na pevné fázi C18, by bylo možné aplikovat větší množství vzorku za předpokladu, že nebude překročena kapacita sorbentu a případným následným zahuštěním eluátu.

V obou případech aplikace většího objemu nebo navážky vzorku je však nutné uvažovat i zvýšení koncentrací ostatních neanalyzovaných látek v obou matricích. Je tedy nutné, aby pro separaci byla zajištěná dostatečná účinnost kolony a nedocházelo k nežádoucím koelucím s doprovodnými složkami matrice. Splnění této podmínky je třeba ověřit zjištěním čistoty elučních zón.

### 3.2 Pivovarské pokusy

#### Chmel

Sušením se ztrácí část chmelových pryskyřic a silic. Homogenáty zeleného chmele ŽPČ a Agnus obsahovaly v porovnání se sušenými chmely o 38 %, respektive 26 % vyšší množství  $\beta$ -kyselin v porovnání se sušeným chmelem. Je známo, že  $\beta$ -kyseliny jsou citlivější na oxidaci nežli  $\alpha$ -kyseliny (Verzele a De Keukeleire, 1991). Obsah  $\alpha$ -kyselin v homogenátu byl vyšší (o 14 %) pouze u chmele Agnus. U tohoto homogenátu byl v porovnání se sušeným chmelem

tion curves and calculated limits give *Tab. 2*. There are in the table also limits of quantification corresponding with extraction methods for beer, hops homogenate and dry hops.

Developed HPLC method with UV detection and certified purity of the peaks corresponding to the monitored analytes provides a very good tool to assess the isoflavonoids and prenylflavonoids content in the matrix of used dried hops and hop preparations. The same method applied on the analysis of beer shows satisfactory results for the daidzein, xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylarigenin and 6-prenylarigenin quantification. However, concentration values for genistein, formononetin and biochanin A in the analyzed beers are below the determination limit of used method. In the matrix of tested hops, results below the limit of determination were rarely established (*Tab. 3*). A specimen of chromatogram obtained for hop matrix reports *Fig. 4*, a chromatogram obtained for beer matrix is on *Fig. 5*.

Regard to hop matrix, where the extractive environment consists of the 70% acetone, which exhibits intermediate polarity, other purification steps on reversed-phase are impossible, therefore the sample is evaporated and dissolved in methanol for following HPLC assay. Achieving a reduction in the limits of determination can be solved by increasing the sample weight of the sample analyzed, while maintaining other analytical conditions.

For beer matrix, where the compounds are extracted from the aqueous alcoholic environment (4% alcohol) larger sample amount on the solid-phase C18 could be applied, provided that it will not exceed sorbent capacity, and perhaps by following concentrating the eluate.

In both cases the application of a certain size or a portion of the sample, it is necessary to consider an increase in concentrations of other non-analyzed substances in both matrices. Therefore it is necessary that the separation was by sufficient column efficiency secured and avoid undesirable co-elutions with associated matrix constituents. By noting the purity elution zones this condition should be checked.

### 3.2 Brewing trials

#### Hops

Some hop resins and oils are dissipating by drying. Green hops homogenates of Saaz and Agnus contained by 38% and 26% higher amounts of  $\beta$ -acids in comparison with dried hops. It is known that  $\beta$ -acids are more susceptible to oxidation than  $\alpha$ -acids (Verzele and De Keukeleire, 1991). The content of  $\alpha$ -acids in the homogenate was higher (by 14%) only in Agnus hops. In this homogenate was by 22% higher content of xanthohumol compared with dried hops (*Tab. 3*). A content of isoxanthohumol and 6-prenylarigenin in thermally untreated hop homogenates was lower. For 8-prenylarigenin an opposite trend was observed. The content of isoflavonoids did not show a clear trend in relation to postharvest hop processing.

