

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Katedra botaniky a fyziologie rostlin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení antioxidační aktivity extraktů chmele**

**Bakalářská práce**

**Petra Němečková**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Stanovení antioxidantní aktivity extraktů chmele" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.04. 2023 \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Děkuji vedoucímu práce, PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D., za pomoc při vypracování bakalářské práce, za jeho čas a trpělivost, které mi věnoval během konzultací a práce v laboratoři. Závěrem bych poděkovala i své rodině.

# Stanovení antioxidantní aktivity extraktů chmele

## Souhrn

Literární část práce se zabývala chemickým složením chmele. Zejména byly popsány polyfenolické látky, kam patří široké spektrum bioaktivních látek, které vykazují antioxidantní aktivitu a mnoho dalších biologických účinků jako například antibakteriální, antiflogistické, antivirové či antikarcinogenní účinky. Obsažené prenylované flavonoidy, patřící také do polyfenolických látek, mají estrogení aktivitu představující potenciál nového terapeutického řešení ke zmírnění menopauzálních a postmenopauzálních symptomů u žen.

Cílem práce bylo stanovení množství látek extrahovatelných ethanolem v sušených chmelových šišticích u osmi českých odrůd chmele ('Žatecký poloraný červeňák', 'Sládek', 'Agnus', 'Kazbek', 'Harmonie', 'Premiant', 'Vital', 'Saaz Late') dle pokynů Českého lékopisu 2017 a stanovení antioxidantní aktivity těchto odrůd. V experimentální části byl u vybraných odrůd stanoven celkový obsah fenolických látek a flavonoidů pomocí kolorimetrických metod a dále celková antioxidantní aktivita, vyjádřená jako ekvivalent kyseliny askorbové, pomocí fosfomolybdenové metody.

Odrůdy 'Premiant' a 'Harmonie' obsahovaly největší množství fenolických látek a flavonoidů a zároveň vykazovaly největší antioxidantní aktivitu. Naproti tomu u odrůdy 'Kazbek' bylo naměřeno nejmenší množství všech stanovených látek a zároveň se vyznačoval nejmenší antioxidantní aktivitou.

Na základě výsledků korelační analýzy mezi obsahem fenolických látek, flavonoidy a antioxidantní aktivitou bylo zjištěno, že existuje „velmi silná“ lineární závislost antioxidantní aktivity na množství fenolických látek ( $r=0,9431$ ) i na množství flavonoidů ( $r=0,9848$ ) u odrůd 'Premiant', 'Harmonie', 'Agnus', 'Sládek' a 'Vital'.

**Klíčová slova:** *Humulus lupulus*, chmelové šišlice, antioxidantní aktivita, fosfomolybdenová metoda, volný radikál



# Determination of antioxidant activity of hop extracts

## Summary

The literature part of the thesis deals with the chemical composition of hops. It describes polyphenolic compounds, which include a wide range of bioactive substances that exhibit antioxidant activity and many other biological effects such as antibacterial, antiphlogistic, antiviral or anticarcinogenic effects. The contained prenylated flavonoids, which are also polyphenolic substances, exhibit estrogenic activity representing a potential new therapeutic solution for alleviating menopausal and postmenopausal symptoms in women.

The aim of the study was to determine ethanol extractable matter in dried hop cones of eight Czech hop varieties ('Žatecký poloraný červeňák', 'Sládek', 'Agnus', 'Kazbek', 'Harmonie', 'Premiant', 'Vital' and 'Saaz Late') according to the guidelines of the Czech Pharmacopoeia 2017 and to determine the antioxidant activity of these varieties. In the experimental part, the total phenolic and flavonoid content of the selected varieties was determined by colorimetric methods and the total antioxidant activity, expressed as an ascorbic acid equivalent, by the phosphomolybdenate method.

The varieties 'Premiant' and 'Harmonie' contained the highest amount of phenolic compounds and flavonoids and at the same time showed the highest antioxidant activity. On the other hand, the variety 'Kazbek' was contained the lowest amount of all determined substances and at the same time it was characterised by the lowest antioxidant activity.

Based on the results of the correlation analysis between the content of phenolic substances, flavonoids and antioxidant activity, it was found that there is a "very strong" linear dependence of antioxidant activity on the number of phenolic substances ( $r=0,9431$ ) and on the number of flavonoids ( $r=0.9848$ ) in the varieties 'Premiant', 'Harmonie', 'Agnus', 'Sládek' and 'Vital'.

**Keywords:** *Humulus lupulus*, hop cones, antioxidant activity, phosphomolybdenum method, free radical

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Botanická charakteristika chmele otáčivého</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemické složení obsahových látek chmele</b> .....	<b>10</b>
3.2.1	Chmelové pryskyřice.....	12
3.2.2	Chmelové silice .....	13
3.2.3	Polyfenolické látky chmele .....	14
3.2.4	Antioxidanční vlastnosti polyfenolů .....	17
<b>3.3</b>	<b>Odrůdy chmele pěstované v České republice</b> .....	<b>19</b>
3.3.1	'Žatecký poloranný červeňák' .....	20
3.3.2	'Saaz Late' .....	20
3.3.3	'Kazbek' .....	20
3.3.4	'Premiant' a 'Sládek' .....	21
3.3.5	'Harmonie' .....	21
3.3.6	'Agnus' .....	21
3.3.7	'Vital' .....	22
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>23</b>
4.1	Přístroje a pomůcky .....	23
4.2	Rostlinný materiál a příprava vzorků .....	23
4.3	Stanovení celkových fenolických látek.....	24
4.4	Stanovení celkových flavonoidů .....	25
4.5	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	26
4.6	Vyhodnocení dat .....	27
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>27</b>
5.1	Obsah extrahovatelných látek u odrůd chmele.....	27
5.2	Celkový obsah fenolických látek ve chmelových extraktech .....	28
5.3	Celkový obsah flavonoidů .....	28
5.4	Celková antioxidační aktivita .....	30
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>31</b>
6.1	Obsah extrahovatelných látek .....	31
6.2	Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů .....	32
6.3	Celková antioxidační aktivita .....	34
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>38</b>

# 1 Úvod

Chmel (*Humulus lupulus* L.) je důležitou surovinou procesu výroby piva. Dodává pivu hořkost, aroma, chuť a pro své antibakteriální účinky slouží i jako konzervant. V posledních letech bylo zjištěno, že samičí květenství (chmelové šišťice) a další části rostliny (listy, stonky a oddenky) obsahují velké množství biologicky aktivních látek. Lupulinové žlázy chmele vylučují jemný žlutý prášek, tzv. lupulin, který obsahuje pryskyřice (například  $\alpha$ -hořké a  $\beta$ -hořké kyseliny), silice a polyfenolické látky (například prenylflavonoidy). V několika studiích bylo potvrzeno, že chmel vykazuje antioxidační aktivitu. Klíčovou roli v antioxidační aktivitě chmele hrají polyfenolické látky i hořké kyseliny (Zugravu et al. 2022; Karabín et al. 2016).

Metoda stanovení antioxidační aktivity chmele, chmelových výrobků a piva hraje důležitou roli nejen v chmelařských, pivovarských laboratořích, ale i v dalších pracovištích zabývajících se hodnocením chmele a chmelových výrobků. Polyfenolické látky obsažené v chmelu vykazují kromě antioxidační aktivity i mnoho dalších pozitivních účinků jako například, antimutagenní, antikarcinogenní, antiflogistické či antimikrobiální (Mikyška & Krofta 2012).

Zejména prenylované flavonoidy specifické pouze pro chmel mají antioxidační účinky, proto jsou velmi důležitými látkami pro člověka, a jsou tak předmětem zkoumání této práce. Od roku 2006 je prováděno šlechtění na zvýšení obsahu těchto látek pro farmaceutické účely. Pro své cenné látky chmel nachází využití nejen v potravinářském, ale i farmaceutickém a kosmetickém průmyslu (Nesvadba 2010).

## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je stanovení a porovnání celkové antioxidační aktivity ethanolových extraktů u osmi odrůd chmele ('Žatecký poloraný červeňák', 'Sládek', 'Agnus', 'Kazbek', 'Sládek', 'Harmonie', 'Premiant', 'Vital', 'Saaz Late'). Teoretická část práce se zabývá problematikou antioxidantů, mechanismu antioxidační aktivity a popisuje látky obsažené ve chmelových šišticích a charakterizuje testované odrůdy chmele. V experimentální části se práce zaměřuje na stanovení obsahu extrahovatelných látek a na vlastní měření celkové antioxidační aktivity u jednotlivých odrůd pomocí fosfomolybdenanové metody.

### Hypotézy

Nulová hypotéza: Neexistuje rozdíl v obsahu extrahovatelných látek a sledované antioxidační aktivitě mezi stanovovanými odrůdami.

Alternativní hypotéza: Mezi stanovovanými odrůdami chmele bude alespoň jedna, která se obsahem extrahovatelných látek anebo antioxidační aktivitou bude lišit.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Botanická charakteristika chmele otáčivého

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) patří dle systematického botanického zařazení do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) (Nesvadba et al. 2013). Anglický obecný název hop pochází z anglosaského jazyka hoppan, což znamená šplhat. Původ názvu *Humulus* se předpokládá, že pochází od humusu, bohaté vlhké půdy, v níž rostlina roste. *H. lupulus* je vytrvalá dvoudomá liánovitá bylina, jejíž nadzemní část je jednoletá, zatímco kořenová část je vytrvalá a vytváří adventivní kořeny každý rok, tzv. mladé dřevo. Kořenovou soustavu tvoří zdřevnatělá babka (staré dřevo s letokruhy) dosahující hloubky 10-30 cm, která má průměrnou životnost 25 let. Po stranách babky vyrůstají každoročně postranní oddenky nazývané vlky, sloužící k vegetativnímu rozmnožování. Šestihránná lodyha (réva) dorůstá šesti až devíti metrů, a od asi 50 cm výšky se začíná pravotočivě vinout (Zanoli & Zavatti 2008; Bednářová 2015).

Réva porostlá drsnými háčkovitými chloupky má vstřícné řapíkaté listy s rozličnými tvary od srdčitého až po trojlaločný. Postranní větévky zvané pazochy vyrůstají z révy a na nich se vyvíjí květenství samčí nebo samičí. Žluté drobné květy vyrůstají v úžlabních nebo vrcholových latách. Doba květu je 15-30 dnů, po odkvetení se květy mění ve zploštělou nažku. Samičí květenství jsou převislé šišťice neboli hlávky, nejprve jsou světle zelené, později žluté, neboť jsou pokryté zlatožlutými lupulinovými žlázkami. Květonosné větévky se samičími květenstvími (tzv. osýpkou) vyrůstají u paty révových, a hlavně pazochových listů od poloviny června. Na chmelnicích se pěstují pouze samičí rostliny, které se sklízí a používají v pivovarském průmyslu. Chmelové hlávky se skládají ze stopky, vřetenka, pravých a krycích listů, na jejichž bazální části se tvoří lupulinové žlázy (Obrázek 1). Z každého článku vřetenka vyrůstají 2 listeny krycí a 4 listeny pravé. Za každým pravým listenem se v době květu chmele (osýpka) vytvoří semeník se 2 nitkovitými bliznami (Kavalier et al. 2011).

Hlávky dorůstají délky od 15 do 35 mm, mají převážně kulovitooválně vejčitý tvar, popř. tvar kuželovitý nebo hranolovitý, každá odrůda chmele se odlišuje tvarem chmelové hlávky (Nesvadba et al. 2013).



Obrázek 1: Stavba chmelové hlávky (Sun et al. 2022)



Obrázek 2: Lupulinové žlázy nacházející se na pravém listenu (Sun et al. 2022)

### 3.2 Chemické složení obsahových látek chmele

Uvnitř chmelových šištic v lupulinových žlázkách jsou koncentrovány biologicky aktivní látky, které jsou technologicky a ekonomicky významné složky pro pivovarnictví. Až 98 % celosvětově vyprodukované úrody chmele se využívá v pivovarnictví. Největšími producenty chmele na světě jsou Německo, Spojené státy americké a Česká republika (Prugar 2008). Z chmele bylo identifikováno více než 1000 fytochemikálií. Nejčastěji využívanou částí chmele jsou kuželovité samičí útvary zvané strobily – „šištice“. Po dozrání chmele se vylučuje z drobných lupulinových žlázek (Obrázek 2) jemný žlutý pryskyřičný prášek zvaný lupulin, vylučovaný pouze samičími šišticemi (Teghtmeyer 2018). V lupulinu se kumulují sekundární bioaktivní látky (nevýživné látky, sloužící jako obrana rostliny před vnějšími vlivy), dávající chmelu charakteristickou vůni a chuť. Sekundární metabolity lze zde rozdělit do tří skupin – chmelové pryskyřice, silice a polyfenolické látky (Schéma 1) (Korpelainen & Pietiläinen 2021). Další zastoupení průměrného množství primárních i sekundárních metabolitů a dalších látek obsažených v šišticích chmelu je znázorněno v Grafu 1.

Množství sekundárních metabolitů a dalších biochemických látek závisí na několika faktorech: na genotypu, fázi zrání, klimatických podmínkách, posklizňové zpracování na výrobky, přístupu vzduchu a světla (Almaguer et al. 2014).

