

## SLOŽKY CHMELE S ESTROGENNÍMI ÚČINKY A JEJICH VYUŽITÍ

## HOP CONSTITUENTS WITH ESTROGENIC EFFECTS AND THEIR EXPLOITATION

MICHAL KUŘEC, PAVEL HOFTA, PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

e-mail: Pavel.Dostalek@vscht.cz

**Kuřec, M. – Hofta, P. – Dostálek P.: Složky chmele s estrogenními účinky a jejich využití.** Kvasny Prum. 51, 2005, č. 10, s. 342–347.

V přehledném článku jsou shrnuty poznatky o estrogenním účinku látek chmele, jejich struktury, biosyntézy a jejich osudu během pivovarského procesu. Hlavní pozornost je věnována 8-prenylaringenin a jeho prekurzoru desmethylxanthohumolu. V článku je rovněž pojednáno o stanovení těchto látek a stanovení jejich estrogenního účinku. Rovněž je diskutována možnost přípravy potravních doplňků z chmele.

**Kuřec, M. – Hofta, P. – Dostálek P.: Hop constituents with estrogenic effects and their exploitation.** Kvasny Prum. 51, 2005, No. 10, p. 342–347.

This review deals with a survey of hop substances with estrogenic effect, their structures, biosynthesis and their fate during brewing process. Main attention was done to 8-prenylaringenin and its precursor – desmethylxanthohumol. Determination of these substances and determination of their estrogenic effects is discussed in this paper. Preparation of food supplements based on hop is discussed, too.

**Kuřec, M. – Hofta, P. – Dostálek, P.: Die Hopfenkomponente mit**

**Klíčová slova:** chmel, estrogenní aktivita, xanthohumol, desmethylxanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylaringenin, 8-prenylaringenin

Hlávky samičích rostlin chmele (*Humulus lupulus* L.) čeleď Cannabinaceae jsou jednou ze základních surovin na výrobu piva. Chmel dává pivu jeho typickou hořkost, plnost chuti a vůni. Kromě toho obohacuje pivo o řadu jiných významných látek, které zvyšují jeho hodnotu z pohledu moderního lékařství a farmakologie. Jedná se většinou o látky polyfenolové povahy, z nichž některé mají silné antioxidantní, antikarcinogenní, protimikrobiální a také estrogenní vlastnosti. Vedle sóji a jetele je chmel jedním z nejbohatších přírodních zdrojů fytoestrogenů. Tato estrogenní aktivita je přisuzována prenylovaným, ale i geranylovaným flavonoidům, hlavně pak 8-prenylaringenin, který patří mezi nejsilnější rostlinné estrogény neboli fytoestrogény vůbec [1, 6, 7, 8, 9, 17, 18]. Další látky, u nichž byla pozorována určitá estrogenní aktivita, jsou 6-prenylaringenin, 8-geranylnaringenin a 6,8-diprenylaringenin [2].

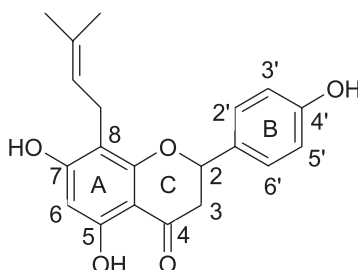
## Estrogeny a fytoestrogeny

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které se tvoří především ve vaječnících, ale také jsou tvořeny v kůře nadledvin a v tukové tkáni. Estrogeny jsou zodpovědné za růst pohlavních orgánů, jako je děloha a pochva, a pohlavních znaků, jako je ochlupení či vývoj prsu. Hladina estrogenů v krvi kolísá s menstruačním cyklem. Estrogeny patří mezi steroidní hormony a mohou ovlivňovat řadu funkcí v těle. Při menstruačním cyklu způsobují estrogény růst děložní sliznice, a tím ji připravují na přijetí oplodněného vajíčka, mění strukturu hlenu děložního krčku,

aby byl usnadněn průchod spermií do dělohy, ovlivňují zadržování vody v těle, kostní metabolismus, hladinu cholesterolu v krvi a mnoho dalších funkcí. Přírodním estrogenem je zejména estradiol, dále pak estriol a estron. V některých případech se estrogény podávají ženám po přechodu v lékové formě [3]. Fytoestrogeny pomáhají údajně při klimakterických potížích, při poruchách menstruace, při depresích, zvýšené únavě, bolestech hlavy, migrénách a podobně [1, 6, 7, 8, 9].

