

8

srpen 1964 - ročník 10

# Kvasný průmysl

ODBORNÝ ČASOPIS PRO PRACOVNÍKY V KVASNÝCH PRŮMYSLECH

## Chmelová tříslovina - Flavonolové glykosidy některých našich a zahraničních odrůd (I. sdělení)

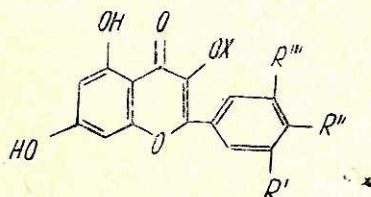
JAROMÍR HUBÁČEK a MILAN TROJNA, Katedra chemická, Vysoká škola zemědělská v Praze

675.04 : 547.98

Specifickou a pivovarsky důležitou součástí chmele je tzv. chmelová tříslovina. Není látkou jednotnou, i když z hlediska analytického je jednoduše mlčky přijímána. Je tvořena komplexem polyfenolických látek [1, 2], které již mnohokrát byly předmětem výzkumu chemického složení chmele, byly sledovány během varního procesu, jakož i v hotovém výrobku nebo až v zákalech piva. U nás uveřejnil souborné pojednání „O polyfenolových látkách při výrobě piva“ v roce 1960 Karel [3] v tomto časopise.

Jednu skupinu komplexu polyfenolických látek chmele představují flavonolové glykosidy, event. jejich aglykony, z nichž byl identifikován kvercitrin [2, 6], izokvercitrin [2, 5], rutin [2, 5], aglykony kvercetin [2, 4, 7, 8] a kempferol [7, 8]. Zůstávala otázka, zda chmel obsahuje i volné aglykony nebo zda jsou přítomny toliko ve formě glykosidů, kterých je kempferol jako aglykon součástí a zda je správná domněnka o přítomnosti myricetinu a jeho glykosidů.

V rámci studia komplexu chmelové třísloviny [9] jsme potvrdili, že chmel [klon 126] obsahuje izokvercitrin a rutin a identifikovali jsme další čtyři glykosidy: kempferol-3-rhamnoglukosid, kvercetin-3-rhamnoglukosid, kempferol-3-rhamnoglukosid a kempferol-3-glukosid (astragalín).



kempferol-3-rhamnoglukosid (A)

$R' = R''' = H; R'' = OH; X = \text{rhamnoglukosyl}$

kvercetin-3-rhamnoglukosid (B)

$R''' = H; R' = R'' = OH; X = \text{rhamnoglukosyl}$

kempferol-3-rhamnoglukosid (C)

$R' = R''' = H; R'' = OH; X = \text{rhamnoglukosyl}$

kvercetin-3-rhamnoglukosid — rutin (D)

$R''' = H; R' = R'' = OH; X = \text{rhamnoglukosyl}$

kempferol-3-glukosid — astragalín (E)

$R' = R''' = H; R'' = OH; X = \text{glukosyl}$

kvercetin-3-glukosid — izokvercitrin (F)

$R''' = H; R' = R'' = OH; X = \text{glukosyl}$

kempferol (G)

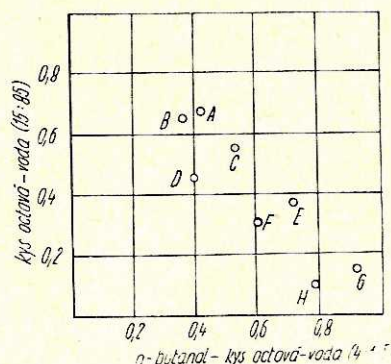
$R' = R''' = H; R'' = OH; X = H$

kvercetin (H)

$R''' = H; R' = R'' = OH; X = H$

V této souvislosti nás zajímala přítomnost uvedených flavonolových glykosidů v našich i dostupných zahraničních odrůdách chmele, jakož i jejich poměrné zastoupení s cílem přispět k poznatkům chemotaxonomie chmele.

Vzorky chmele jsme předextrahovali eterem a vlastní extrakci provedli metanolem. Adsorpcí na polyamidovém prášku (silonu) jsme oddělili polyfenolické látky, které jsme chromatografovali na papíře dvojrozměrně. Skvrny flavonolových glykosidů jsme identifikovali podle chromatografické mapy sestavené z hodnot  $R_f$  prokázaných glykosidů [9] (viz tabulka 1 a obr. 1).