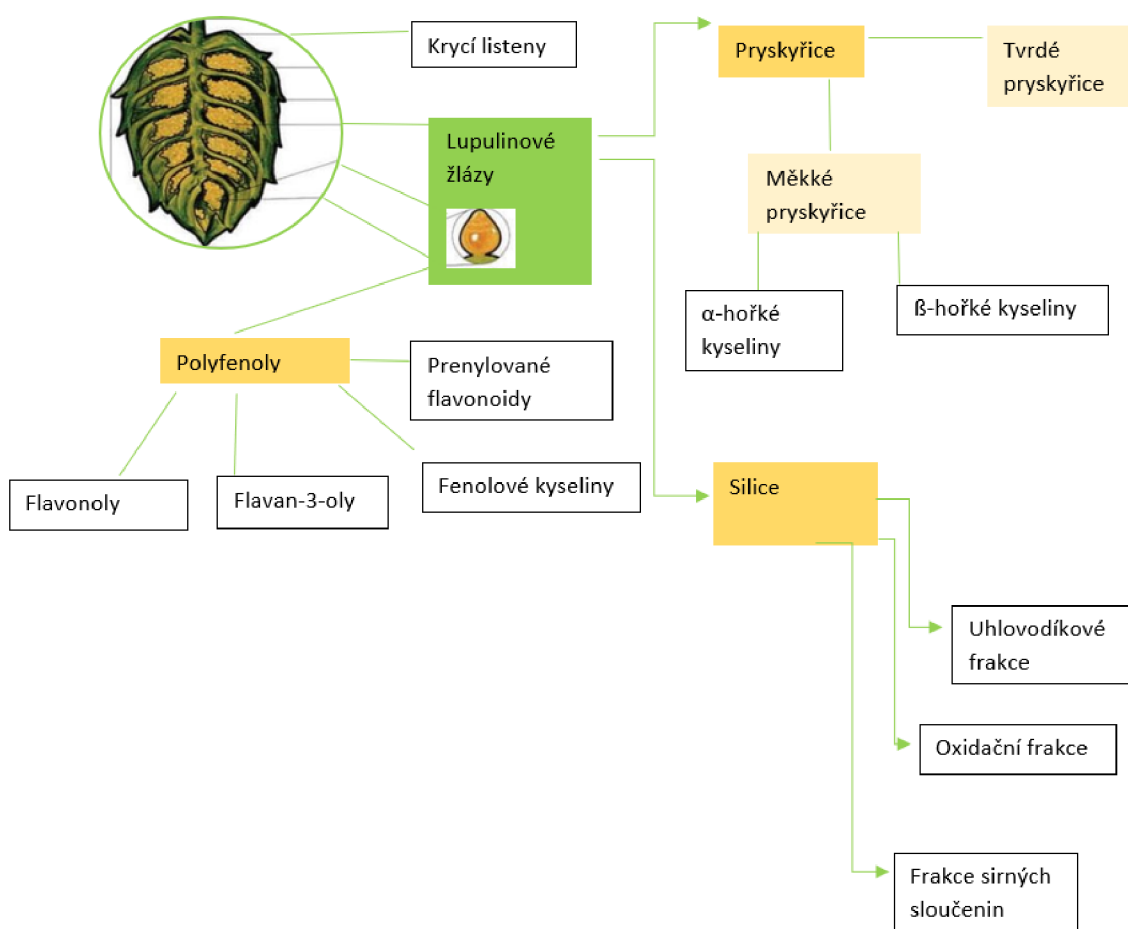
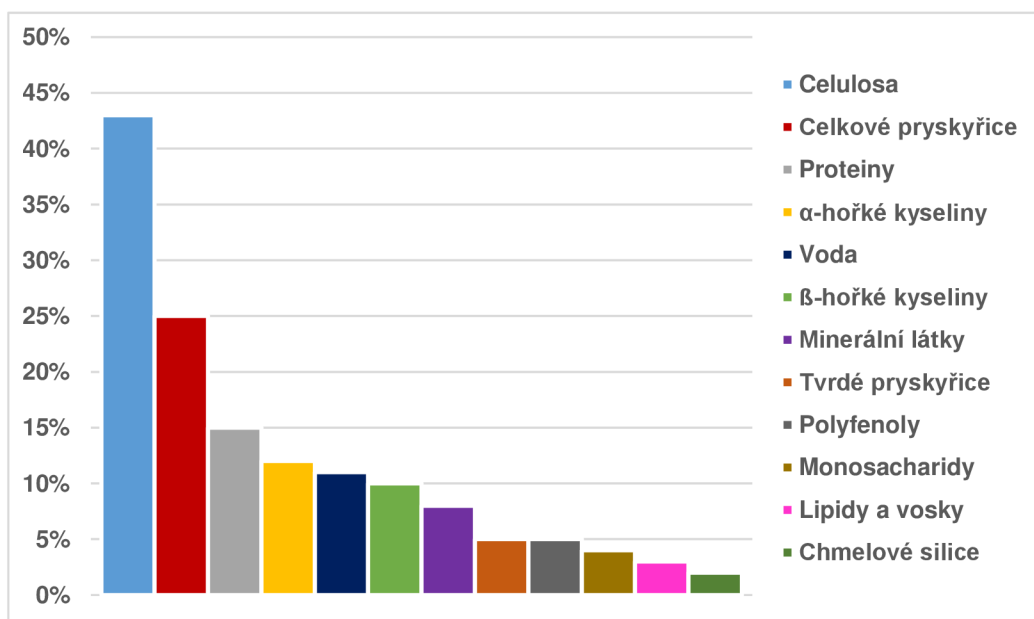


Schéma 1: Sekundární metabolity chmele

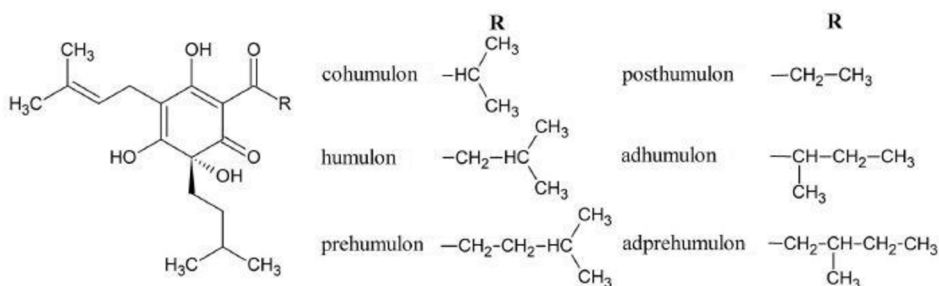


Graf 1: Průměrné zastoupení metabolitů v šišticích chmele (Biendl 2009; Basařová et al. 2021)

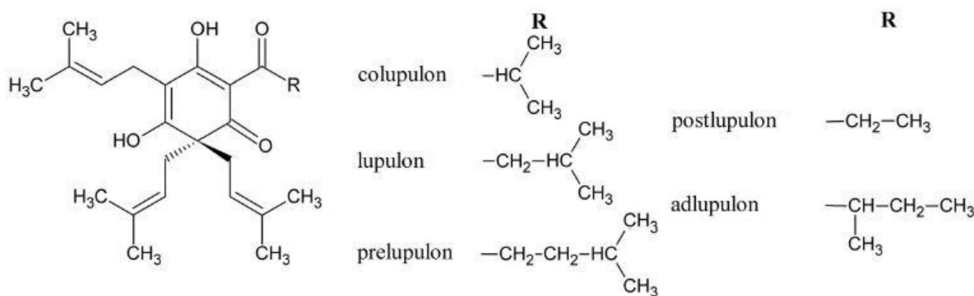
### 3.2.1 Chmelové pryskyřice

Chmelové pryskyřice patří k nejdůležitějším složkám chmele, představují 10-30 % hmotnosti sušiny šišťice, a lze je rozpustit v methanolu nebo diethyletheru. Pryskyřice se dělí na základě jejich další rozpustnosti v hexanu na měkké a tvrdé pryskyřice. Mezi tvrdé pryskyřice ( $\gamma$ -pryskyřice), které nejsou rozpustné v hexanu, patří především oxidační produkty z měkkých pryskyřic vznikajících během zrání, skladování a zpracování chmelových šišťic. Mnoho tvrdých pryskyřic se skládá z prenylflavonoidů a ve srovnání s měkkými pryskyřicemi je obsah tvrdých pryskyřic v celkové hmotnosti sušeného chmele nižší, pohybuje se mezi 3 a 25 %. Měkké pryskyřice (9-27,5 % sušiny) zahrnují  $\alpha$ -hořké kyseliny (humulony) dodávající hořkou chuť piva a  $\beta$ -hořké kyseliny (lupulony) (Karabín et al. 2016).

Složkami chmelových pryskyřic jsou  $\alpha$ -hořké kyseliny,  $\beta$ -hořké kyseliny.  $\alpha$ -hořké kyseliny představují směs chemických analogů, mezi hlavní patří humulon, kohumulon a adhumulon, dále potom posthumulon, prehumulon (Obrázek 3). Jejich poměry jsou u jednotlivých odrůd odlišné. Při izomeraci, během vyšších teplot při varu sladiny s chmelem, z každého analogu  $\alpha$ -hořkých kyselin vzniká *trans*- a *cis*-stereoizomer iso- $\alpha$ -hořké kyseliny (Zhang et al. 2021). Tyto iso- $\alpha$ -hořké kyseliny zajišťují 85% hořkost piva. Produktem oxidace  $\alpha$ -hořkých kyselin při sušení a skladování chmele jsou humulinony. Humulinové kyseliny jsou konečným produktem degradace (hydrolyzy)  $\alpha$ -hořkých kyselin (Basařová et al. 2021). Skupinu  $\beta$ -kyselin tvoří směs analogů jako je lupulon, kolupulon, adlupulon, prelupulon (Obrázek 4). Při vaření piva se ztrácejí, a tak se na hořkosti piva nepodílejí. Během skladování klesá podíl měkkých pryskyřic, zatímco podíl tvrdých pryskyřic stoupá (Almaguer et al. 2014).



Obrázek 3: Chemická struktura hlavních analogů  $\alpha$ -hořkých kyselin (Karabín et al. 2016)



Obrázek 4: Chemická struktura hlavních analogů  $\beta$ -hořkých kyselin (Karabín et al. 2016)



Hořké kyseliny ( $\alpha$  a  $\beta$ ) vykazují silné antimikrobiální účinky. Prostupují přes membrány bakteriálních buněk a inhibují důležité životní pochody bakterií. Inhibují růst především gram-pozitivních bakterií jako např. *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, což jsou patogeny podporující zánět kůže (Weber et al. 2019). Díky hydrofobnímu charakteru jsou  $\beta$ -hořké kyseliny schopné narušovat bakteriální buněčné membrány. Proti hlavním bakteriím, které hořké kyseliny působí, jsou především *Bacillus subtilis*, *Pediococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus ssp*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* atd. Mimo jiné také inhibuje růst *Lactobacilla spp.*, což je hlavní kontaminant piva, který by jinak ovlivňoval výkonnost kvasinek (Zhang et al. 2021). Přítomností isoprenylového postranního řetězce na aromatickém jádře způsobující nerozpustnost ve vodě, proto je jejich antibakteriální aktivita vyšší než u  $\alpha$ -kyselin. Bylo prokázáno, že několik orálních bakterií (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* a *Streptococcus salivarius*) jsou účinněji inhibovány  $\beta$ -kyselinami než běžnými ústními vodami (Bhattacharya et al. 2003; Sun et al. 2022).

Jiná studie prokázala inhibiční účinky chmele na kmeny bakterie *Helicobacter pylori* izolované od pacientů se žaludečními vředy. Získané výsledky naznačují, že chmel může být používán jako doplněk nebo dokonce alternativa k antibiotikům při léčbě infekcí způsobených touto bakterií (Čermák et al. 2015).

Hořké kyseliny vykazují potencionální protinádorovou aktivitu, tím, že inhibují proces tvorby nových kapilár – angiogeneze, indukci apoptózy rakovinotvorných buněk. (Olšovská et al. 2016).

### 3.2.2 Chmelové silice

Silice je směsí více než 200 vonných těkavých sloučenin jako sekundárních metabolitů chmele vylučovaných lupulinovými žlázami. Tvoří jen malou část rostliny chmele 0,5 - 3,0 % hmoty (Prugar 2008). Jsou velmi důležité pro svůj aromatický charakter využívaný v pivovarnickém, parfumérském a kosmetickém průmyslu. V současné době se rozlišují tři hlavní chemické skupiny silic, jako jsou uhlovodíkové frakce, kyslíkaté frakce a frakce sirných sloučenin. Do uhlovodíků s největším podílem v čerstvém chmelu (70-80 % z celkové hmotnosti silic) patří alifatické uhlovodíky, monoterpeny ( $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, geraniol, ocimen, linalool,  $\beta$ -myrcen, limonen) a seskviterpeny (Karabín et al. 2016). Mezi hlavní seskviterpenové složky patří  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -karyofylen,  $\beta$ -farnesen. Tyto sloučeniny jsou velmi těkavé a snadno podléhají oxidaci a polymeraci. Poměr mezi monoterpeny a seskviterpeny jsou dány genomem jednotlivých odrůd chmele. Pro jemné odrůdy žateckých aromatických chmelů je typický nízký obsah myrcenu, který je nositelem drsného štiplavého aromatu (Basařová et al. 2021). Na rozdíl od  $\beta$ -myrcenu,  $\alpha$ -humulenu a  $\beta$ -karyofylenu se  $\beta$ -farnesen vyskytuje pouze v některých chmelech a obvykle v malém množství (Almaguer et al. 2014).

Kyslíkaté (oxidované) frakce chmelových silic vznikají během zrání, zpracování a skladování chmele. Celková oxidovaná frakce je složitá směs aromatických alkoholů, aldehydů, kyselin, ketonů, epoxidů a esterů mastných kyselin. Nejhojněji zastoupenými terpenovými alkoholy je linalool, geraniol a nerol. V průběhu skladování se ve chmelu zvyšuje obsah alkoholů a epoxidů, které vznikají oxidačními přeměnami seskviterpenů.

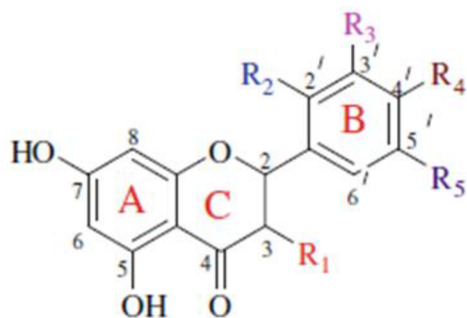
Většina silic se ztrácí při chmelovaru a při kvašení (Prugar 2008). Aldehydy jsou obvykle přítomny v nízkých koncentracích, ale (Z)-3-hexenal je vedle myrcenu a linaloolu jednou z nejvíce pachově aktivních sloučenin, které se nacházejí v čerstvém chmelu. Během sušení se však většinou ztrácí. Frakce sirných sloučenin je ve chmelových silicích v malém množství okolo 0,1 %. Vyskytují se v podobě terpenových sulfidů, polysulfidů a thioesterů (Rutnik et al. 2022).

### 3.2.3 Polyfenolické látky chmele

Polyfenoly jsou širokou skupinou biologicky aktivních sekundárních metabolitů, jejichž obsah závisí na odrůdě chmele a na klimatických podmínkách. Polyfenoly mají v chemické struktuře společný aromatický kruh s nejméně dvěma hydroxylovými skupinami. Největší obsah polyfenolů je v listenech, chmelové šišťice obsahující 4 až 14 % těchto látek v sušině (Abram et al. 2015).

Základní strukturou flavonoidů, patřících do polyfenolů, je flavanové jádro, které se skládá z 15 atomů uhlíku uspořádaných do 3 kruhů označovaných A, B, C (Obrázek 5). Přítomnost dvojně vazby mezi uhlíkem a kyslíkem na pyranovém kruhu C slouží jako základ jejich bioaktivity. Substituce kruhů C, B hydroxylovými skupinami odlišuje jednotlivé členy každé třídy (viz Tabulka 1) (Gülçin 2012).

Chmelové polyfenoly lze rozdělit na flavonoly, flavan-3-oly (katechiny), fenolové kyseliny a ostatní polyfenolické sloučeniny (prenylflavonoidy, multifidolové glukosidy) (Karabín et al. 2016). Ve chmelu jsou přítomné jak samotné aglykony, tak jejich glykosidy, u kterých je nejčastěji cukernou složkou D-glukosa a L-rhamnosa. Mají antibakteriální, antifungicidní účinky. Ve chmelu byly zejména prokázány především glykosidy kvercetinu (jako je kvercetin-3 $\beta$ -D-glukopyranosid) a kaemferolu (kaemferol-3-D-gluko-6,1- $\alpha$ -rhamnopyranosid). Množství těchto glykosidů závisí na odrůdě a místě pěstování. Jemné aromatické chmele jako 'ŽPČ' mají nižší hodnotu poměru kaemferolu ke kvercetinu. Fenolové kyseliny jsou zastoupeny ve chmelu jako deriváty kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny kávové, kyseliny chlorogenové, kumarové nebo felurové. Antioxidační aktivita fenolických kyselin a jejich jejich derivátů závisí na počtu a poloze jednotlivých hydroxylových skupin navázaných na aromatický kruh, vazebném místě, vzájemné poloze hydroxylových skupin v aromatickém kruhu a typu substituentů. Hydroxylová skupina v poloze -ortho nebo -para zvyšuje antioxidační aktivitu fenolických sloučenin (Karabin et al. 2015).



Obrázek 5: Struktura flavonolů (Gülçin 2012)

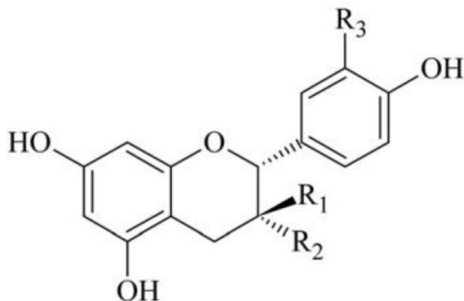
Tabulka 1: Substituce kruhů C, B hydroxylovými skupinami

Flavonoly	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Quercetin	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
Kaemferol	OH	H	H	OH	H

Nejhojněji zastoupenými flavonoly ve chmelu jsou kvercetin, myricetin a kaemferol (Tabulce 1). Obě sloučeniny lze nalézt nejen ve chmelu, ale i v různých druzích ovoce a zeleniny. Kvercetin, kaemferol a myricetin mají významné antikarcinogenní účinky, zejména kvercetin inhibuje nádorový buněčný cyklus, apoptózou nádorových buněk (Chen & Chen 2013).