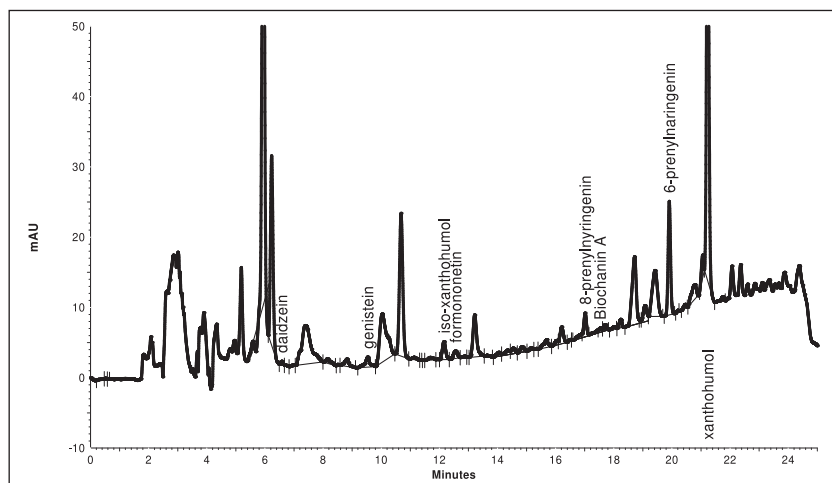
#### Beers

Brewing experiments have been focused mainly on research of influence of non-dried hops application on the content of biologi-

Tab. 4 Výsledky rozboru piv / Results of beer analyses

		I. Série várek / Brewing series				II. Série várek / Brewing series			
		Chmelovar / Wort Boiling				Vířivá kád / Whirlpool		Dokvašování / Secondary fermentation	
		ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	Agnus	Agnus	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz
		SO	HT	SO	HT	SO	HT	SO	HT
Zdánlivý extrakt / Apparent extract	%	3.04	3.74	3.10	4.16	2.94	3.54	3.46	3.25
Skutečný extrakt / Real extract	%	4.63	5.20	4.67	5.53	4.47	4.88	4.81	4.63
Alkohol / Alcohol	% vah./w.	3.42	3.12	3.37	2.93	3.28	2.86	2.89	2.93
Původní extrakt / Original extract	%	11.29	11.28	11.22	11.22	10.86	10.47	10.46	10.35
Prokvašení zdánlivé / Apparent attenuation	%	73.1	66.9	72.4	63.0	72.9	66.3	66.9	68.6
Prokvašení skutečné / Real attenuation	%	60.4	55.4	59.9	52.2	60.2	54.8	55.3	56.7
pH		4.44	4.50	4.44	4.55	4.38	4.43	4.55	4.52
Barva / Colour	EBC	8.32	8.41	8.42	8.69	7.39	6.49	6.52	6.51
Hořkost / Bitterness	B.U.	16	23	19	24	24	24	24	29
$\alpha$ -kyseliny / acids	mg/l	0.9	1.5	0.6	2.6	2.0	3.7	3.1	2.6
iso- $\alpha$ -kyseliny / acids	mg/l	18.2	27.9	22.6	30.2	28.2	26.4	27.3	27.0





Obr. 4 Chromatogram flavonoidů a prenylflavonoidů ve vzorku homogenátu nesusušeného chmele Žatecký červeňák, UV detekce UV při 290 nm / Fig. 4 The chromatogram of flavonoids and prenylflavonoids in the non dried Saaz hops homogenate, UV detection at 290 nm

o 22 % vyšší obsah xanthohumolu (tab. 3). Obsah isoxanthohumolu a 6-prenylnaringenin byl nižší v termicky neupravených chmelových homogenátech. Opačný trend byl zjištěn pro 8-prenylnaringenin. Obsah isoflavonoidů neukázal jednoznačný trend ve vztahu k posklizňovému zpracování chmele.

#### Pivo

Varní pokusy byly zaměřeny především na výzkum dopadu aplikace nesusušeného chmele na obsah biologicky aktivních iso- a prenylflavonoidů v pivu. V první sérii, kdy byly chmele vařeny 15 minut v mladině chmelené CO<sub>2</sub> extraktem na 80 % cílové hořkosti piv 25 j.h., je patrná vyšší míra využití α-kyselin u homogenátů. Analytická hořkost i obsah iso-α-kyselin v pivech chmelených homogenátů zeleného chmele byly překvapivě výrazně vyšší v porovnání se sušeným chmelem (tab. 4). Zda se jedná o obecnou vlastnost chmelení zeleným chmelem, bude nutno ověřit v dalších pokusech. Hypotetickým vysvětlením je rychlejší rozpouštění α-kyselin a nižší

cally active iso and prenyl flavonoids in beer. In the first series, where hops were boiled for 15 minutes in a wort hopped by CO<sub>2</sub> extract on 80% of the target bitterness 25 BU is shown higher α-acids yield by homogenates application. Analytical bitterness and the content of iso-α-acids in beer hopped by green hops homogenates were surprisingly significantly higher compared with dried hops (Tab. 4). Whether it is a general characteristic of hopping green hops will be verified in future experiments. Hypothetical explanation is the more rapid dissolution of α-acids and reduced iso-α acids losses by adsorption to break in the application of green hops.