## 8-prenylaringenin a příbuzné látky

8-prenylaringenin, 6-prenylaringenin, 8-geranylnaringenin a 6,8-diprenylaringenin řadíme mezi látky flavonoidní povahy, které patří do rozsáhlé rodiny rostlinných fenolů obsahujících v molekule dvě benzenová jádra spojená trojhlíkatým řetězcem v uspořádání C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub>. Jejich struktura je odvozena od skeletu heterocyklického flavanu.



Obr. 1 8-prenylaringenin [1]

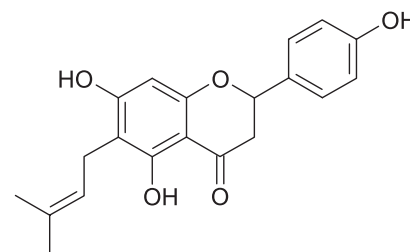
den Estrogenwirkungen und ihre Ausnützung. Kvasny Prum. 51, 2005, Nr. 10, S. 342–347.

In diesem übersichtlichen Artikel werden die bisherige Erkenntnisse über Estrogenwirkungen von Hopfenkomponenten, ihre Struktur, Biosynthese und Schicksal während des Brauprozesses zusammengefasst. Die Hauptaufmerksamkeit ist dem 8-Prenylaringenin und seinem Prekursor Desmethylxanthohumol gewidmet. Weiter wurde es über die Ermittlung von diesen Hopfenkomponenten und ihre Estrogenwirkungen behandelt, weiterhin auch die Möglichkeit der Vorbereitung eines Nahrungsmittelnachtrages aus Hopfen diskutiert.

**Куржец, М. – Гофта, П. – Досталек, П.: Содержимые в хмеле компоненты, имеющие эстрогенное влияние и их использование.** Kvasny Prum. 51, 2005, No. 10, стр. 342–347.

Наглядным образом в статье подытожены знания о эстрогенном влиянии веществ содержащихся в хмеле, их структуре, биосинтезе и их поведении в течение производства пива. Главное внимание уделяется 8-пренилларингенину и его прекурзору десметилксантогумолу. Рассматривается определение этих веществ и их эстрогенного влияния. В дискуссии обсуждается возможность их использования в производстве продовольственных добавок из хмеля.

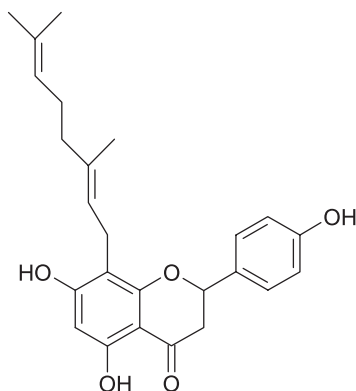
**Keywords:** hop, estrogenic activity, xanthohumol, desmethylxanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylaringenin, 8-prenylaringenin



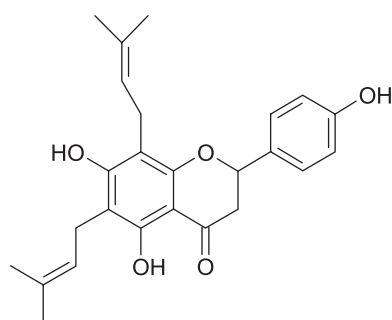
Obr. 2 6-prenylaringenin [1]

Látky s estrogenní aktivitou konkrétně zařazujeme do skupiny tzv. flavanonů, které vznikají izomerací z chalconů (obr. 7) [1].