Z flavan-3-olů vynikají (+)-katechin, (-)-epikatechin a (+)-gallokatechin (Obrázek 6), rozdíly struktur těchto tří flavan-3-olů jsou uvedeny v Tabulce 2. Tvoří převážnou část chmelových polyfenolů (3 až 6 % v sušině).

Kromě polyfenolů chmelové šišťice obsahují prenylflavonoidy a multifidolové glykosidy (deriváty floroglucinolu s prenylovou skupinou), které se vyskytují výhradně ve chmelu. Chmelové multifidoly vykazují protizánětlivou aktivitu i velký antikarcinogenní potenciál (Biendl 2009; Karabín et al. 2016; Bohr et al. 2005)



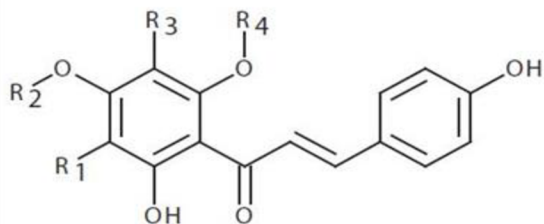
Obrázek 6: Struktura flavan-3-olů (Karabín et al. 2015)

Tabulka 2: Substituce na pyranovém kruhu struktury jednotlivých flavan-3-olů

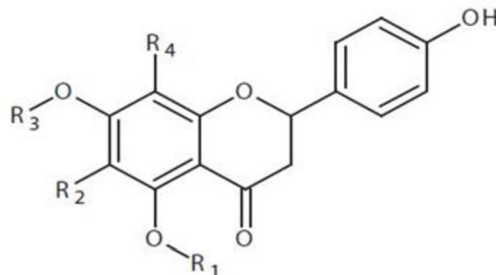
Flavan-3-oly	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Katechin</b>	OH	H	OH
<b>Epikatechin</b>	H	OH	OH
<b>Gallokatechin</b>	OH	H	OH

Rostliny chmele biosyntetizují a sekretují prenylflavonoidy lupulinovými žlázkami spolu s chmelovými pryskyřicemi a silicemi. Mezi prenylflavonoidy ve chmelu patří skupina chalkonů jako xanthohumol (XN), desmethylxanthohumol (DMX) (Obrázek 7), přítomných v lupulinových žlázkách chmele. Odlišnosti struktur XN a DMX jsou uvedeny v Tabulce 3.

### Chalkony



### Flavanony



Obrázek 7: Struktura prenylflavonoidů (Nešpor et al. 2017)

Tabulka 3: Substituce struktury jednotlivých prenylflavonoidů

Chalkony	Prenylflavanony
R <sub>1</sub> =prenyl (3-methylbut-2-en-1-yl) R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =CH <sub>3</sub> <b>Xanthohumol</b>	R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =prenyl <b>Isoxanthohumol</b>
R <sub>1</sub> =prenyl R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H <b>Desmethylxanthohumol</b>	R <sub>1</sub> =H R <sub>2</sub> =prenyl R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H <b>6-prenylnaringenin</b>
-	R <sub>1</sub> =H R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =prenyl <b>8-prenylnaringenin</b>

Ačkoli je xanthohumol hlavní sloučeninou tvrdých chmelových pryskyřic, v pivu se ho vyskytuje pouze stopová množství, protože při zpracování, skladování chmele nebo během zpracování vysokými teplotami během vaření piva, dochází k izomerizačním reakcím. Během nich xanthohumol izomeruje na isoxanthohumol a desmethylxanthohumol na směs flavanonů 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin (8-PN) (rozdíly ve struktuře těchto látek jsou zaznamenány v Tabulce 3), obvyklý poměr je 3:2 ve prospěch 6-prenylnaringenin. Během procesu vaření piva dochází tedy k tepelné izomerizaci chalkonů na flavanony (Nešpor et al. 2017).

Prenylované flavonoidy mají protizánětlivé, protivirové a antikarcinogenní účinky. XN inhibuje genovou expresi enzymu cyklooxygenasy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy 2 (COX-2), zajišťující přeměnu arachidonové kyseliny na prostaglandiny, a tím brání rozvoji zánětu. Protizánětlivé vlastnosti flavonoidů mohou přispívat i k omezení rozvoje nádorového onemocnění prostřednictvím inhibice signalizace (NF-κB - nukleárního transkripčního faktoru kappa beta), který slouží k expresi genů kódujících proteiny, které se podílejí na vzniku prozánětlivých faktorů. V několika studiích bylo prokázáno, že prenylflavonoidy (xanthohumol a isoxanthohumol) jsou schopny inhibovat nadměrnou tvorbu oxidu dusnatého, přímou inhibicí syntézy oxidu dusnatého (iNOS) (Paoletti et al. 2009).

Prenylované flavonoidy, jako jsou 8-PN a XN, mají potenciál inhibovat enzymy cytochromu P450, zejména členů rodiny CYP2C a CYP1A2, přeměňující prokarcinogeny v karcinogenní sloučeniny. Naopak XN aktivuje karcinogen-detoxifikační enzym chinonreduktasu. Tento enzym chrání buňky proti toxickým xenobiotikům tím, že redukuje chinony na hydrochinony, které se v těle savců snadněji odbourávají (Yuan et al. 2014).

Estrogenní potenciál prenylovaných flavonoidů z chmele představuje nové terapeutické řešení ke zmírnění menopauzálních a postmenopauzálních symptomů u žen (Liu et al. 2015). Za jeden z nejúčinnějších dosud izolovaných fytoestrogenů je považován 8-PN, který má schopnost stimulovat diferenciaci osteoblastů v kostní tkáni a inhibovat aktivitu osteoklastů. Tím tak může zabránit osteoporóze. Mechanismus účinku spočívá v aktivaci estradiolových receptorů (ER), jež jsou známy ve dvou subtypech: typ  $ER\alpha$  (převládá v kostní tkáni) a  $ER\beta$  (převládají v tukové tkáni, v endoteliálních buňkách, mozku, v ledvinách a prostatě). Estrogenní aktivita 8-PN spočívá především na jeho podobné chemické struktuře se steroidními hormony. 8-Prenylnaringenin má větší afinitu od ostatních fytoestrogenů k estrogennímu receptoru  $ER\alpha$ . Aplikace 8-PN ve formě chmelového extraktu v léčbě menopauzy byla klinicky zkoumána se slibnými výsledky a je možné budoucí použití v léčbě menopauzálních a postmenopauzálních symptomů (Štulíková et al. 2018; Tronina, 2020).

Acylfloroglucinol 1-[(2-methylbutyryl)-floroglukinyl]- $\beta$ -D-glukopyranosid známý pod triviálním názvem multifidolový glukosid také vykazoval protizánětlivé účinky (Bohr et al. 2005).

### 3.2.4 Antioxidační vlastnosti polyfenolů

Oxidace je přenos elektronů z jednoho atomu na druhý a představuje nezbytnou součást aerobních procesů metabolismu v organismu, protože kyslík je konečný produkt v systému toku elektronů, který produkuje energii ve formě ATP (Halliwell 1996). Buňky udržují hladinu ROS (Reactive Oxygen Species) pomocí antioxidantů, například glutathionu (GSH), a enzymů, jako je kataláza a superoxidodismutáza. Pokud je tato rovnováha narušena, může dojít k narušení buněčné obrany. Problém nastává, když se řízený tok (přenos) elektronů přeruší a začnou vznikat volné radikály s nepárovými elektrony ve vnějším orbitalu. Volné radikály jsou vysoce reaktivní, protože aktivně hledají elektron, který by stabilizoval molekuly. Volné radikály mohou vznikat z různých zdrojů, které lze klasifikovat jako endogenní (energetický metabolismus, záněty) a exogenní zdroje (cigaretový kouř, znečištěné životní prostředí, radioaktivita, UV záření atd.) (Madhavi et al. 1995).

Oxidační stres nastává při nerovnováze mezi produkcí volných radikálů a antioxidačními schopnostmi organismu, které bojují proti reaktivním formám kyslíku a dusíku. Stres přispívá k rozvoji chronických civilizačních onemocnění (kardiovaskulární, neurodegenerativní a nádorová onemocnění). ROS jako jsou hydroxylové, superoxidové, hydroperoxidové radikály, ale i singletový kyslík nebo peroxidové anionty, jsou tedy běžně produkovány během fyziologických dějů a způsobují oxidativní poškození nukleových kyselin, polynenasycených mastných kyselin a lipidů, proteinů a sacharidů, v buňkách (Gülçin 2012).

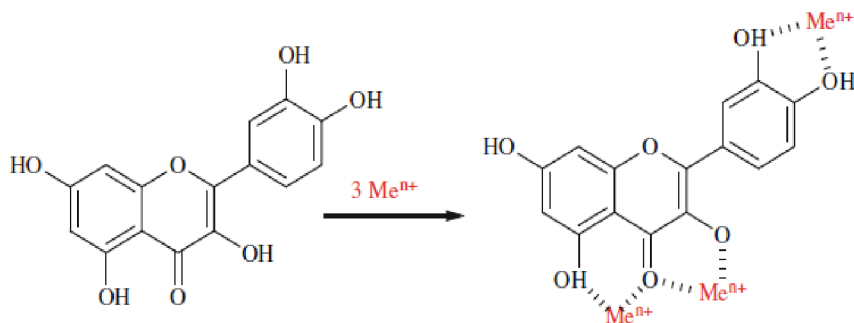
Prenylflavonoidy chmele xanthohumol (XN) a 8-PN jsou silné antioxidanty schopné vychytávat a potlačovat vznik ROS (hydroxylového, hydroperoxylového, superoxidového radikálů, singletový kyslík) a RNS (Reactive Nitrogen Species) (peroxynitritových radikálů), a tím přispívají ke snížení oxidačního stresu (Musialik et al. 2009; Karabin et al. 2015).

Antioxidační aktivita flavonoidů je dána jejich chemickou strukturou, zejména hydroxylací aromatických kruhů. Bylo prokázáno, že rozhodující roli hrají hydroxylové skupiny na pozici „C3“ a „C4“ v B-kruhu, přítomnost hydroxylových skupin v pozici „C3“

spolu s dvojnou vazbou 4-oxo skupiny na C-kruhu a dále navázáním hydroxylových skupin na A-kruhu v pozici „C7“ a „C5“ (Obrázek 5). Flavonoidy s volnými hydroxylovými skupinami působí jako lapače volných radikálů a více hydroxylových skupin, zejména v kruhu B, zvyšují jejich antioxidační aktivitu. Kvercetin má na všech těchto pozicích navázány hydroxylové skupiny, a proto poskytuje vyšší antioxidační účinek než kaemferol a myricetin (Gulcin 2020; Resende et al. 2014).

Flavonoidy s volnými hydroxylovými skupinami působí jako „lapače“ volných radikálů a více hydroxylových skupin, zejména dvou hydroxylových skupin v ortho pozici kruhu B, zvyšují jejich antioxidační aktivitu. Hydroxyly v kruhu B jsou primárními aktivními místy přerušení oxidačního řetězce. Flavonoidy v roli antioxidantů vystupují v lidském organismu jako redukční činidla redukující reaktivní formy kyslíku několika mechanismy, například poskytnutím vodíkového atomu nebo jednoho elektronu s následným přenosem protonu. Antioxidační účinky polyfenolů se vyznačují také tím, že potlačují některé specifické enzymy, které se podílejí na vzniku reaktivních forem kyslíku jako je například enzym NADPH oxidáza, cyklooxygenázy, lipoxygenázy, mikrosomální monooxygenáza, glutathion S-transferáza nebo mitochondriální sukcinoxidáza (Mladěnka et al. 2010).

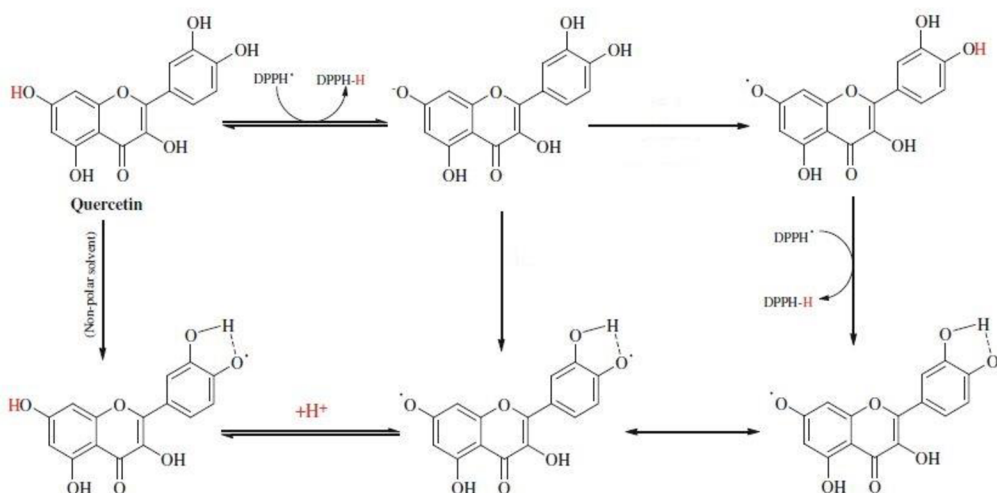
Řada flavonoidů účinně chelatuje stopové kovy (ionty železa a mědi), které se podílejí se na produkci volných radikálů. Volné železo a měď jsou potenciálními zesilovači reaktivního kyslíku, který zapříčiňuje oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), a tím se podílí i na rozvoji aterosklerózy. Flavonoidy chelatací těchto kovů zabraňují jejich katalytickým účinkům. Na obrázku 8 jsou znázorněná vazebná místa flavonoidové struktury, na které se chelátovou vazbou navážou kovy (Pietta 2000).



Obrázek 8: Chelátová vazba flavonoidů (Gülçin 2012).

Přenos elektronu z flavonoidního aniontu na radikál je dalším možným mechanismem známý jako sekvenční přenos elektronů s úbytkem protonu (Sequential proton loss electron transfer – SPLET). Hydroxylová skupina na „C7“ ve flavonoidech hraje důležitou roli jako místo ionizace a přenosu elektronů z flavonoidního aniontu na radikál. Průběh reakce, kde se volný radikál díky tomuto mechanismu stabilizuje, je znázorněn na obrázku 9 (Musialik et al. 2009).





Obrázek 9: Reakce kvercetinu s DPPH radikálem (Gülçin 2012)

### 3.3 Odrůdy chmele pěstované v České republice

V České republice má pěstování chmele bohatou tradici, již ve 14. století za panování císaře Karla IV. došlo k rozkvětu chmelařství. Už v této době byla proslulá krajina žatecko-rakovnická. Bylo zahájeno i první opatření podporující ochranu proti vývozu sadby žateckého chmele pod hrozbou smrti. Další rozmach nastal za vlády Marie Terezie, kdy se dále navyšoval počet pivovarů a ploch chmelnic. V letech 1750 až 1769 byla ustanovena právní ochrana proti falšování českých chmelů a nařízeno známkování patenty vydanými císařovnou Marií Terezií (1717-1780). Důležitým opatřením proti negativním jevům v rozvíjejícím pivovarnictví a obchodu bylo založení v roce 1884 Znamkovny chmele v Žatci. Dnes je žatecký chmel zapsán do produktů chráněného označení původu (CHOP) (Obrázek 10). Dne 8. května 2007 dle Nařízení Komise č. 503/2007 bylo označení Žatecký chmel zapsáno do Rejstříku chráněných označení původu a chráněných zeměpisných označení (*Český chmel* 2010). Označením Žatecký chmel může být označen pouze jemný aromatický chmel 'Žatecký poloraný červeňák' vypěstovaný v Žatecké chmelařské oblasti (Hejda & Kovařík 2000).