The color and pH of the beers hopped by green hops homogenate were slightly higher than in the comparative experiment. Boiling with green hops and its applications in a whirlpool tub in the second series resulted in lower attenuation degree of beers. This may be the inhibitory effect of increased amounts of beta-acids in the wort or effect of substances, which are transformed during hops drying. For the first variant is the fact that for prolonged hops maceration during the maturation lower attenuation of beers hopped both dried and non-dried hops was determined.

With the exception of daidzein the content of isoflavonoids in beers was near or below the quantification limit. Thus the effect of hops form or method of hopping on isoflavonoids content in beer was not obvious.

The content of xanthohumol in beer ranged from 28 to 61 µg/L and was close to the average content in 30 Czech lager beers from eight breweries (33.4) provided by Krofta (2005). The content of xanthohumol in beer increased during the subsequent application of hops. There was little difference between hopping into the whirlpool tub and hopping at the beginning of maturation period (Tab. 5). In contrast, isoxanthohumol contents in beers markedly declined from wort boiling to hopping in the beginning of beer maturation. With the exception of the hopping in maturation period green hops homogenate applications brought increase in the xanthohumol content in beer by approximately 50% compared with dried hops (Tab. 6). Only for the wort boiling application higher values of isoxanthohumol in beers with hops homogenates were assessed (30 and 16%).

Tab. 5 Obsah isoflavonoidů a prenylflavonoidů v pivech (µg/l) / Isoflavonoids and prenylflavonoids content in beers (µg/L)

	I. Série várek / Brewing series				II. Série várek / Brewing series			
	Chmelovar / Wort Boiling				Vřivá kád' / Whirlpool		Dokvašování / Secondary fermentation	
	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	Agnus	Agnus	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz
	SO	HT	SO	HT	SO	HT	SO	HT
Daidzein	5.9	5.7	6.4	6.5	7.4	7.2	7.1	5.7
Genistein	2.7*	5.8	3.7	3.0*	8.7	14.0	8.0	0.9*
Formononetin	4.3	1.1*	1.8*	1.3*	1.9*	2.2*	3.7	17.9
Biochanin A	0.9*	ND*	1.9*	1.0*	4.6	1.4*	0.9*	1.7*
Xanthohumol	27.6	39.5	34.2	55.3	39.8	61.1	57.3	48.5
Isoxanthohumol	111.2	144.2	128.0	148.0	106.1	95.8	70.0	66.5
8-Prenylnaringenin	10.8	11.8	10.6	12.7	3.7	8.0	8.7	4.5
6-Prenylnaringenin	6.6	14.5	7.1	12.5	14.3	18.0	12.0	7.4

\*) hodnoty pod mezí stanovení metody / values below the limit of quantification

Tab. 6 Rozdíl obsahu prenylflavonoidů v pivech chmelených sušeným a zeleným chmelem (% rel.) / Difference in prenylflavonoids content in beers hopped by dried and green hops (% rel.)

	Chmelovar / Wort boiling	Chmelovar / Wort boiling	Vřivá kád' / Whirlpool	Dokvašování / Secondary fermentation
	ŽPČ / Saaz	Agnus	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz
Xanthohumol	43	62	54	-15
Isoxanthohumol	30	16	-10	-5
8-Prenylnaringenin	9	20	115	-49
6-Prenylnaringenin	118	77	25	-38

ztráty iso-  $\alpha$ -kyselin sorpcí na kaly při aplikaci zeleného chmele.

Barva a pH pív chmelených homogenátem zeleného chmele byly mírně vyšší v porovnání se srovnávacím pokusem. Chmelovar se zeleným chmelem i jeho aplikace ve vířivé kádě ve druhé sérii várek měla za následek nižší prokvašení pív. Může se jednat o inhibiční působení zvýšeného množství beta-kyselin v mladině nebo působení látek, které se transformují při sušení chmele. Pro prvou variantu hovoří skutečnost, že při dlouhodobé maceraci chmele aplikovaného při sudování bylo stanoveno nižší prokvašení u pív se sušeným i nesušeným chmelem.