Obr. 1. Chromatografická mapa flavonolových glykosidů



Tabulka 1

Soustava	F <sub>F</sub> — l á t k y							
	A	B	C	D	E	F	G	H
n-butanol-kyselina octová—voda (4 : 1 : 5)	0,42	0,36	0,53	0,40	0,72	0,60	0,92	0,78
kyselina octová— voda (15 : 85)	0,67	0,65	0,55	0,45	0,37	0,30	0,15	0,10

Množství přítomných látek jsme stanovili semikvantitativním odhadem podle velikosti skvrn a intenzity fluorescence v ultrafialovém světle. Výsledky odhadu vyznačujeme u symbolů flavonolových glykosidů křížky, přičemž nejvyšší počet křížků značí množství největší, nejnížší množství nejmenší.

Po stránce kvalitativní jsme zjistili, že zkoumané odrůdy našich i zahraničních chmelů obsahují šest uvedených flavonolových glykosidů (A—F). V žádném z odrůd jsme neprokázali v souhlase s prací *Umedy a Koshihary* [5] kvercitrin, o jehož přítomnosti referuje *Harris* [2] a domníváme se, že došlo k záměně za námi prokázaný kempferol-3-glukosid. Nemůžeme potvrdit domněnku o přítomnosti myricetinu, neboť jsme neprokázali žádný jeho glykosid a ani samotný aglykon po kyselé hydrolyze celého polyfenolického komplexu. Flavonolové aglykony jsou vždy pouze glykosidicky vázané a objevují se někdy na chromatogramech již jako hydrolytický produkt.

Na základě semikvantitativního odhadu poměrného zastoupení flavonolových glykosidů jsme rozdělili 50 zkoumaných odrůd do čtyř skupin.

## První skupina

F	E	D	C	B	A
+++	++	++	+	++	+
+++	+++	++	++		

Krajská odrůda	Očihov u Podbořan
Žatecký červeňák	Pochvalov-Lounské podlesí
Krajská odrůda	Blšany u Podbořan
Krajská odrůda	Libinky, okr. Litoměřice
Krajská odrůda	Hředle, okr. Rakovník
Směs populace	Blšany u Podbořan
Klon 72	Blšany u Podbořan
Klon 72	Dušníky, levý břeh Vltavy
Klon 72	Pokusná stanice VŠZ, Praha
Klon 126	Blšany u Podbořan
Směs klonů a krajské odrůdy	Stekník u Žatce
Směs klonů a krajské odrůdy	Břežany u Žatce
Planý chmel	Žatec
Žitomírský chmel I. tř.	SSSR
Žitomírský chmel II. tř.	SSSR
Žitomírský chmel III. tř.	SSSR
Bačský chmel jakost A	Jugoslávie
Bačský chmel jakost B	Jugoslávie
Alsaský zeleňák	Francie
Alsaský zeleňák	Francie
Burgundský chmel	Francie
Bábský chmel	NSR
Bábský chmel	Sandhausen, NSR
Jurský chmel	NSR
Rýnsko-pfalzský chmel	NSR
Herrsbrucksý horský chmel	NSR
Tettnangský raný červeňák	NSR
Špaltský poloraný červeňák	NSR
Hallertauský poloraný červeňák	NSR

Belgický chmel (původ neznám) Belgie

Fuggle	východní Kent — Anglie
Fuggle	Pokusná stanice VŠZ, Praha
Early Bird Golding	východní Kent — Anglie
Early Bird Golding	Pokusná stanice VŠZ, Praha
Eastwell Golding	východní Kent — Anglie
New Varieties Bramling cross. OT 48	Anglie
Whitbread Golding Variety	východní Kent — Anglie
Golding Variety Tutsham	východní Kent — Anglie
New Varieties Keyworth's Midseason OR 55	Anglie
New Varieties Nothern. Brewers W. F. B. 135	Anglie
Gobbs	východní Kent — Anglie
Oregon Bullions	USA
Oregon Fuggle	USA