V České republice se chmel pěstuje ve třech chmelařských oblastech na Žatecku, Ústěcku v Čechách a na Tršicku na Moravě. Sklizňová plocha chmelnic se oproti roku 2021 snížila o necelých 29 hektarů. K datu 20. 8. 2022 evidoval Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) 4 943 hektarů chmelnic v České republice ("Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský" 2022).



Obrázek 10: Chráněné označení původu

### 3.3.1 'Žatecký poloranný červeňák'

'Žatecký poloranný červeňák' (ŽPČ) je charakteristický velmi vysokým obsahem polyfenolických antioxidantů (Krofta et al. 2008). Výrazným znakem je jemná a ušlechtilá chmelová vůně, která je dána jedinečnou skladbou chmelových silic. Obsah chmelových silic se vyznačuje poměrně nízkým obsahem myrcenu a karyofylenu a zároveň vysokým zastoupením  $\beta$ -farnesenu (15-20 % relativního obsahu sekundárních metabolitů – % rel.), což je určujícím znakem pro 'ŽPČ'. Dále je typické, že má vyrovnaný poměr  $\alpha$  a  $\beta$  hořkých kyselin (Nesvadba et al. 2013). Práce chmelařského výzkumu v České republice, od roku 1927, je zaměřena na zušlechťování českého chmele. Zásadní význam pro české chmelařství mají výsledky šlechtitelské práce doc. Karla Osvalda. Klony, které byly registrovány v roce 1952 pod označením Osvaldovy klony 31, 72 a 114, doposud patří mezi nejvýznamnější odrůdy, které zaujímají stále převážnou část osázených ploch ve všech chmelařských oblastech. Tyto hospodářsky významné odrůdy jsou známy pod názvem 'Žatecký poloranný červeňák' nebo také jako „žatecký chmel“ (Nesvadba et al. 2012).

### 3.3.2 'Saaz Late'

Odrůda 'Saaz Late' geneticky patří do skupiny evropských aromatických odrůd skupiny 'ŽPČ', který je výrazně zastoupen v jejím původu. Réva fialové barvy má mohutný vzrůst, plodonosné pazochy jsou velmi dlouhé. Chmelové hlávky jsou středně vejčité, na pazochu velmi hustě nasazené. 'Saaz Late' je polopozdní odrůda s vegetační dobou v rozmezí 128-135 dní. Odrůda je velmi citlivá na zastínění, proto se doporučuje vysazovat do větších sponů. Odolnost k peronospoře chmelové (*Pseudoperonospora humuli*) je střední, k padlí chmelovému (*Sphaerotheca humuli*) je vysoká až tolerantní. Česatelnost odrůdy 'Saaz Late' patří k těm horším v důsledku hustě nasazených drobných hlávek (Mikyška et al. 2013; Nesvadba et al. 2013).

'Saaz Late' obsahuje silice jako isobutylisobutyrát, 2-methylbutylisobutyrát a 3-methylisobutyrát. 'ŽPČ' tyto složky silic neobsahuje vůbec nebo jen v nepatrném množství. Díky tomu je možno odrůdy 'Saaz Late' a 'ŽPČ' snadno vzájemně odlišit. Celkový obsah a složení sekundárních metabolitů odrůdy 'Saaz Late' lze považovat za velmi podobný 'ŽPČ' (Krofta & Patzak 2011).

### 3.3.3 'Kazbek'

Z křížení odrůdy chmele 'Bor' a samčích chmelů původem z Ruska byla v roce 1984 vyšlechtěna odrůda Kazbek (pojmenovaná podle nejvyšší hory severního Kavkazu). Rostlina má velmi velký habitus válcovitého tvaru. Borka je červenozelené barvy. Plodonosné pazochy jsou velmi dlouhé až 2 m. Chmelové šišťice mají protáhlý tvar, špičky krycích listenů jsou odkloněné od chmelové hlávky. 'Kazbek' je pozdní odrůda, která se vyznačuje dobou vegetace v rozmezí 134-141 dnů. Je tolerantní k primárním i sekundárním infekcím padlím (*P. humuli*) a moučce plísní (*S. humuli*). Chmelová silice odrůdy 'Kazbek' obsahuje několik unikátních složek, homologickou řadu esterů geraniolu, zodpovídající za citrusové aroma, v pořadí: geranylacetát, geranylpropionát a geranylisobutyrát. Jejich obsah je relativně velmi



vysoký, kolem 2-4 % rel. Díky těmto látkám se 'Kazbek' jednoznačně odlišuje od většiny komerčních odrůd chmele (Krofta et al. 2019; Nesvadba et al. 2013). Poměr kohumulonu ( $\alpha$ -hořké kyseliny) a kolupulonu ( $\beta$ -kyseliny) je velmi vysoký. Díky těmto parametrům je odrůda 'Kazbek' snadno identifikovatelná mezi ostatními českými odrůdami (Krofta & Patzak 2011).

### 3.3.4 'Premiant' a 'Sládek'

Obě odrůdy byly vyšlechtěny nejen pro své pěstitelské vlastnosti, ale především jako doplněk ŽPČ pro pivovarské využití. Společně jsou registrovány pro české pivo (CHZO) (*Český chmel* 2021).

'Sládek' dává pivu vyváženou hořkost a jemné chmelové aroma. Jedná se o pozdní odrůdu s vegetační dobou 133-140 dní. Rostlina má vysoké nároky na dostek vody. Špičky krycích listenů jsou mírně odkloněné od hlávky (Nesvadba et al. 2013).

'Premiant' získal název podle tradičního dvoustupňového piva „Premium“ s výraznou chmelovou hořkostí (*Český chmel* 2021). Typickým znakem pro rostlinu jsou tmavě zelené révové listy nakloněné k révě. 'Premiant' je polopozdní odrůda, vegetační doba je 128-134 dní. Střední obsah farnesenu v rozmezí 1 až 5 % rel. je typické pro odrůdy 'Premiant' spolu s 'Vitem' (Krofta & Patzak 2011; Jelínek et al. 2010).

### 3.3.5 'Harmonie'

'Harmonie' je několikanásobný kříženec odrůd 'Premiantu', 'ŽPČ' a dalších odrůd. Název je odvozen od harmonického složení pryskyřic (Nesvadba et al. 2012). Odrůda je charakteristická červenou barvou révy a válcovitým tvarem šišťice. Vegetační doba polopozdní odrůdy je 128-132 dní. S vyrovnaným obsahem  $\alpha$  a  $\beta$ hořkých kyselin se 'Harmonie' řadí mezi aromatické odrůdy chmele s kořenitým aromatem. U pivovarských zkoušek se ukázalo, že pivo chmelené odrůdou 'Harmonie' obsahovalo nižší antiradikálovou aktivitu a nižší množství polyfenolových látek (Krofta et al. 2009). Odrůda 'Sládek', 'Harmonie' obsahují nejméně  $\beta$ -farnesenu ze všech českých odrůd chmele (pod 1 %) (Krofta & Patzak 2011).

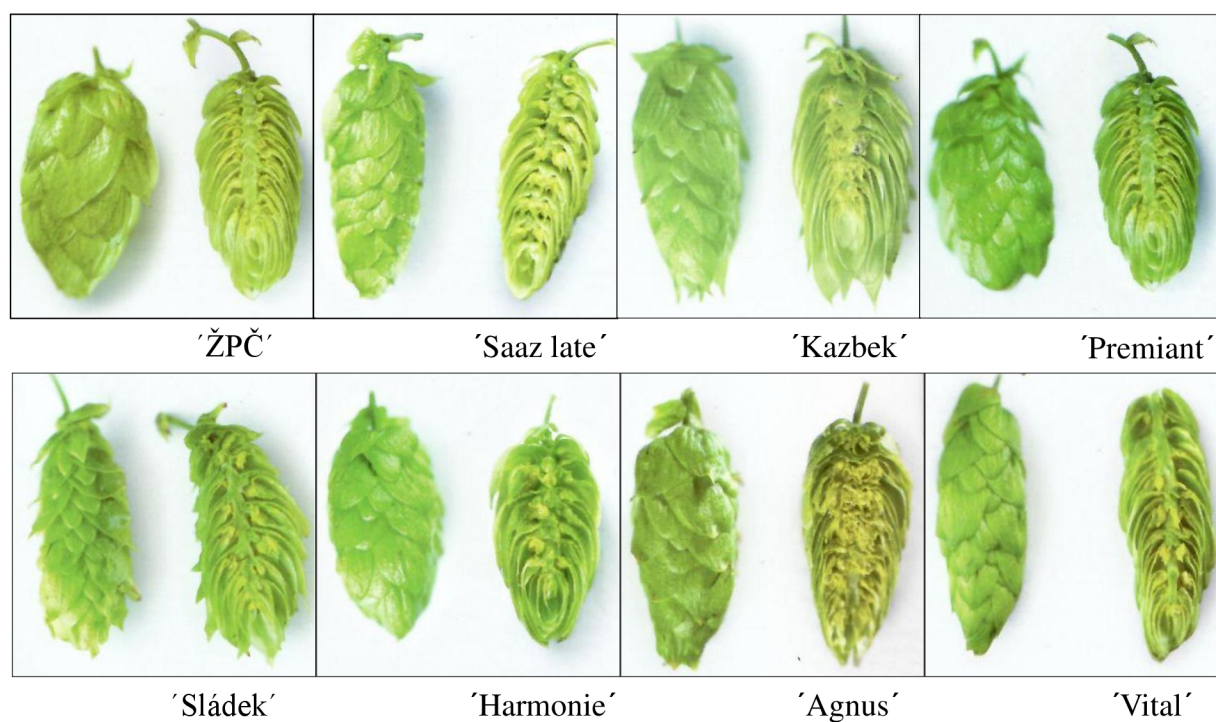
### 3.3.6 'Agnus'

Tento hořký chmel byl získán křížením odrůd 'Sládek', 'Bor', 'ŽPČ' a dalších šlechtitelských materiálů. Tato odrůda byla pojmenována na počest významného českého šlechtitele chmele Františka Beránka, v latině znamená beránek „Agnus“. 'Agnus' má nadprůměrnou produkci  $\alpha$ -hořkých kyselin s pozitivním vlivem na stabilitu piva. Obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin je 9,0-12,0 % rel. a obsah beta hořkých kyselin je 4,0-6,5 % rel. Chmelové aroma je silně kořenité (Nesvadba et al. 2013). 'Agnus' spolu s odrůdou 'Vital' vykazují ze všech českých odrůd chmele velmi vysoký podíl xanthohumolu (0,7-1,1 % rel.) a desmethylxanthohumolu (0,1-0,2 % rel.). Tato odrůda produkuje velmi vysoký obsah silice  $\beta$ -myrcen a celkových silic (Jelínek et al. 2011).

### 3.3.7 'Vital'

'Vital' byl vyšlechtěn po matečné odrůdě 'Agnus' pro farmaceutické a biomedicíální účely. V roce 2008 byl v České republice registrován jako první odrůda chmele i pro farmaceutické využití (Nesvadba et al. 2012). Právě silně nadprůměrný obsah xanthohumolu (XN) a desmethylxanthohumolu (DMX) má příznivý vliv na lidské zdraví. 'Vital' vykazuje v rámci světových i českých odrůd chmele vysoký obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin (12-16 % rel.) (Jelínek et al. 2010; Krofta & Patzak 2011).

Charakteristickým znakem odrůdy 'Vital' je dlouhá vegetační doba a pravidelný válcovitý tvar rostliny. Odrůda 'Vital' je charakteristická středním až řidším olistěním. Listy jsou středně velké tři až pětilaločnaté s velkým vykrojením. Chmelová hlávka má úzce vejčitý tvar. Odlišným znakem od ostatních českých odrůd chmele je, že listeny jsou pevně přitisknuty k věténku. Výhodou této pevné přilnavosti listenu ke věténku je, že při mechanizované sklizni nedochází k rozpadu nebo poškození hlávek (Nesvadba 2010).



Obrázek 11: Chmelové šišťice jednotlivých odrůd (Nesvadba et al. 2013)

## 4 Metodika

V experimentální části byl spektrofotometricky prostřednictvím přístroje na Obrázku 12 stanoven celkový obsah fenolů, flavonoidů a celková antioxidační aktivita u osmi českých odrůd chmele.



Obrázek 12: UV- Vis spektrofotometr (ThermoFisher)

### 4.1 Přístroje a pomůcky

- Elektrický mlýnek ECG KM 110
- Sušárna
- Analytické síto (Preciselekt)
- Filtrační kruh, filtrační papír, nálevka, stojan, zkumavky, varné baňky
- Liebigův chladič
- UV-Vis spektrofotometr (Evolution 201; ThermoFisher)
- Kyvety

### 4.2 Rostlinný materiál a příprava vzorků

Sušené šišťice chmele osmi odrůd (ŽPČ, Sládek, Agnus, Kazbek, Harmonie, Premiant, Vital, Saaz Late) byly získány od Chmelařského institutu s.r.o. Žatec a uskladněny v uzavřených papírových pytlích na suchém a tmavém místě.

Příprava extraktů a vyhodnocení obsahu extrahovatelných látek bylo provedeno dle pokynů článku *Lupuli flos* Českého lékopisu 2017. Nejprve byly sušené šišťice chmele namlety v elektrickém mlýnku a homogenizovaná drť byla přeseta pomocí analytického síta o velikosti otvorů 0,355 mm.

Pro stanovení celkových fenolů, flavonoidů a celkové antioxidační aktivity bylo od každé odrůdy chmele naváženo předepsané množství (10 g) homogenizované drogy do varných baněk s kulatým dnem. Ke každé navážce bylo přidáno 300 ml 70% ethanolu. Směsi byly zahřívány pod Liebigovým chladičem na teplotu 80-90 °C (Obrázek 11). Vzniklý extrakt byl zfiltrován a získaný filtrát byl odpařen v dopředu zvážených baňkách do sucha na vodní

lázni. Baňky byly následně sušeny v sušárně 2 hodiny při teplotě 100-105 °C. Po zchladnutí byly baňky zváženy a množství získaného odparku spočítáno jako rozdíl hmotností.



Obrázek 13: Extrakce pod zpětným chladičem (Liebigův chladič)

### 4.3 Stanovení celkových fenolických látek

Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC – Total phenolic content) ve chmelu byla použita Folin-Ciocalteuova metoda podle (Singleton & Rossi 1965), kolorimetrická metoda založená na oxidačně-redukční reakci mezi činidlem Folin-Ciocalteu (F-C) a fenolickými sloučeninami. Změna barvy reakční směsi byla způsobena přenosem elektronů, kdy došlo k redukci F-C činidla (oxidační činidlo) a k oxidaci fenolických látek (redukční činidlo), kde fenolické sloučeniny fungují jako donory elektronu (viz Schéma 2). Redukcí molybdenu (obsaženého ve sloučenině  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  v F-C činidle) vznikají modré komplexy, které se detekují spektrofotometricky při vlnové délce 760 nm (Gülçin 2012; Singleton & Rossi 1965).