Prvním krokem v biosyntéze flavanonů je kondenzace p-kumaroylCoA s třemi molekulami malonylCoA za vzniku chalconaringenin (obr. 5). Tento krok katalyzuje enzym chalkonsyntasa. Gen chalkonsyntasy byl klonován z chmele a je součástí multigenové skupiny, která obsahuje přinejmenším 6 genů. Biosyntéza pokračuje enzymatickou konverzí chalconu na flavanon, (2S)-naringenin, účinkem chalkonisomerasy (obr. 7). Izomerace také může proběhnout spontánně nebo být indukována tepelně, a dává směs dvou enantiomerů (2R)- a (2S)-naringenin. Prekurzor 8-prenylaringenin a 6-prenylaringenin se jmenuje desmethylxanthohumol. Vzniká prenylací A-kruhu chalconu pomocí dimethylallyldifosfátu (DMAPP) (obr. 6). Tato reakce je katalyzována enzymem aromatičká prenyltransferasa. O tomto enzymu není zatím mnoho informací, ve chmelu byly detekovány aromatické prenyltransferasy ka-



Obr. 3 8-geranyl naringenin [1]



Obr. 4 6,8-diprenyl naringenin [1]

talyzující postupnou prenylací meziproductů v biosyntéze humulonů a kohumulonů [2].

Prenylované naringeniny jsou přirozenou součástí čerstvého chmele. Avšak většina naringeninů v konečném produktu, pivu, vznikla ze svých prekurzorů spontánní nebo tepelně indukovanou izomerací ve vodných roztocích během technologických úprav (obr. 7). Měření obsahu desmethylxanthohumolu a 6- a 8-prenyl naringeninů v čerstvých a starších chmelových extraktech bylo potvrzeno, že hladina desmethylxanthohumolu je mnohem vyšší u čerstvého chmelového extraktu, a tedy že poté dochází k jeho přeměně na 6- a 8-prenyl naringeniny. Bylo také zjištěno, že desmethylxanthohumol má ve varném kotli poločas rozpadu menší než 5 minut [4].

Tab. 1 Obsah prenylflavonoidů v pivu měřením metodou LC-MS/MS [5]

Druh piva	8-prenyl naringenin (μg/l)	Desmethylxanthohumol (μg/l)
americký ležák-pilsner	13	590
americký ležák-pilsner	14	750
americký ležák-pilsner	17	460
americký porter	240	2900
americký strong ale	110	4000
evropský stout	69	2680
evropský pilsner	21	680

Metodou LC-MS/MS (kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií) byly změřeny koncentrace 8-prenyl naringeninů a desmethylxanthohumolu v pivech, pocházejících z trhu v USA v roce 1999 (tab. 1) [5]. Z tabulky je zřejmé, že v jiných typech piv, než je světlý ležák, je obsah těchto látek obecně vyšší. U všech piv byla změřená hodnota desmethylxanthohumolu mnohem vyšší než 8-prenyl naringenin.

Nízká hodnota nebo i absence některých prenylflavonoidů v některých pivech je připisována použití chmelového extraktu získaného superkritickou fluidní extrakcí oxidem uhličitým. Na rozdíl od hořkých kyselin 8-prenyl naringenin a další prenylflavonoidy nejsou tímto způsobem extrahovány [5].

Ještě nedávno nebylo mnoho informací o metabolismu 8-prenyl naringeninů a jiných prenylovaných flavonoidů. V roce 2001 bylo provedeno měření a analýza metabolitů 8-prenyl naringeninů, které byly zpracovány kyslími jaterními buňkami. V současné době již máme informace o tom, jak je 8-prenyl naringenin transformován působením lidských jaterních buněk.