## Druhá skupina

C	D	F	E	B	A
+++	++	++	+	++	+
+++	+++	++	++		

New Varieties Bullion Q43 střední Kent — Anglie

## Třetí skupina

F	D	C	E	B	A
+++	++	++	+		
+++	+++	++	++	++	+

Oregon Brewers Gold USA

Grants Pass Oregon Late Cluster USA

## Čtvrtá skupina

D	F	E	C	B	A
+++	++	++	+	++	+
+++	+++	++	++		

Choicest Yakima Seedles USA

Idaho Seedles Early Cluster USA

Yakima Seedles Late USA

Idaho Seedles Late Cluster USA

Všechny odrůdy evropského chmele včetně odrůd Oregon Bullions a Oregon Fuggle z USA až na odrůdu New Varieties Bullion Q 43 z Anglie mají stejné poměrné zastoupení uvedených flavonolových glykosidů. Nejvíce zastoupený izokvercitrin je kompenzován druhým nejhojnějším astragalinem. Rhamnoglukosid kvercetrinu (rutin), v pořadí co do množství třetí, je následován rhamnoglukosidem kempferolu a zcela analogicky je tomu i u obou rhamnodiglukosidů. Ačkoli glykosidy kvercetrinu převládají nad glykosidy kempferolu, jeví se jejich poměr daleko vyváženější než u odrůd Oregon Brewers Gold a Grants Pass Oregon Late z USA, kde obsah rutinu převládá nad obsahem astragalínu. Ještě nevyváženější je poměr mezi glykosidy kvercetrinu a kempferolu u amerických odrůd Seedles, u nichž je nepoměrně vyšší obsah rutinu a izokvercitrinu proti odrůdám evropským. Pouze u anglické odrůdy New Varieties Bullion Q 43 převládá kempferol-3-rhamnoglukosid nad rutinem a izokvercitrinem.

Krátkodobé přenesení odrůd (asi sedmileté) z jedné pěstelské oblasti do druhé nezpůsobuje postihnuteľný rozdíl po stránce kvalitativního a poměrného semikvantitativního obsahu flavonolových glykosidů. Rovněž rozdílná tržní jakost odrůdy nevykazuje odchylky.



### Experimentální část

Všechny vzorky chmele byly ze sklizně r. 1960. Analýza tuzemských vzorků, které poskytl Výzkumný ústav chmelařský v Žatci a Katedra rostlinné výroby Vysoké školy zemědělské v Praze, byla provedena po sklizni, analýza zahraničních vzorků ihned po jejich získání, avšak ještě v témž kalendářním roce.

#### Extrakce

Vzorek 15 g jemně rozemletého chmele byl před-extrahován eterem. Vlastní extrakce byly provedeny za tepla 200 ml metanolu za přidání 2 g uhlíkatu vápenatého do extrakční baňky. Extrahováno bylo 36 hodin. Metanolicový extrakt byl po filtraci zředěn 75 ml vody, metanol oddestilován ve vakuu pod dusíkem a vodný extrakt ponechán v chladu do druhého dne. Vyloučené zbytky chlorofylu byly odfiltrovány.

Oddělení polyfenolických látek polyamidovým práškem (silonem)

Polyamidový prášek (Severočeské chemické závody, n. p., Lovosice, závod Rudník u Vrchlabí) byl dekantován vodou, promyt metanolem a acetonem a pak opět vodou a usušen při teplotě místnosti. Před použitím byl vždy suspendován na dvě hodiny ve vodě.

Vodný extrakt vzorku byl přilít do suspenze 20 g polyamidového prášku v 70 ml vody a za občasného promíchání ponechán v klidu 3 hodiny. Pak byla suspenze třikrát dekantována 70 ml vody a za odsávání promyta dalšími 150 ml. Polyfenolické látky byly eluovány třikrát po sobě provedenou dekantací 75 ml 65% vodného acetonu za občasného promíchání vždy v intervalech 2 hodiny. Acetonový extrakt byl zahuštěn ve vakuu pod dusíkem a dosušen v exsikátoru nad chloridem vápenatým. Po rozpuštění v 2 ml metanolu byl nanášen na chromatografický papír.

#### Papírová chromatografie

Dvojrozměrná papírová chromatografie byla prováděna za běžné laboratorní teploty v sestupném uspořádání. Nejprve bylo vyvíjeno v delším směru papíru v parách vodné fáze soustavy *n*-butanol—kyselina octová—voda (4:1:5) organickou fází soustavy a poté v kratším směru přímo v parách jednofázové soustavy kyselina octová—voda (15:85). Vzorky byly nakapávány dvojmo v odstupňovaných množstvích 10, 15, 20 a 25  $\mu$ l na papír Whatman č. 1 (celkem po osmi chromatogramech) a chromatogramy syceny 24 hodin v chromatografické komoře.