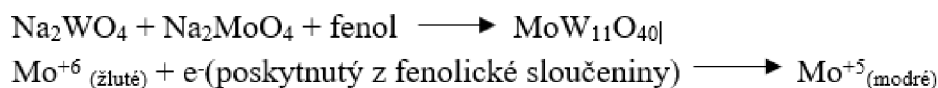


Schéma 2: Princip Folin-Ciocalteuovy metody (Gülçin 2012)

K 0,5 ml chmelového extraktu se přidalo 1,5 ml F-C činidla, roztok se nechal inkubovat 6 minut při laboratorní teplotě. Reakce probíhala v alkalickém prostředí, které bylo zajištěno přidáním 1,6 ml roztoku 7% uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Výsledná směs byla doplněna ultračistou vodou na konečný objem 5 ml. Reakční směs byla inkubována 90 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Vzorky byly následně měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 760 nm. proti slepému roztoku, kterým byla ultračistá voda. Celkový obsah fenolů ve chmelových extraktech byl vypočten na základě kalibrační křivky kyseliny gallové. Výsledky byly uvedeny v miligramech ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) na gram sušiny chmele.

#### 4.4 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkového množství flavonoidů (TFC – total flavonoid content) v extraktech chmele bylo provedeno spektrofotometrickou metodou upravená dle (Shraim et al. 2021), pomocí kolorimetrické reakce s chloridem hlinitým ( $\text{AlCl}_3$ ) a dusitanem sodným ( $\text{NaNO}_2$ ). Pro analýzu byl použit 5% roztok  $\text{NaNO}_2$ , 10% roztok  $\text{AlCl}_3$ , roztok 4% hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ).

Tato analýza je založena na reakci flavonoidů s hlinitým iontem v alkalickém prostředí, které zajišťuje hydroxid sodný, za vzniku růžovo-červených chelátových komplexů. Díky velkému množství oxoskupin a hydroxylových skupin mají flavonoidy velkou afinitu k iontům kovů, jako je  $\text{Al}^{3+}$ . Dusitan sodný slouží jako nitrační činidlo, za vzniku flavoniod-nitroxylderivátů (Schéma 3) (Shraim et al. 2021).

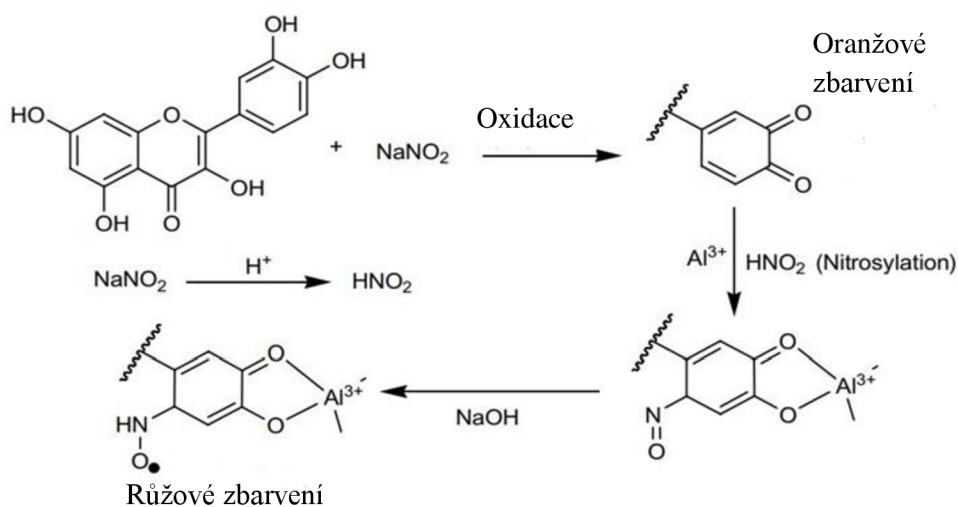


Schéma 3: Reakce flavonoidů s hlinitým iontem (Shraim et al. 2021)

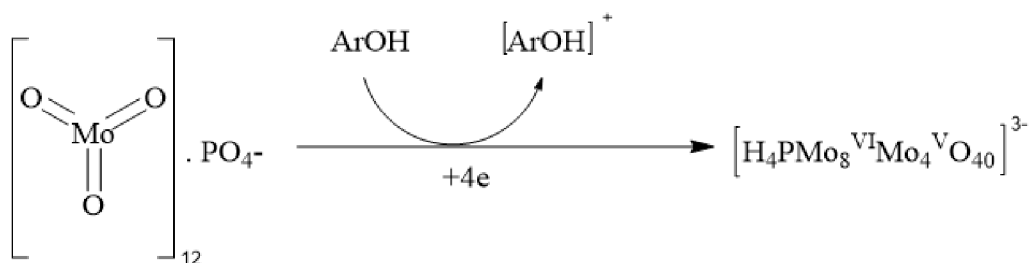


Do zkumavek bylo napipetováno 0,4 ml chmelového extraktu společně s 0,16 ml destilované vody. Do této směsi bylo přidáno 0,12 ml roztoku NaNO<sub>2</sub> a připravená směs se nechala 5 minut inkubovat. Po uplynutí doby inkubace bylo přidáno 0,12 ml roztoku AlCl<sub>3</sub> a směs se nechala reagovat 6 minut, kdy se přidalo 0,8 ml NaOH. Objem reakční směsi se doplnil ultračistou vodou na 2 ml. Absorbance byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 415 nm.

Celkový obsah flavonoidů byl vypočten na základě kalibrační křivky kvercetinu a výsledky byly vyjádřeny v miligramech ekvivalentu kvercetinu (QE) na gram sušiny vzorků odrůd chmele.

#### 4.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivity (TAA – Total antioxidant activity) u odrůd chmele byla stanovena fosfomolybdenovou metodou, která se používá k hodnocení celkové antioxidační kapacity u rostlin. Tato metoda je založená na redukci Mo(VI) na Mo(V) antioxidačními látkami obsaženými ve vzorku a následnou tvorbou zeleného komplexu fosforečnan/Mo v kyselém pH. Zelenomodré zbarvení je výsledkem redukce molybdenanu amonného na oxid známý jako Kegginův ion [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(MoO<sub>3</sub>)<sub>12</sub>] za kyselých podmínek. Vzniklý Kegginův ion se pak redukuje na [H<sub>4</sub>PMo<sub>8</sub><sup>VI</sup>Mo<sub>4</sub><sup>V</sup>O<sub>40</sub>]<sup>3-</sup> v přítomnosti antioxidantu (fenolické sloučeniny) (Schéma 4) (Sadeer et al. 2020).



Žlutý komplex - Kegginův ion

Zelenomodré zbarvení

Schéma 4: Reakční mechanismus fosfomolybdenové metody (Sadeer et al. 2020)

Do zkumavky bylo napipetováno 10 µl chmelového extraktu a 90 µl ultračisté vody, směs byla smíchána s 1 ml roztoku fosfomolybdenového činidla (0,6M kyselina sírová, 28mM fosforečnan sodný a 4mM molybdenan amonný). Zkumavky byly přikryty alobalem a inkubovány ve vodní lázni při 95 °C po dobu 90 minut. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byla změřena absorbance směsi při vlnové délce 765 nm oproti slepému vzorku, kde byl vzorek nahrazen extrakčním roztokem (70% ethanol). Celková antioxidační aktivita ve chmelových extraktech byla vypočtena na základě kalibrační křivky kyseliny askorbové. Výsledky byly vyjádřeny množstvím ekvivalentu kyseliny askorbové v miligramech na gram sušiny chmele (mg AAE/g).

## 4.6 Vyhodnocení dat

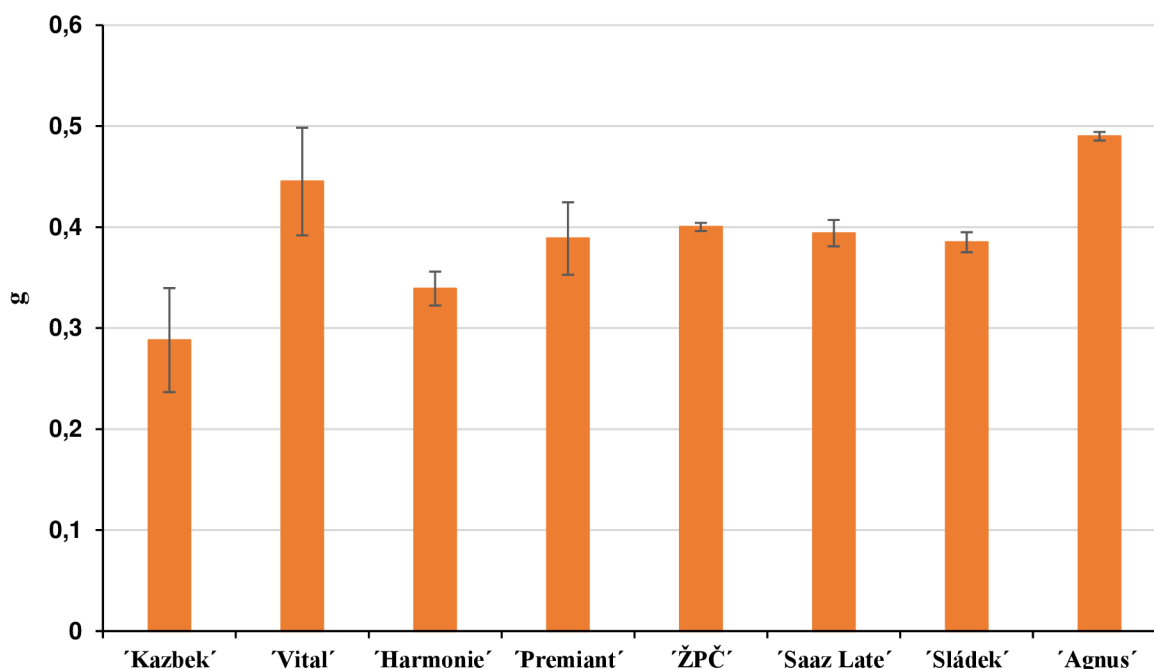
Všechny analýzy byly provedeny ve třech opakováních a výsledky vyhodnoceny jako průměr tří naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou (SD). Pro celkový obsah fenolických látek a flavonoidů byla provedena korelační analýza, zda existuje lineární vztah mezi obsahem těchto dvou skupin látek a antioxidační aktivitou. Byly sestrojeny bodové grafy (Příloha I a II) závislosti TAA na TPC, respektive TFC obsažených v jednotlivých analyzovaných odrůdách. Do grafu byly vyneseny průměrné hodnoty tří stanovení obsahu daných látek v miligramech na gram sušené chmelové šišťice. Následně byly grafy proloženy přímkou pomocí funkce excel – Microsoft Excel 2016 „spojnice trendu“ a pomocí funkce CORREL byl vypočítán dle (Evans 1996) Pearsonův korelační koeficient  $r$  závislosti antioxidační aktivity na obsahu stanovených látek.

## 5 Výsledky

V kapitole výsledky jsou uvedeny získané hodnoty z měření kvantitativního stanovení množství extrahovatelných látek, celkového obsahu fenolických látek, flavonoidů, celkové antioxidační aktivity v extraktech jednotlivých odrůd chmele. Všechny získané výsledky jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD) z trojnásobného opakování.

### 5.1 Obsah extrahovatelných látek u odrůd chmele

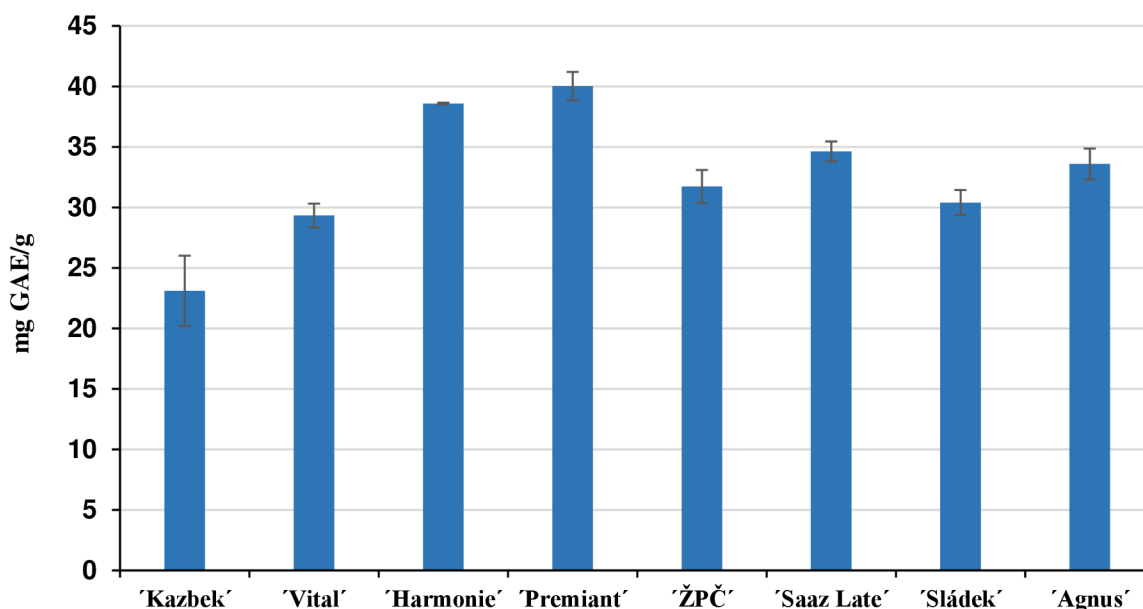
Nejvyšší výtěžek extrahovatelných látek byl zaznamenán u odrůdy 'Vital' a 'Agnus', naopak nejmenší obsah vykazovala odrůda 'Kazbek' (Graf 2). Při srovnání hodnot extrahovatelných látek s grafem TPC i TFC (Grafy 3 a 4) lze konstatovat, že odrůda 'Kazbek' měla ve srovnání s ostatními jak nejmenší množství extrahovatelných látek, tak této skupiny sekundárních metabolitů. U odrůd 'ŽPČ' a 'Saaz Late' se množství látek extrahovatelných 70% ethanolem pohybovalo v podobném rozmezí jako následně TPC a TFC (Grafy 3 a 4). Všechny odrůdy pak splňovaly minimální množství předepsané Českým lékopisem 2017 (0,250 g).



Graf 2: Obsah extrahovatelných látek v gramech

## 5.2 Celkový obsah fenolických látek ve chmelových extraktech

Jak vyplývá z grafu 3, nejvyšší hodnota TPC byla naměřen u odrůdy 'Premiant' (40,02 mg GAE/g) a 'Harmonie' (38,58 mg GAE/g), zatímco nejnižší obsah u odrůdy 'Kazbek' (23,11 mg GAE/g). Obsah fenolických látek u ostatních odrůd (jako 'ŽPČ', 'Saaz Late' a



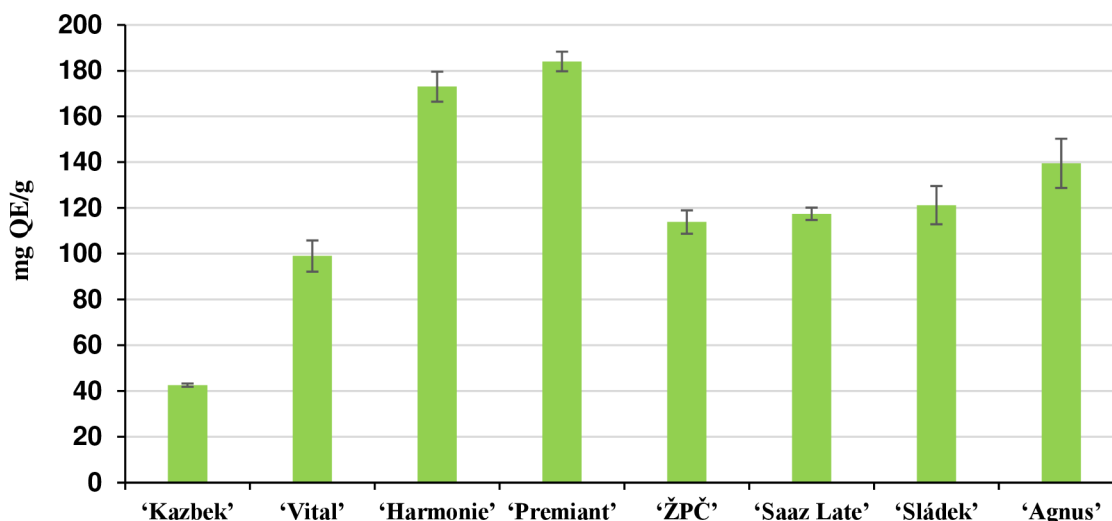
Graf 3: Celkový obsah fenolických látek – TPC (mg GAE/g)

## 5.3 Celkový obsah flavonoidů

Na základě spektrofotometrického měření, byl stanoven celkový obsah flavonoidů (TFC) v ethanolových extraktech chmele vyjádřených jako ekvivalent kvercetinu v mg na g sušiny (Graf 3).