Obsah studovaných isoflavonoidů v pivech byl s výjimkou daidzeinu blízký mezi kvantifikace nebo nižší. Vliv formy chmele nebo způsobu chmelení na obsah isoflavonoidů v pivu není zjevný.

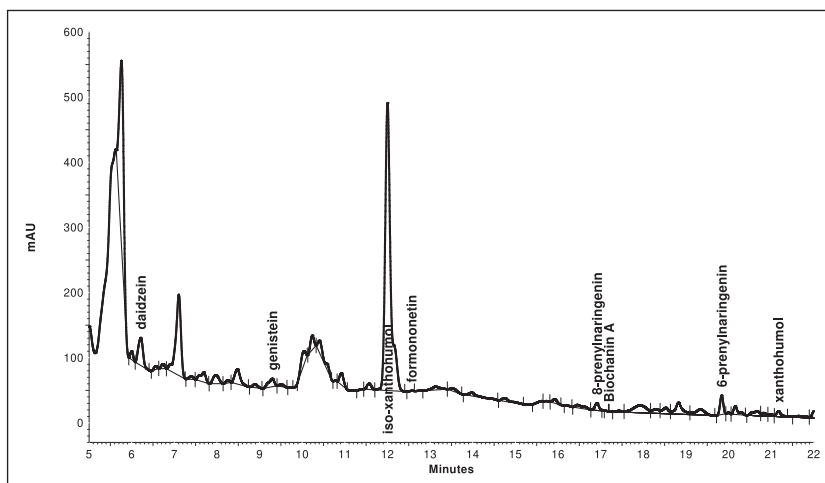
Obsah xanthohumolu v pivech byl v rozmezí 28–61  $\mu\text{g/l}$  a byl blízký průměrnému obsahu ve 30 českých ležáckých pivech z osmi pivovarů (33,4) stanovenému Kroftou (2005). Obsah xanthohumolu v pivu stoupal při pozdější aplikaci chmele. Malý rozdíl byl mezi chmelením do vířivé kádě a chmelením na začátku dokvašování (tab. 5). Obsah isoxanthohumolu naopak výrazně klesal od chmelovaru po chmelení při sudování piva. Kromě chmelení při sudování přinesla aplikace homogenátu zeleného chmele zvýšení obsahu xanthohumolu v pivu o přibližně 50 % v porovnání se sušeným chmelem (tab. 6). Vyšší hodnoty isoxanthohumolu u pív s chmelovým homogenátem (o 30 a 16 %) byly stanoveny pouze pro chmelovar.

Obsah 8-prenylnaringenin v pivu (3,7–12,5  $\mu\text{g/l}$ ) byl při aplikaci chmelového homogenátu za varu jen mírně vyšší oproti sušenému chmelu. Pro 6-prenylnaringenin byly přes jeho nižší obsah stanoveny ve chmelovém homogenátu zjištěny výrazně vyšší hodnoty v pivu po aplikaci při chmelovaru, o 118 a 77 % v porovnání se sušeným chmelem (tab. 6). Rovněž při chmelení do vířivé kádě byly pro chmelový homogenát naměřeny vyšší koncentrace 8-PN a 6-PN v pivu.

Chmelení homogenátem zeleného chmele ve výši 20 % z celkové dávky chmele nemělo výrazný negativní či pozitivní vliv na organoleptické vlastnosti piva. Sensorický profil pokusných pív byl při aplikaci chmelového homogenátu do vířivé kádě a při sudování shodný se srovnávacími várkami. Píva chmelená homogenátem za varu byla hodnocena mírně lépe nežli píva chmelená sušeným chmelem. Důvodem mohla ovšem být i nižší hořkost srovnávacích pív (tab. 7).

#### 4 ZÁVĚR A VÝHLED

Vypracovaná nová analytická metoda HPLC-DAD pro simultánní stanovení prenylflavonoidů (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin) a isoflavonoidů (daidzein, genistein, formononetin a Biochanin A) ve chmelu a pivu bude využita při dalším výzkumu a může najít uplatnění při monitorování obsahu



Obr. 5 Chromatogram flavonoidů a prenylflavonoidů ve vzorku piva, UV detekce při 290 nm / Fig. 5 The chromatogram of flavonoids and prenylflavonoids in the sample of beer, UV detection at 290 nm

The content of 8-prenylnaringenin in beer (3.7 to 12.5  $\mu\text{g/L}$ ) was only in the wort boiling application of hops homogenate slightly higher than those in dried hops. For 6-prenylnaringenin were, through his lower level detected in hop homogenate, found out significantly higher levels in beer when applied in wort boiling (about 118 and 77%) in comparison with dried hops (Tab. 6). Also by hopping in the whirlpool tub higher concentrations of 8-PN and 6-PN in beer to hop homogenate were determined.