Semikvantitativní odhad byl proveden porovnáním velikosti skvrn a intenzity hnědočervené fluorescence před detekcí na všech osmi chromatogramech. Dále podle jasně žluté fluorescence na čtyřech chromatogramech po detekci 1% etanolickým roztokem chloridu hlinitého a nakonec podle sytě žluté fluorescence na zbývajících čtyřech chromatogramech po detekci 1% metanolickým roztokem zirkonylchloridu vždy v ultrafialovém světle.

#### Diskuse

Identifikace odrůd kulturních plodin je obecně velkým problémem. Při jejich taxonomii se vedle hlediska botanického uplatňuje i hledisko chemické, pro které však nejsou vhodné obecně rozšířené látky (primární) jako škrob, bílkoviny, resp. aminokyseliny, cukry, lignin apod. Vhodnější a mnohem jednoznačnější jsou látky specifické (sekundární) jako pryskyřice, silice, třísloviny apod. Ovšem

i u těchto látek jsou často jejich velké skupiny sobě blízké a ve vzájemném genetickém vztahu, takže jejich celkový obsah bývá jako kritérium pro odlišení velmi problematický, uvážíme-li řadu faktorů, které jej mohou ovlivnit. Je proto nutné sledovat dílčí sobě bližší skupiny nebo až jednotlivé látky, event. látky málo rozšířené. Z jedné skupiny jsou látky jednodušší více rozšířeny než látky složitě.

V tomto ohledu skýtají velkou pomoc chromatografické metody na papíře nebo na tenkých vrstvách, kterými byly prováděny taxonomické studie u rostlin i živočichů. Podařilo se tak odlišit rod [10], druh [11, 12, 13], čeleď nebo odrůdu [14, 15, 16].

Z těchto hledisek málo studovanou skupinu sekundárních látek představují flavonoidy. Byly předmětem taxonomie u odrůd tykve [17], citronů [14], vodních melounů, okurek i hrachu [18]. I když se často nepodařilo odlišit až jednotlivé odrůdy, podařilo se je alespoň rozdělit do méně početných skupin.

Na základě těchto poznatků se pokoušíme o dílčí chemotaxonomii dostupných chmelových odrůd, i když k ní má být použito podle možností všech látek. Pokoušíme se problematiku řešit indukční metodou.

Vyšli jsme z poznatků, že dosud k těmto účelům používaná jednorozměrná papírová chromatografie je méně vhodná zejména pro přímé zpracování extraktu pro přítomnost zpravidla velkého počtu polyfenolických látek. Jejich rozlišení před i po detekci je obtížné, neboť se na chromatogramech silně překrývají. Zvolili jsme proto dvojrozměrnou chromatografii polyfenolických látek, oddělených na polyamidovém prášku. Získali jsme čistší chromatogramy a dosáhli dobrou reprodukovatelnost výsledku, která by mohla být větším množstvím nečistot často podstatně snížena.

V uvedených pracích byly při taxonomii sledovány flavonoidní látky v celé šíři, i když podstatná část skvrn na chromatogramech nebyla identifikována a bylo pouze využíváno jejich intenzivní fluorescence před a po detekci. Při našem pokusu jsme vycházeli pouze z jedné skupiny flavonoidů — flavonolových glykosidů proto, že typické představitele známe [9], můžeme je identifikovat a rozšířili jsme pozorování o jejich semikvantitativní odhad. Ten pokládáme za důležitý proto, že kulturní chmel vznikl staletým přirozeným a umělým výběrem z chmele planého. Odlišné prostředí pěstitelských oblastí vtiskly chmeli, dlouholetým působením pro ten či onen kraj, typický charakter a krajové odrůdy se liší po chemické stránce spíše kvantitativním než kvalitativním obsahem látek [19].

Ze skupiny 50 odrůd chmele domácích i zahraničních se nám podařilo vyčlenit individuálně pouze jednu odrůdu — New Varieties Bullion Q 43 z Anglie. Nejpočetnější skupinou se stejným zastoupením flavonolových glykosidů jsou evropské chmele, zatímco řada amerických odrůd vykazuje odlišné zastoupení.

Domníváme se, že studium dalších skupin polyfenolických látek přinese hlubší specifikaci odrůd.