Množství TFC ve chmelových extraktech se značně lišilo a pohybovalo se v rozmezí od 42,61 do 184,04 mg QE/g sušiny (Graf 4). Nejnížší hodnoty byly opět zjištěny u odrůdy 'Kazbek' (42,61 mg QE/g) a u odrůdy 'Vital' (99,01 mg QE/g). Naopak u odrůdy 'Harmonie' a 'Premiant' byla naměřena nejvyšší koncentrace flavonoidů ze všech odrůd (173,02 a 184,04 mg QE/g). Množství TFC u ostatních odrůd 'ŽPČ', 'Saaz Late' a 'Sládek' (113,87 -121,24 mg QE/g) se pohybovalo mezi hodnotami 'Kazbeku' a 'Premiantu'. Vyšší obsah oproti jiným odrůdám byl zjištěn také u odrůdy 'Agnus' (139,52 mg QE/g). Jak u výsledků TPC (Graf 3), tak TFC (Graf 4), lze pozorovat podobný trend v množství těchto bioaktivních látek.

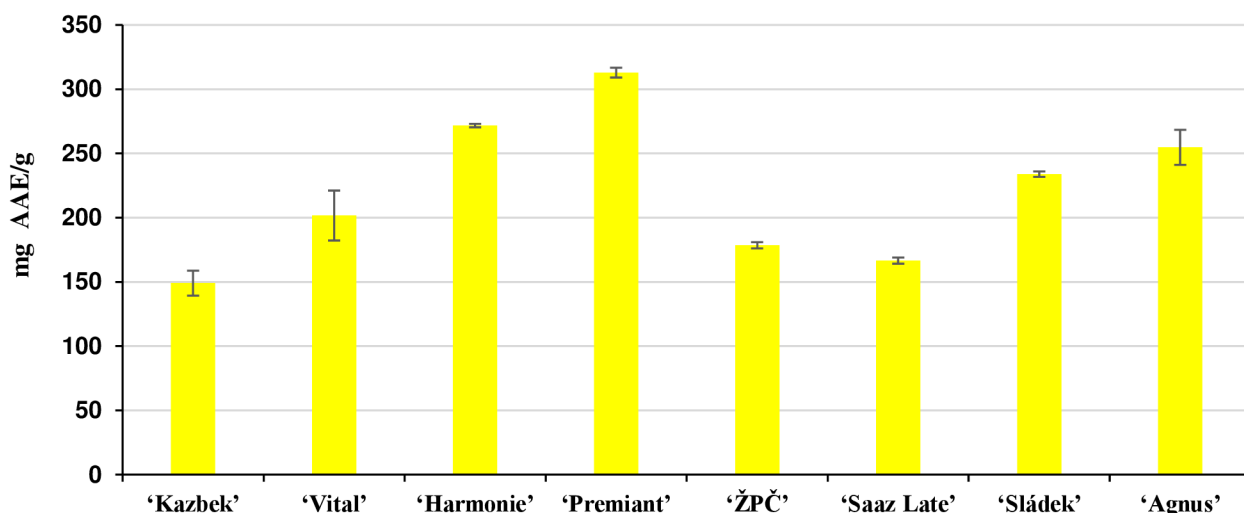


Graf 4: Celkový obsah flavonoidů – TFC (mg QE/g)

## 5.4 Celková antioxidační aktivita

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA) byla využita fosfomolybdenová metoda, analýza pak byla provedena pomocí spektrofotometru. Z grafu 5 je patrné, že nejvyšší antioxidační kapacita byla zjištěna u extraktů odrůdy 'Premiant' (312,88 mg AAE/g) a 'Harmonie' (271,64 mg AAE/g). 'Kazbek' (149,01 mg AAE /g DW), spolu s 'ŽPČ' a 'Saaz Late' patřil mezi odrůdy s nejmenší antioxidační aktivitou. Ostatní odrůdy jako 'Vital', 'Sládek' a 'Agnus' vykazovaly průměrnou antioxidační kapacitu, jejichž hodnoty se pohybovaly od 201,65 mg AAE/g do 254,70 mg AAE/g.

Pomocí funkce CORREL byly vypočítány dle Evans (1996) Pearsonovy korelační koeficienty  $r$  pro závislosti antioxidační aktivity na obsahu stanovených látek. Vztah mezi antioxidační aktivitou a obsahem TPC vykazoval „velmi silnou“ závislost ( $r=0,9432$ ) stejně, jako vztah mezi antioxidační aktivitou a obsahem TFC ( $r=0,9848$ ). Sestrojené grafy zmíněných závislostí jsou uvedeny v Příloze I a II.



Graf 5: Celkový antioxidační aktivita – TAA (mg AAE/g)

## 6 Diskuze

### 6.1 Obsah extrahovatelných látek

Výtěžek extrakce polyfenolických látek, a obecně i obsahových látek chmelové rostliny závisí do značné míry nejen na polaritě rozpouštědla, které určuje kvantitativní i kvalitativní složení extrahovaných látek, ale i na extrakčních podmínkách. Použití směsi vody a alkoholu poskytlo mnohem lepší výsledky extrakčního procesu, jak ukázaly níže uvedené studie (Carbone et al. 2020; Hrnčíč et al. 2019).

Odrůda 'Agnus' vyniká největším obsahem XN (0,1-1,1 % rel.) v porovnání s ostatními odrůdami. XN je velmi dobře rozpustný v 100% ethanolu až (10 g/l) ("Enzo Life Sciences" 2023). Lze tedy usuzovat, že díky této vysoké solubilitě se XN mohl podílet na vyšším výtěžku extrahovatelných látek. Odrůda 'Agnus' má také vysoké zastoupení chmelových silic (1-2 % rel.) oproti ostatním odrůdám chmele, především  $\beta$ -myrcenu obsahuje nejvíce (40–55 % rel.). Myrcen je dobře rozpustný v ethanolu a jeho teplota varu se pohybuje mezi 166–168 °C, tím je omezená možnost, že by se během extrakce vypařil. Toto tvrzení je dalším možným důvodem, proč bylo dosaženo lepšího výtěžku extrahovatelných látek u této odrůdy (Graf 2).

Odrůda 'Kazbek' patří z genetického hlediska ke skupině amerických hořkých odrůd chmele. Díky svému genetickému původu je charakteristický vysokým obsahem kohumulonu –  $\alpha$ -hořké kyseliny (35-40 % rel.) a kolupulonu –  $\beta$ -hořké kyseliny (57-62 % rel.) oproti ostatním českým odrůdám chmele. Jelikož kohumulon a kolupulon lze získat superkritickou extrakcí CO<sub>2</sub> (Hrnčíč et al. 2019), je předpoklad, že extrakcí 70% ethanolom byly přítomny v malém množství chmelového extraktu. Kolupulon ve vodě není rozpustný téměř vůbec, ale v nepolárních rozpouštědlech jako chloroform, dichlormethan, ethylacetát, aceton atd. a z tohoto důvodu lze usuzovat, že u odrůdy 'Kazbek' nedošlo k tak účinné extrakci (Graf 2).

Odrůda 'Vital' vykazuje podobný obsah extrahovatelných látek jako odrůda 'Agnus'. 'Vital' byl získán výběrem z hybridního potomstva, ve kterém má většinový podíl právě

odrůda 'Agnus'. Chemická analýza odrůdy 'Vital' v roce 2006 a 2007 ukázala extrémně vysoký obsah DMX, který společně s XN (jeho vysoký obsah vykazuje právě odrůda „Agnus“) lze extrahovat ethanolem (Nesvadba 2010).

Výsledky prezentované v této práci (viz kapitola 5) potvrzují, že různé odrůdy chmele se mohou lišit v TPC, TFC, a tudíž i v obsahu extrahovatelných látek, ale zároveň je zde ukázána podobnost trendu v obsahu extrahovatelných látek s obsahem fenolických látek a flavonoidů zvláště u odrůd 'ŽPČ', 'Sládek', 'Saaz Late' a 'Kazbek' (Graf 3 a 4).

Fenolické extrakty z rostlinných materiálů jsou vždy směsí různých skupin fenolických látek, které jsou rozpustné v použitém systému rozpouštědel. Ve práci (Carbone et al. 2020) byla provedena extrakce pomocí dvou metod. Extrakce pomocí ultrazvuku (UAE – Ultrasound-Assisted Extraction), která byla provedena v sonifikační lázni, pracující při frekvenci 40 kHz a použitím 50% ethanolu. Ultrazvuková extrakce je upřednostňovanou technikou k izolaci bioaktivních sloučenin u rostlinných látek ve farmaceutickém průmyslu. Metodou se dosahuje úplné extrakce, a tím vyššího i kvalitnějšího výtěžku, ve velmi krátké době. Mikrovlnná extrakce (MAE – Microwave Assisted Solvent Extraction), která byla provedena jako druhý způsob extrakce ve studii (Carbone et al. 2020) poskytla významně vyšší hodnoty než ultrazvuková metoda bez ohledu na použité rozpouštědlo. Použití rozpouštědla ethanolu s MAE umožnilo získat během pouhé jedné minuty přibližně pětkrát více polyfenolů než při použití metody při kombinovaném použití ethanolu a ultrazvukové extrakce.

Carbone et al. (2020) tedy poukázal na významný vliv jak rozpouštědla, tak extrakční techniky, kdy je možné získat různé složení i množství bioaktivních fenolických látek. Další poznatek, který byl ve této studii pozorován, byl lineární nárůst obsahu polyfenolů s tím, jak se zvyšovala koncentrace organického rozpouštědla a byly detekovány vyšší výtěžky TPC ve vzorcích ethanolu bez ohledu na použitou extrakční techniku (UAE/MAE). Za stejných extrakčních podmínek a u stejné analyzované odrůdy chmele byla nahrazena voda methanolem nebo ethanolem v rozpouštědle. To vedlo ke dvojnásobnému zvýšení výtěžku TPC. Z výsledků vyplývá, že hydroalkoholové směsi vykazují synergický účinek mezi vodou a alkoholem, což zvyšuje účinnost extrakce fenolických sloučenin z rostlinných matic.

Srovnáním výsledků ze studie (Carbone et al. 2020) z této práce lze konstatovat, že prosté zahřívání pod Liebiegovým chladičem mohlo mít menší účinnost pro extrakci TPC a TFC. S ohledem na to, že se v této práci používal u všech odrůd stejný způsob extrakce a rozpouštědlo dle Českého lékopisu (2017), byly tedy zajištěny stejné podmínky pro srovnání extrahovatelných látek mezi odrůdami. Nicméně je třeba do budoucna prověřit další metody extrakce s použitím jinak koncentrovaných rozpouštědel a srovnat výsledky účinnosti extrakce mezi jednotlivými technikami.

## 6.2 Celkový obsah fenolických látek a flavonoidů

Nejvyšší obsah celkových fenolických látek (TPC) byl stanoven pro odrůdu 'Premiant', což je v rozporu se studiemi, kde fenolické látky byly ze vzorku jemně pomletého chmele extrahovány 70% acetonem (Jelínek et al. 2011; Mikyška & Jurková 2014). Tyto studie uvádí, že nejvyšší obsah fenolických látek byl naměřen u 'ŽPČ'. V tomto rozporu je možný vliv rozpouštědla, kdy použitím acetonu se vyextrahovaly nepolární fenolické látky, a pokud

'ŽPČ' obsahoval více těchto metabolitů, je proto možné, že se u této odrůdy naměřil menší obsah TPC za použití ethanolového rozpouštědla.

Nejnižší množství fenolických látek měla odrůda 'Kazbek' a 'Vital' (Graf 3). Podobná hodnota TPC u odrůdy 'Vital' byla naměřena i v práci Krofta et al. (2013), která uvádí hodnotu 30,00 mg GAE/g. Odrůdy 'Sládek', 'ŽPČ' a 'Saaz Late' se hodnoty obsahu TPC výrazně nelišily, což potvrzuje studie (Mikyška et al. 2018). Průměrné obsahy TPC pro odrůdy 'ŽPČ', 'Saaz Late' a 'Sládek' (Graf 3) byly podobné výsledkům těchto odrůd, kteří sledovali i další autoři (Mikyška et al. 2018; Mikyška & Jurková 2019; Mikyška & Jurková 2014), kde jemně mletý chmel o množství 3,2 g byl extrahován pomocí rozpouštědla vody nebo směsi acetonu s vodou (80:20) zahříváné pod zpětným chladičem.

Vyšší množství TPC i TFC bylo naměřeno u odrůdy 'Agnus' (Graf 3). Důkazem toho může být, jak uvádí například Jelínek et al. (2010; 2011) nebo Mikyška & Jurková (2019), že tato odrůda má bohaté zastoupení jednotlivých polyfenolických sloučenin jako jsou flavonoidy (rutin, katechin a epikatechin) nebo fenolické kyseliny (kyselina siringová, protokatechová, hydroxykumarová). Epikatechinu, který patří do flavan-3-olů, obsahuje tato odrůda téměř trojnásobné množství než většina ostatních zkoumaných odrůd.

V práci (Jelínek et al. 2010) dále uvedli podobnost jak v kvantitativním, tak i kvalitativním profilu TPC u odrůd 'Premiant' a 'Harmonie', což koresponduje s výsledky této práce, které vykazují podobné hodnoty obsahu TPC a TFC u 'Harmonie' i 'Premiantu' a zároveň obě odrůdy vykazují nejvyšší obsah TPC a TFC oproti ostatním odrůdám (Grafy 3 a 4). Možným důvod, proč jsou tyto dvě odrůdy 'Premiant' a 'Harmonie' vzájemně podobné a zároveň jasně odlišné od ostatních odrůd, může souviset s jejich genetickou příbuzností, kdy odrůda 'Harmonie' vznikla křížením 'ŽPČ' a 'Premiantu'.

Ze všech českých odrůd má 'Vital' nejvyšší obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin (10-15 % rel.), což řadí, jako jedinou odrůdu, do skupiny vysokoobsažených chmelů i také do skupiny chmelů hořkých (při nižším obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin). Z toho důvodu mohlo být u této odrůdy naměřeno druhé nejmenší množství fenolických látek a flavonoidů (Maliar et al. 2017).

Variabilita obsahu diskutovaných TPC je dána vlivem klimatických podmínek v průběhu období růstu chmelové rostliny a sklizně, jako jsou srážky, teplota, sluneční záření, které mohou ovlivnit fyziologické a biochemické procesy v rostlinách, účinnost výživy rostliny a biosyntézu bioaktivních látek. Se současnými klimatickými změnami projevujícími se především výrazným suchem a zvyšující se teplotou, může být chmelová rostlina uvedena do značného stresu, kdy rostlina produkuje více sekundárních metabolitů. Polyfenoly v hlávce se vytvářejí v raných fázích vegetace chmelové rostliny, metabolity lupulinových žláz se tvoří hlavně během dozrávání (červen-srpen) (Český hydrometeorologický ústav 2021).