Hopping by green hop homogenate in a dose of 20% of the total dose of hops had no significant negative or positive impact on the organoleptic properties of beer. Sensory profile of experimental beers was both the application of hops homogenate in the whirlpool tub and by maturation consistent with comparative batches. Beers hopped with the homogenate by boiling was rated slightly better than beers hopped with dried hops. The reason, however, could be even lower bitterness of comparative beers (Tab. 7).

#### 4 CONCLUSIONS AND OUTLOOK

A new developed analytical method SPE-HPLC-DAD for simultaneous determination prenylflavonoids (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin) and isoflavonoids (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) in hops and beer will be used for further research and can find application in the monitoring of the content of bioactive flavonoids in hop raw materials and beer. Method parameters allow satisfactorily evaluate the composition of isoflavonoids and prenylflavonoids in the hop matrix. In the case of beer, the concentration of prenylflavonoids is above

Tab. 7 Výsledky sensorické analýzy pív / Results of the sensory analysis of beers

	I. Série várek / Brewing series				II. Série várek / Brewing series			
	Chmelovar / Wort Boiling				Vířivá kád / Whirlpool		Dokvašování / Secondary fermentation	
	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	Agnus	Agnus	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz	ŽPČ / Saaz
	SO	HT	SO	HT	SO	HT	SO	HT
říz / sharp	2.8	2.9	2.7	2.5	2.8	2.6	2.8	2.7
plnost / fullness	2.9	2.9	2.6	2.7	2.8	2.5	2.8	2.9
hořkost / bitterness	2.5	2.6	2.6	2.7	2.5	2.5	2.8	2.7
doznívání / decay 30s	2.6	2.9	2.7	3.0	2.7	2.7	3.2	3.2
trpkost / astringent	0.8	1.0	0.6	1.4	0.8	0.9	0.9	0.8
sladkost / sweet	0.9	0.9	1.2	0.8	1.0	1.1	0.8	1.2
kyselost / harsh	0.9	1.2	1.3	0.9	0.7	0.9	0.6	0.5
chmelová / hoppy	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	1.7	1.8
ovocná-esterová / fruity-esters	1.3	1.8	1.7	1.3	1.4	1.5	1.4	1.4
celkový dojem / overall impression	4.1	3.7	4.5	4.2	3.7	3.8	3.6	3.5



bioaktivních flavonoidů ve chmelových surovinách a pivu. Parametry metody umožňují uspokojivě zhodnotit složení isoflavonoidů a prenylflavonoidů v chmelové matrici. V případě piva se koncentrace prenylflavonoidů nacházejí nad mezí stanovení, zatímco koncentrace isoflavonoidů většinou leží pod mezí stanovení. Zvýšení množství zpracovávaného vzorku při zachování ostatních parametrů metody teoreticky může vést ke snížení mezí stanovení jednotlivých analytů ve studovaných matricích. Vypracovaná metoda je však limitována účinností kolony určující dostatečné oddělení jednotlivých elučních zón nutné k zachování čistoty (homogeneity) analyzovaných složek. Nesmí tedy docházet ke koelucím s ostatními složkami matrice.

Provedená úvodní studie dopadu chmelení homogenátem zeleného chmele stabilizovaného vysokým tlakem na obsah bioaktivních flavonoidů v pivu ukázala některé výhody homogenátu zeleného chmele oproti chmelu sušenému. Aplikace homogenátu zeleného chmele (20 % alfa kyselin na váru) v poslední dávce chmelení přinesla zvýšení obsahu xanthohumolu a 6-prenylnaringenin v pivu o přibližně 50 % resp. 100 % v porovnání se sušeným chmelem. Aplikace do vířivé kádě zvýšila obsah xanthohumolu a 8-prenylnaringenin v pivu o přibližně 55 % resp. 115 %. S výjimkou výrazného zvýšení hodnoty genisteinu aplikací do vířivé kádě nebyl zjištěn vliv nesusušeného chmele na obsah isoflavonoidů v pivu. Chmelení homogenátem zeleného chmele ukazuje zajímavou možnost přirozeného zvýšení obsahu xanthohumolu v pivu. Výsledky úvodní studie budou ověřeny v dalších pokusech.