#### Literatura

- [1] Harris G.: J. Inst. Brew. 59, 121 (1953).
- [2] Harris G.: J. Inst. Brew. 62, 390 (1956).
- [3] Karel V.: Kvasný průmysl 6, 193 (1960).
- [4] Wagner J. R.: Jahresber. Chem. 585 (1859).
- [5] Umeda J., Koshihara M.: Proc. Japan Acad. 30, 387 (1954).
- [6] Vancraenenbroeck R., Lontie R.: Bull. Anciens etud. Brass. Univ. Louvain, 51, 1 (1957).
- [7] Lebreton P.: Pet. J. Brasseur 65, 275 (1957).



- [8] Lebreton P.: Brasserie 13, 104 [1958].  
 [9] Hubáček J., Trojna M.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. 29, 1259 [1964].  
 [10] Micks D. W.: Nature 174, 217 [1954].  
 [11] Buzzati-Travers A. A.: Nature 171, 575 [1953].  
 [12] Buzzati-Travers A. A., Rechnitzer A. B.: Science 117, 58 [1953].  
 [13] Kirk R. L., Main A. R., Beyer F. G.: Biochem. Journal 57, 440 [1954].  
 [14] Selle R. M.: Nature 174, 140 [1954].  
 [15] Selle R. M.: Nature 181, 506 [1958].  
 [16] Singh K.: Investigations on the Identification of Vegetable Varieties by Paper Chromatography. Master's Thesis, University of Florida, Gainesville, Fla, 1960.  
 [17] Barber G. A.: Arch. Biochem. Biophys. 64, 401 [1956].  
 [18] Singh K., Thompson B. D.: Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 77, 520 [1961].  
 [19] Kotrlá M.: Kandidátská disertační práce, VŠCHT, Praha.

Došlo do redakce 5. 3. 1964.

ТАННИДЫ В ХМЕЛЕ.  
 ФЛАВОНОЛЕВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ  
 В НЕКОТОРЫХ СОРТАХ  
 ЧЕХОСЛОВАЦКОГО И ЗАГРАНИЧ-  
 НОГО ХМЕЛЯ. ЧАСТЬ I.

При помощи полиамидного порошка были выделены из большой группы полифеноловых веществ флавонол-гликозиды, которые подверглись качественному анализу, а также приблизительной количественной оценке. Отдельные составляющие были идентифицированы методами двухразмерной бумажной хроматографии. Анализ 50 сортов чехословацкого и заграничного хмеля доказывает, что у большинства европейских сортов (за исключением английского сорта New Varieties Bullin Q 43) содержание изучаемых гликозидов примерно одинаково, в то время как у сортов американских состав гликозидов носит другой характер.

HOPFENGERBSTOFF — FLAVONOIDE  
 GLUKOSIDE EINIGER BÖHMISCHEN  
 UND AUSLÄNDISCHEN  
 HOPFENSORTEN  
 (I. Mitteilung)

Es wurde die qualitative Analyse und semiquantitative Schätzung der flavonoiden Glukoside durchgeführt welche mittels Polyamidpulver aus der ganzen Polyphenolgruppe abgetrennt wurden. Zur Identifikation der einzelnen Stoffe dieser Gruppe wurde die zweidimensionale Papierchromatographie benutzt. Durch die Analysen von 50 hiesigen und ausländischen Hopfensorten konnte die gleiche Vertretung der flavonoiden Glykoside bei den meisten europäischen Hopfen bewiesen werden (mit der einzigen Ausnahme der englischen Hopfensorte New Varieties Bullin Q 43); mehrere amerikanische Hopfen weisen jedoch eine unterschiedliche Vertretung auf.

TANNINS IN HOPS. FLAVONOLE  
 GLYCOSIDES PRESENT IN SOME  
 CZECHOSLOVAK AND FOREIGN HOP  
 VARIETIES

Part 1

By means of polyamide powder flavonole glycosides were separated from a large group of polyphenolic substances and analysed. Besides qualitative analyses semiquantitative methods were applied, too to estimate approximate percentage of various components. Individual components were identified by means of two-dimensional paper chromatography. Analyses of 50 hop varieties indicate that in a large majority of the Czechoslovak and other European varieties (with one exception, viz. English variety New Variety Bullin Q 43) the composition of the glycoside group is practically the same, whereas American varieties are distinctly different and have in this respect specific character.