V roce 2021 nastal velmi studený březen, kdy teploty v některých dnech dosahovaly až pod 0 °C, zatímco ke konci března teploty vystoupaly až k 12 °C. V květnu byly rozdíly teplot podobné. V důležitých fázích vegetačního období, jako je kvetení a počáteční vývoj chmelové šišťice (červen, červenec až srpen), byly v roce 2021 teploty ve značném výkyvu, v některých dnech dosahovaly přes 30 °C (Český hydrometeorologický ústav 2021). Tento limitující faktor mohl mít nepříznivý vliv na tvorbu polyfenolů ve chmelových šišťicích, a mohl narušit standardní fyziologické procesy ve chmelové rostlině, a tím začala rostlina kumulovat více látek v kořenovém systému než v ostatních částech rostliny. Je možné, že díky měsícům

(červen-srpen), kdy byly vysoké teploty, došlo k nízké akumulaci  $\alpha$ -kyselin, a tím byl ovlivněn i obsah celkových fenolických látek. Mikyška et al. (2018) uvádí, že snížením obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin dojde k nárůstu obsahu polyfenolických látek. To může být příčinou, že u hořkých odrůd jako 'Agnus' a 'Premiant' bylo naměřeno vysoký TPC. Dalším důvodem, proč u odrůdy 'Premiant' mohlo dojít k nárůstu TPC i TFC je i to, že tato odrůda je tolerantní k nedostatku vody během vegetace. Oproti tomu odrůda 'Agnus' má zvýšené nároky na dostatek vody a hnojení dusíkem v průběhu růstu, které jsou důležitými agroekologickými faktory pro růst rostliny a akumulaci bioaktivních látek ve chmelové šišťici.

Nejvyšší obsah TPC ve chmelových hlávkách byl stanoven u odrůd 'Premiant', 'Harmonie' a 'Saaz Late', což nekoresponduje s výsledky získanými v letech 2014-2016, kdy byla provedena studie (Mikyška et al. 2018) zaměřená na objasnění vlivu odrůdy, ročníku a pěstební lokality na obsah polyfenolů a antiradikálovou aktivitu chmele. Avšak speciálně u odrůdy 'Harmonie' a 'Saaz Late' patřící do aromatických odrůd se potvrdilo, že aromatické odrůdy chmele obsahují vyšší množství polyfenolických látek.

Dalším důvodem, proč mohlo dojít k vyššímu naměření množství polyfenolických látek u odrůd 'Premiant' a 'Harmonie' je na základě rozdělení podle obsahu  $\alpha$ -hořkých kyselin do čtyř komerčně i technologicky odlišných skupin. Do první skupiny jemných aromatických odrůd (Fine aroma) patří chmele žatecké genetické větve – 'ŽPČ', 'Saaz Late', jejichž obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin se pohybuje v rozsahu 3,5-4,0 %. Do druhé skupiny aromatických odrůd (Aroma) patří české hybridní odrůdy 'Sládek' a 'Harmonie'. Chmele patřící do této skupiny mívají 3,5-6,5 %  $\alpha$ -hořkých kyselin. Další skupinou jsou hořké (Bitter-Dual purpose) a vysokoobsažené odrůdy (High alpha) s vysokým obsahem pryskyřic, hlavně  $\alpha$ -hořkých kyselin, ale s méně příznivým aroma, kam patří odrůdy 'Agnus' a 'Vital' jako vysokoobsažené odrůdy (Prugar 2008).

Podobné množství polyfenolických látek bylo naměřeno u 'ŽPČ' a 'Sládek', což naznačuje, že tyto dvě odrůdy jsou geneticky velmi blízké (Jelínek et al. 2011).

### 6.3 Celková antioxidační aktivita

Odrůda 'Agnus' společně s 'Vitelem' mají nadprůměrný obsah  $\alpha$ -hořkých kyselin a vysokým množstvím prenylovaných flavonoidů (XN a DMX) již zmíněných v kapitole 3.2, které mají silné antioxidační účinky. To může vést k tomu, že u odrůdy 'Agnus' byla naměřena třetí nejvyšší antioxidační aktivita (Graf 5). Naopak u odrůdy 'Kazbek's' nižším zastoupením XN, ale vysokým množstvím  $\alpha$ -hořkých kyselin, které se podle Hrnčíč et al. (2019) získávají supekritickou extrakcí CO<sub>2</sub>, nedošlo k tak účinné extrakci, a tím byla naměřena nejnižší antioxidační aktivita (Graf 5).

Možný vliv na hodnoty antioxidační aktivity ve chmelových extraktech může být způsoben synergickými účinky některých polyfenolických látek jako jsou fenolové kyseliny (felurová kyselina, vanilová kyselina, kyselina chlorogenová), flavan-3-oly – katechiny (+)-katechinu a (+)-epicatechinu a flavonoly (kaempferol a kvercetin), které byly naměřeny ve velkém množství ve chmelových extraktech ve studii (Mikyška & Jurková 2019; Preedy 2008). Například u odrůdy 'Premiant' bylo zjištěno vyšší množství flavonoidů kvercetin u

katechinu než u ostatních odrůd chmele, což se mohlo podílet na nejvyšší hodnotě TFC (Graf 4) i TPC (Graf 5).

Jak bylo uvedeno výše, důvodem odlišného výtěžku extrahovaných látek mohl být, že se výrazně lišila afinita extrahovaných látek na polaritě rozpouštědla, v tomto měření byl u všech odrůd použit 70% ethanol, a tak na základě menší či větší afinity látek přítomných ve sledovaných odrůdách k rozpouštědлу mohlo dojít k extrakci více či méně polárních obsahových látek. Podíl bioaktivních látek s antioxidačními účinky, pak mohl zapříčinit odlišnost naměřené antioxidační aktivity u jednotlivých odrůd chmele. U pigmentů karotenoidů bylo pozorováno, že koncentrace jejich celkového obsahu byla ve chmelových extraktech ethanol-voda větší než ve vodných extraktech (Kobus-Cisowska et al. 2019).

Primárním tepelným poškozením rostlin je komplex fotosystému II (PSII), důsledkem tepelného stresu se v rostlině produkují reaktivní formy kyslíku, což vede ke zvýšení biosyntézy antioxidantů, jako jsou karotenoidy (Allakhverdiev et al. 2008). Jelikož průměrná teplota v roce 2021 v důležité generativní fázi (červen–srpen) byla 26,5 °C nepředpokládá se, že by se chmelová rostlina nacházela v kontinuálním stresu, přesto v měsících červen–červenec teploty v některých dnech dosáhly přes 35 °C (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2022). Je možné, že vyšší teplota ve vegetačním období zapříčinila nárůst karotenoidů, a tím k přispění antioxidační aktivity, zejména u odrůd chmele 'Premiant' i 'Harmonie'. Právě zvýšený obsah karotenoidů byl sledován u amerických odrůd chmele ve spojitosti s odolností proti tepelnému stresu (Eriksen et al. 2020).

Další možné biomolekuly, které mohly přispět antioxidačními vlastnostmi k TAA a jsou obsaženy ve chmelu, mohou být vitamíny, zejména vitamín E. Dle Dubbs & Gupta (1998) přidavkem ethanolu do vody, se rozpustnost vitamínu E výrazně zvýší. Tato studie ukázala, že přidavkem 70% ethanolu se rozpustnost tohoto vitamínu zvýší 450krát. Lze tedy usuzovat, že vitamín E se mohl podílet na antioxidační aktivitě ve chmelových extraktech. Vitamín E je relativně termostabilní, jak uvádí (Työppönen & Hakkarainen 2009), kdy při teplotách do 90 °C došlo k minimální destrukci vitamínu E, lze tedy tvrdit, že při extrakci se vitamín E částečně zachoval. (Tvrdoňová 2014) uvedla, že právě u odrůdy 'Premiant' je vitamínu E nejvíce oproti odrůdě 'Sládek'.

Výsledky ve studii (Mafakheri & Hamidoghli 2019) ukazují, že použití vody ve směsi s organickým rozpouštědlem, zejména ethanolem, poskytlo lepší výsledky než samotné polární rozpouštědlo. Oproti tomu jiná studie tvrdí (Kowalczyk et al. 2013), že antioxidační aktivita se významně nelišila při extrakci hydroalkoholových extraktů oproti samotným polárním rozpouštědlům. Toto dává otázku budoucna, jak přistupovat k volbě rozpouštědla a metod extrakce chmelových šištic.

Řada prací uváděla korelaci mezi antioxidační aktivitou s celkovým obsahem fenolických látek a flavonoidů v ethanolovém extraktu sušených šištic chmele. Krofta et al. (2008); Prieto et al. (1999); Lyu et al. (2022) potvrdili, že na antioxidační aktivitě se významně podílí celkový obsah polyfenolů ve chmelových extraktech. Lze tedy říci, že čím ethanolový extrakt z chmelových šištic vykazoval vyšší antioxidační aktivitu, tím více obsahoval fenolických látek a flavonoidů.

V uvedených studiích bylo stanoveno množství celkových fenolických látek Folin-Ciocalteuovou metodou a antioxidační aktivita byla stanovována metodou DPPH, ABTS, FRAP a fosfomolybdenovou metodou. Autoři analyzovali chmelové odrůdy 'Agnus',

‘Premiant’ a Sládek’, případně další, cizí odrůdy. To se shoduje i s výsledky v této práci, kde uvedené grafy v Příloze I. a II. znázorňují závislost antioxidační aktivity na TPC a TFC. Z výsledků je patrná lineární závislost antioxidační aktivity na celkovém těchto metabolitů u odrůd ‘Premiant’, ‘Harmonie’, ‘Agnes’, ‘Sládek’, ‘Vital’, přičemž ‘Premiant’ má nejvyšší hodnoty obsahů stanovovaných látek a antioxidační aktivity. Naopak odrůda ‘Kazbek’ obsahuje nejméně TPC, TFC a zároveň vykazuje i nejnižší TAA.

Vergun et al. (2021) prokázal, že rostlinné extrakty s vyšší koncentrací fenolických látek vykazují větší antioxidační potenciál, toto tvrzení koresponduje s naměřenými hodnotami této práce. Ve studii hodnoty korelace mezi zkoumanými polyfenolickými sloučeninami a antioxidační aktivitou pomocí metody DPPH byly vyšší než prostřednictvím fosfomolybdenové metody. Je tedy možné, že v reprodukovatelnosti výsledků hraje roli i zvolená analytická metoda.



## 7 Závěr

V této bakalářské práci byly charakterizovány v rámci literární režerže různé bioaktivní látky nacházející se v samičí šišťici rostliny *Humulus lupulus* L. Především byla věnována pozornost fenolickým látkám, zejména jejich podskupině flavonoidů. V praktické části byly spektrofotometricky změřeny celkové obsahy celkových fenolických látek, flavonoidů a antioxidační aktivita u připravených chmelových extraktů osmi českých odrůd ('ŽPČ', 'Sládek', 'Agnus', 'Kazbek', 'Harmonie', 'Premiant', 'Vital', 'Saaz Late').

Všechny odrůdy chmele splňovaly minimální požadavky Českého lékopisu 2017 na množství extrahovatelných látek 70% ethanolem stanovenou zkouškou na čistotu. Nejvyšší podíl extrahovatelných látek byl zjištěn u odrůdy 'Agnus', kde byla naměřena vyšší TAA. Tato odrůda má potenciál pro využití díky značnému množství bioaktivních látek a antioxidační aktivitě. Největší množství TPC, TFC obsahovaly odrůdy 'Premiant' a 'Harmonie' a zároveň vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu. Naproti tomu u odrůdy 'Kazbek' bylo naměřeno nejmenší množství všech stanovených látek i všech extrahovatelných látek a zároveň se vyznačoval nejmenší antioxidační aktivitou.

Z výsledků práce vyplývá, že mezi stanovenými odrůdami chmele byla alespoň jedna, která se obsahem extrahovatelných látek nebo antioxidační aktivitou lišila od ostatních, čímž byla potvrzena alternativní hypotéza. Na odlišnosti obsahu diskutovaných sekundárních metabolitů a TAA se mohly podílet i další vlivy jako například klimatické podmínky. Z provedené kolerační analýzy byla patrná lineární závislost antioxidační aktivity na celkovém obsahu TPC a TFC u odrůd 'Premiant', 'Harmonie', 'Agnus', 'Sládek', 'Vital'.

Polyfenolické látky chmele mají širokou škálu vlastností využitelných jak v potravinářském průmyslu, tak i pro farmaceutické účely. Jelikož u extraktů šišťice chmele 'Premiant' a 'Harmonie' bylo naměřeno největší množství sledovaných sekundárních metabolitů a TAA, mohly by být tyto odrůdy využity i mimo pivovarnictví, například o obohacení různých produktů o polyfenolické látky s antioxidační aktivitou sloužící ke zvýšení jejich kvality a stability.

## 8 Literatura

Abram V et al. 2015. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products* **64**: (09266690) DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.11.008 .

Allakhverdiev S. I, Kreslavski V.D, Klimov V.V, Los D.A, Carpentier R, Mohanty P. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* **98**: (0166-8595) DOI:10.1007/s11120-008-9331-0

Almaguer C, Schönberger C, Gastl M, Arendt E, Becker T. 2014. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing* **120**: (00469750) DOI: 10.1002/jib.160

Astray G, Gullón P, Gullón B, Mumekata P.E.S, Lorenzo J.M, 2020. *Humulus lupulus* L. as a Natural Source of Functional Biomolecules. *Applied Sciences* **10**:(2076-3417). DOI:10.3390/app10155074

Basařová G, Šavel J, Basař P, Basařová P, Brož A. 2021. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Vydání druhé, přepracované, doplněné a aktualizované. Havlíček Brain Team, Praha.

Bednářová J, 2015. *Herbář, aneb, Od anděliky k žindavě*. Fortuna Libri, Praha

Bhattacharya S, Virani S, Zavro M, Haas G. 2003. Inhibition of *Streptococcus Mutans* and Other Oral *Streptococci* by Hop (*Humulus Lupulus* L.) Constituents. *Economic Botany* **57**:(0013-0001) DOI:10.1663/0013-0001(2003)057[0118:IOSMAO]2.0.CO;2118-125.