#### Poděkování

Tato práce byla podpořena výzkumnými projekty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM6019369701 a Ministerstva zemědělství QI101B090.

#### LITERATURA / REFERENCES

- Adlercreutz, H., 1990: Western diet and Western diseases: Some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50 (Suppl. 201): 3–23
- Adlercreutz, H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Höckerstedt, K. A. V., Vatanabe, S., Hämäläinen, E.K., Markkanen, M.H., Mäkelä, T.H., Wähälä, K.T., Hase, T.A., Fortis, T.: Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* 125, 1995: 757–770
- Analytica EBC, 1998: 5th edition, European Brewery Convention, Carl-Hans Verlag, Nürnberg.
- Čejka, P., Kellner, V., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M., 2002: Moderní metody hodnocení výsledků senzorické analýzy. *Kvasný prum.* 48(5): 114–119.
- Česlová, L., Holčapek, M., Fidler, M., Drštičková, J., Lísa, M., 2009: Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216: 7249–7257.
- Forster, A., Gahr, A., Ketterer, M., Beck, B., Massinger, S. 2002: Xanthohumol in Bier – Möglichkeiten und Grenzen einer Anreicherung. *Monatsschr. Brauwiss.* 55 (9/10): 184–194.
- Foti, P., Erba, D., Riso, P., Spadafranca, A., Criscuoli, F., Testolin, G., 2005: Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 421–427.
- Gerhäuser, C., 2005: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European J. Cancer* 41: 1941–1954.
- Houška, M., Strohalm, J., Krofta, K., Mikyška, A., 2009: Způsob uchování čerstvého chmele. Patent CZ 300164.
- Kellner, V., Jurková, M., Čulík, J., Horák, T., Čejka, P., 2007: Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. *Brewing Science, Jan./Feb.*: 5–10.
- Kondo, K., 2003: Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. *Proceedings of the 29th EBC Congress, Dublin; Contribution* 133.
- Krofta, K., Poustka, J., Hajšlová, J., 2005: Contents of Prenylflavonoids in Czech Hops and Beers. *Acta Horticulturae* 668: 201–206.
- Krofta, K., 2010: Obsah prenylovaných flavonoidů chmele v českých a zahraničních pivech. *Kvasný Prum.* 56(1): 2–9.
- Lapcik, L., Hill, M., Hampl, R., Wähälä, K.T., Adlercreutz, H., 1998: Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 63: 14–20.
- Magalhaes, P.J., Dostalek, P., Cruz, J.M., Guido, L.F., Guido, L.F., Barros, A.A., 2008: The Impact of a Xanthohumol-Enriched Hop product on the behavior of Xanthohumol and Isoxanthohumol in Pale and Dark Beers: A Pilot Scale Approach. *J. Inst. Brew.* 114(3): 246–256.
- determination limit, whereas the concentration of isoflavonoids is usually below the limit of determination. Increasing the amount of sample number while keeping the other parameters the method may theoretically lead to lower limits of determination of analytes in the studied matrices. The elaborated method is limited by the efficiency of the column indicating adequate separation elution zones required to preserve the purity (homogeneity) of analyzed components. It may not occur to co-elution with other matrix constituents.
- Carried out preliminary study of the impact of hopping by green hops homogenate stabilized high pressure on the content of bioactive flavonoids in beer showed some advantages of the green hops homogenate compared to dried hops. Green hops homogenate application (20% of a acids dose) at the last dose of hopping results in increased contents of xanthohumol and 6-prenylnaringenin in beer by approximately 50% and 100% respectively, compared with dried hops. Application into the whirlpool tubs increased content of xanthohumol and 8-prenylnaringenin in beer by approximately 55% and 115% respectively. With the exception of a significant increase in the value of genistein in whirlpool application, an influence of non-dried hops on the isoflavonoids content in beer was not found. Hopping by green hops homogenate shows an interesting possibility of natural increase in content of xanthohumol in beer. In further research the results of preliminary studies shall be verified.

#### Acknowledgements

This study was supported by research project of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic MSM6019369701 and research project of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic QI101B090.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 10. 09. 2012

Přijato k publikování / Accepted for publication: 28. 10. 2012