Biendl M. 2009. Hops and Health. *Technical Quarterly* **46**. (07439407). Dostupné z: DOI:10.1094/TQ-46-2-0416-01

Bohr G, Gerhäuser C, Knauff J, Josef Z. J, Becker H. 2005. Anti-inflammatory Acylphloroglucinol Derivatives from Hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Natural Products* **68**: (0163-3864) DOI:10.1021/np050164z

Carbone K, Macchioni V, Petrella G, Cicero D.O, 2020. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. *Industrial Crops and Products* **156**: (0926-6690) DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112888

Čermák P, Palečková V, Houška M, Strohalm J, Novotná P, Mikyška A, Jurková M, Sikorová M. 2015. Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains. *Czech Journal of Food Sciences* **33**: (12121800) DOI:10.17221/261/2014-CJFS 302-307

Český chmel: Czech hops, 2021. Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Svazem pěstitelů chmele České republiky, Praha

Český chmel: Czech hops, 2010. Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Svazem pěstitelů chmele České republiky, Praha

Český hydrometeorologický ústav, 2021. Český hydrometeorologický ústav. Praha: Ministerstvo životního prostředí. Available from: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/denni-data/Denni-data-dle-z.-123-1998-Sb#> (accessed November 2023)

Dubbs M. D., Gupta R. B., 1998. Solubility of Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) and Vitamin K 3 (Menadione) in Ethanol–Water Mixture **43**: (0021-9568) DOI:10.1021/je9800171

Enzo Life Sciences, 2023. Xanthohumol. Available from: <https://www.enzolifesciences.com/ALX-350-280/xanthohumol/> (accessed March 2023)

- Eriksen R. L., Rutto L., Dombrowski J. E, Henning J. A. 2020. Photosynthetic Activity of Six Hop (*Humulus lupulus* L.) Cultivars under Different Temperature Treatments. *HortScience* **55**: (0018-5345) DOI:10.21273/HORTSCI14580-19
- Evans J. D. 1996. *Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences*. Brooks/Cole Publishing Company
- Gorjanović S, Pastor F. T, Vasić R, Novaković M, Simonović M, Milić S, Sužnjevića D. 2013. Electrochemical versus Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Hop (*Humulus lupulus* L.) Products and Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: (0021-8561) DOI:10.1021/jf401718z
- Gülçin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* **86**: (0340-5761) DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3
- Gulcin İ. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* **94**: (0340-5761) DOI:10.1007/s00204-020-02689-3
- Halliwell B. 1996. *Antioxidants: The Basics-what they are and how to Evaluate them*. Elsevier **38**: (1054-3589) DOI:10.1016/S1054-3589(08)60976-X
- Hejda L, Kovařík M, 2000. Svaz pěstitelů chmele České republiky: Žatecký chmel, Žatec: Svaz pěstitelů chmele České republiky. Available from [http://www.czhops.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=75&Itemid=30&lang=cs](http://www.czhops.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=75&Itemid=30&lang=cs)(accessed March 2023)
- Hrnčíč M. K, Španinger E, Košir I, Knez Ž, Bren U. 2019. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients* **11**: (2072-6643) DOI:10.3390/nu11020257
- Chen A, Chen Y. 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry* **138**:(03088146) DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.139
- Jelínek L, Dolečková M, Hudcová T, Karabín M, Dostálek P. 2011. Profiling of czech hop varieties by means of analyses of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids, essential oils and polyphenols. *Kvasný Průmysl* **57**: (00235830) DOI:10.18832/kp2011031
- Jelínek L, Šneberger M, Karabín M, Dostálek P, 2010. Comparison of Czech hop cultivars based on their content of secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences* **28**: (12121800) DOI:10.17221/65/2010-CJFS
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances* **33**: (0734-9750) DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.009.
- Karabín M, Hudcová T, Jelínek L, Dostálek P. 2016. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**: (1541-4337) DOI:10.1111/1541-4337.12201542-567.
- Kavalier A, Litt A, Ma C, Pitra N, Coles M, Kennelly E, Matthews P. 2011. Phytochemical and Morphological Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Cones over Five Developmental Stages Using High Performance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry, Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection, and Light Microscopy Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* family **59**: (0021-8561) DOI:10.1021/jf1049084

Kobus-Cisowska J, Szymanowska-Powałowska D, Szczepaniak O, Kmieciak D, Przeor M, Gramza-Michałowska A, Cielecka-Piontek J, Smuga-Kogut M, Szulc P. 2019. Composition and In Vitro Effects of Cultivars of *Humulus lupulus* L. Hops on Cholinesterase Activity and Microbial Growth. *Nutrients* **11**: (2072-6643) DOI:10.3390/nu11061377

Korpelainen H, Pietiläinen M. 2021. Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential. *Economic Botany* **75**: (1874-9364) DOI:10.1007/s12231-021-09528-1

Kowalczyk D, Świeca M., Cichočka J, Gawlik-Dziki U. 2013. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing* (0046-9750) DOI:10.1002/jib.73

Krofta K, Mikyška A, Patzak J, Slabý M, Nesvatba V, Čejka P. 2013. VITAL - The Czech hop hybrid variety - Part II. *Kvasný Průmysl* **59**: (0023-5830). DOI:10.18832/kp2013019

Krofta K., Mikyška A., Hašková D. 2008. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. *Journal of the Institute of Brewing* **114**: (0046-9750) DOI:10.1002/j.2050-0416.2008.tb00321.x

Krofta K, Mikyška A, Hašková D. 2009. Czech aroma hop variety. *Kvasný Průmysl* **55**: (2570-8619) DOI:10.18832/kp2009017

Krofta K, Patzak J. 2011. Investigation of Czech hop varieties authenticity by means of chemical and genetic analyses. *Kvasný Průmysl*. **57**:(2570-8619) DOI:10.18832/kp2011035

Krofta K, Patzak J, Sedlák T, Mikyška A, Štěrba K, Jurková M, 2019. Kazbek – The First Czech Aroma “Flavor Hops” Variety: Characteristics and Utilization. *Kvasný průmysl* **65**: (2570-8619) DOI:10.18832/kp2019.65.72

Liu M, Hansen P, Wang G, Qiu L, Dong J, Yin H, Qian Z, Yang M, Miao J. 2015. Pharmacological Profile of Xanthohumol, a Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* **20**: (1420-3049) DOI:10.3390/molecules20010754754-779.

Lyu J Il, Ryu J., Seo K., Kang K., Park S., Hyun Ha T., Ahn J.,Kang S., 2022. Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts. *Plants* **11**: (2223-7747) DOI:10.3390/plants11010135

Madhavi D, Deshpande S, Salunkhe D. 1995. Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. první. Marcel Dekker, Inc., New York.

Mafakheri M, Hamidoghli Y. 2019. Effect of different extraction solvents on phenolic compounds and antioxidant capacity of hop flowers (*Humulus lupulus* L.). *Acta Horticulturae* **1236**:(0567-7572) DOI:10.17660/ActaHortic.2019.1236.1

Maliar T, Němeček P, Ůrgeová E, Maliarová M, Nesvadba V, Krofta K, Vulganová K, Krošlák E, Kraic J. 2017. Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *Chemical Papers* **71**: (2585-7290) DOI:10.1007/s11696-016-0034-2

Mikyška A, Jurková M. 2019. Varietal specificity of polyphenols, free phenolics and antioxidant potential in hops. *Kvasný Průmysl* **65**: (2570-8619) DOI:10.18832/kp2019.65.178

Mikyška A, Krofta K. 2012. Stanovení antioxidační aktivity chmele, chmelových výrobků a piva: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha:

- Mikyška A, Slabý M, Jurková M, Ktofta K, Patzak J, Nesvatba V. 2013. Saaz Late - The Czech Hop Variety Recommended for Czech Beer. *Kvasný Průmysl* **59**: (00235830). DOI:10.18832/kp2013031
- Mikyška A, Vrzal T, Dušek M, Jurková M, 2018. Factors affecting the polyphenol compounds and antiradical activity of hops: Long-term study of Czech hop varieties. *Kvasný Průmysl* **64**: (0023-5830) DOI:10.18832/kp201839
- Ministerstvo zdravotnictví České republiky, 2019. *Český lékopis 2017*. Grada Publishing, Praha
- Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* **49**: (0891-5849) DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010
- Musialik M, Kuzmich R, Pawłowski T. S, Litwinienko G, 2009. Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids. *The Journal of Organic Chemistry* **74**: (00223263) DOI:10.1021/jo802716v
- Nesvadba V et al. 2013. *Vývoj a tradice českých odrůd chmele*. 2013 edition. Chmelařský institut s.r.o. Žatec, Žatec.
- Nesvatba V, Polončíková Z, Henychová A, Krofta K, Josef Patzak J. 2012. *Atlas českých odrůd chmele*. Žatec: Chmelařský institut
- Nesvatba V, Polončíková Z, Henychová A. 2012. Brewing characteristics of Czech fine aroma hops "Saaz." *Kvasný Průmysl*. **58**: (00235830) DOI:10.18832/kp2012020
- Nešpor J, Hanko V, Karabín M, Jelínek L, Dostálek P. 2017. Prenylated Flavonoids as Valuable Biologically Active Compounds from Hops. *Kvasný Průmysl* **63**:(00235830) DOI:10.18832/kp201719
- Olšovská J, Boštíková V, Dušek M, Jandovská V, Bogdanová K, Čermák P, Boštík P, Mikyska A, Kolář M. 2016. *Humulus Lupulus L. (Hops) - A valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies*. *Military Medical Science Letters* **85**: (03727025). DOI:10.31482/mmsl.2016.004 19-30.
- Paoletti T, Fallarini S, Gugliesi F, Minassi A, Appendino G, Lombardi G. 2009. Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin. *European Journal of Pharmacology* **620**:(00142999) DOI:10.1016/j.ejphar.2009.08.015
- Pietta P., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: (0163-3864) DOI:10.1021/np9904509
- Preedy V. R. 2008. *Beer in Health and Disease Prevention*. London: Academic Press.
- Priet P, Pineda M, Aguilar M, 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* **269**: (00032697) DOI:10.1006/abio.1999.4019
- Prugar J. 2008. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. první*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, Praha.
- Resende F, da Silva Almeida C, Vilegas W, Varanda E. 2014. Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens. *Food Chemistry* **155**:251-255.

Rutnik K, Knez Hrnčič M, Jože Košir I. 2022. Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications. *Food Reviews International* **38**:529-551.

Sadeer N. B, Montesano D, Albrizio S., Zengin G, Mahomoodally M.F. 2020. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* **9**: 2076-3921

Shraim A. M, Ahmed T. A, Rahman Md. M, Yousef M, Hijji Y.M. 2021. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT- Food Science and Technology* **150**:(0023-6438) DOI:10.1016/j.lwt.2021.111932

Singleton V. L, Rossi J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: (0002-9254) DOI:10.5344/ajev.1965.16.3.144

Sun S et al. 2022. Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L.) and their effects on beer-related microorganisms. *Food and Energy Security* **2**: (2048-3694) DOI:10.1002/fes3.367

Štulíková K, Karabín M, Nešpor J, Dostálek P. 2018. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. *Molecules* **23**: (1420-3049). DOI:10.3390/molecules23030660

Tronina T, Popłoński J, Bartmańska A. 2020. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. *Molecules* **25**: (1420-3049) DOI:10.3390/molecules25184201

Tvrdoňová B. 2014. Možnosti alternativního využití chmele na základě obsahu antioxidantů. Brno. Bakalářská práce. Mendelova Univerzita.

Työppönen J, Hakkarainen R. V. J. 2009. Thermal Stability of Vitamin E in Barley. *Acta Agriculturae Scandinavica* **35**:(0001-5121) DOI:10.1080/00015128509435767

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2022. Aktuální plochy chmelnic v České republice. Brno: Ministerstvo zemědělství. Available from: [https://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2022\\_aktualni-plochy-chmelnic-v-cr.html](https://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2022_aktualni-plochy-chmelnic-v-cr.html) (accessed April 2023)

Vergun O, Shymanska O, Ivanišová E, Fishchenko V. 2021. Antioxidant Activity of Extracts of Wild *Humulus lupulus* L. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality* **5**: (25858246) DOI:10.15414/ainh1q.2021.0006

Weber N, Biehler K, Schwabe K, Haarhaus B, Quirin K, Frank U, Schempp C, Wölfl U. 2019. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. *Molecules* **24**:(1420-3049) DOI:10.3390/molekuly24020223

Yuan Y, Qiu X, Nikolić D, Chen S, Huang K, Li G, Pauli G, van Breemen R. 2014. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by hops (*Humulus lupulus*) and hop prenylphenols. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **53**:(0928-0987). DOI:10.1016/j.ejps.2013.12.003.

Zanoli P, Zavatti &. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **116**:383-96 DOI: 10.1016/j.jep.2008.01.011.

Zugravu C. A, Bohiltea R. E, Salmen T, Pogurschi E, Otelea M. R, 2022. Antioxidants in Hops: Bioavailability, Health Effects and Perspectives for New Products. *Antioxidant*. **11** (2076-3921) DOI:10.3390/antiox11020241

Zhang G, Zhang N, Yang A, Huang J, Ren X, Xian M, Zou H. 2021. Hop bitter acids: resources, biosynthesis, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**:(0175-7598) DOI:10.1007/s00253-021-11329-4.

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Stavba chmelové hlávky (Sun et al. 2022) .....	9
Obrázek 2: Lupulinové žlázy nacházející se na pravém listenu (Sun et al. 2022).....	10
Obrázek 3: Chemická struktura hlavních analogů $\alpha$ -hořkých kyselin (Karabín et al. 2016).....	12
Obrázek 4: Chemická struktura hlavních analogů $\beta$ -hořkých kyselin (Karabín et al. 2016).....	12
Obrázek 5: Struktura flavanolů (Gülçin 2012) .....	14
Obrázek 6: Struktura flavan-3-olů (Karabin et al. 2015) .....	15
Obrázek 7: Struktura prenylflavonoidů (Nešpor et al. 2017).....	16
Obrázek 8: Chelátová vazba flavonoidů (Gülçin 2012).....	18
Obrázek 9: Reakce kvercetinu s DPPH radikálem (Gülçin 2012) .....	19
Obrázek 10: Chráněné označení původu.....	19
Obrázek 11: Chmelové šišťice jednotlivých odrůd (Nesvadba et al. 2013) .....	22
Obrázek 12: UV- Vis spektrofotometr (ThermoFisher).....	23
Obrázek 13: Extrakce pod zpětným chladičem (Liebiegův chladič) .....	24

## Seznam schémat

Schéma 1: Sekundární metabolity chmele .....	11
Schéma 2: Princip Folin-Ciocalteuovy metody (Gülçin 2012).....	24
Schéma 3: Reakce flavonoidů s hlinitým iontem (Shraim et al. 2021).....	25
Schéma 4: Reakční mechanismus fosfomolybdenové metody (Sadeer et al. 2020).....	26

## Seznam grafů

Graf 1: Průměrné zastoupení metabolitů v šišťicích chmele (Biendl 2009; Basařová et al. 2021) .....	11
Graf 2: Obsah extrahovatelných látek v gramech .....	28
Graf 3: Celkový obsah fenolických látek – TPC (mg GAE/g).....	28
Graf 4: Celkový obsah flavonoidů – TFC (mg QE/g).....	30
Graf 5: Celkový antioxidační aktivita – TAA (mg AAE/g).....	31

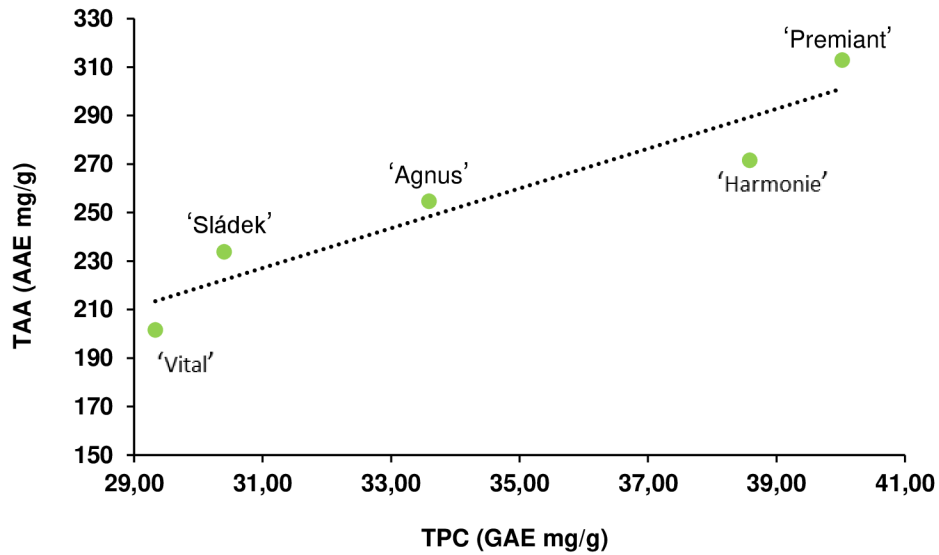
## Seznam tabulek

Tabulka 1: Substituce kruhů C, B hydroxylovými skupinami .....	15
Tabulka 2: Substituce na pyranovém kruhu struktury jednotlivých flavan-3-olů.....	15
Tabulka 3: Substituce struktury jednotlivých prenylflavonoidů .....	16



## Samostatné přílohy

Příloha I. Závislost antioxidační aktivity na obsahu celkových fenolických látek (TPC)



Příloha II. Závislost antioxidační aktivity na obsahu flavonoidů (TFC)