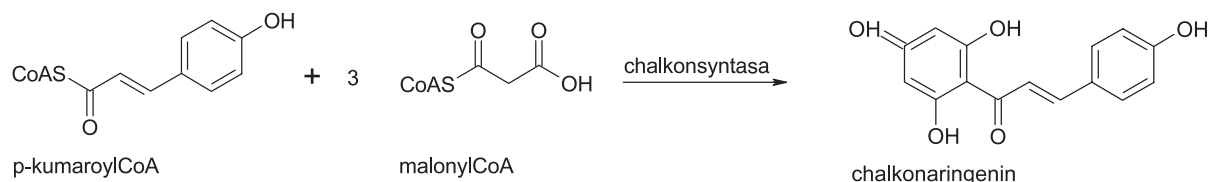
Byly studovány metabolické změny 8-prenyl naringeninů a bylo charakterizováno 11 metabolitů. Tyto metabolity byly identifikovány pomocí HPLC-MS/MS a srovnány se standardy. Čtyři z nich (obr. 8-A, B, C, D) vznikly oxidací prenylového řetězce, další tři (obr. 9-F, G, H) jsou cyklické produkty vznikající z meziproductu s epoxidovou strukturou (obr. 9-E) a poslední čtyři byly identifikovány jako dihydroflavonol, 8-prenylchromon (obr. 10), 8-prenylapigenin (obr. 11) a hydroxylovaný analog 8-prenyl naringeninů se substituentem na B-cyklu, 8-prenyleryodictyol (obr. 12). Hlavní oxidační proces se odehrává na terminální methylové skupině prenylu a ze dvou možných vznikajících produktů je *trans*-izomer hojněji zastoupen a je také stabilnějším izomerem. Tato oxidace prenylu je nejběžnější metabolická cesta. Biologická aktivita těchto alkoholů 8-prenyl naringeninů nebyla dosud zjištěna. Metabolit s aldehydickou skupinou (obr. 8-D) je produktem vznikajícím z primárních alkoholů (obr. 8-A, B, C) a byl nalezen pouze v *trans*-formě. Dvojná vazba na prenylovém zbytku je také oxidována na epoxid, který je otevřen intramolekulovou reakcí s nejbližší hydroxylovou skupinou. Další metabolity zahrnují oxidaci na pozici C3, jejíž výsledkem je nenasycený C-kruh a metabolit se nazývá 8-prenylapigenin (obr. 11).

Studie tedy ukázaly, že 8-prenyl naringenin je transformován na širokou řadu metabolitů. Některé z těchto produktů mohou však mít jinou farmakologickou aktivitu a účinek než jejich prekurzor [6].

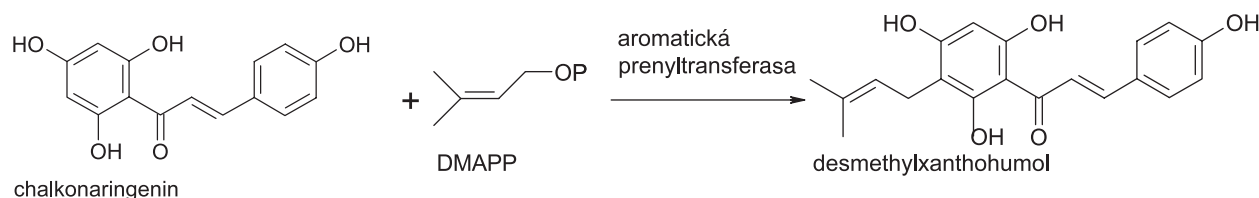
Velice zajímavá je i skutečnost, že isoxanthohumol může být lidským tělem metabolizován na 8-prenyl naringenin [15].

## Estrogenní aktivita prenylflavonoidů

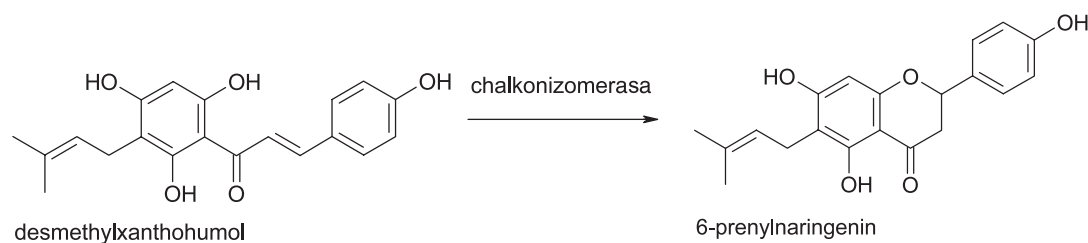
Estrogenní aktivita chmele byla rozpoznána již před několika desítkami let [14]. Na konci 80. let bylo zjištěno, že desmethylxanthohumol je identický s látkou, která byla již dříve považována za proestrogen a že tedy desmethylxanthohumol je proestrogen, z něhož vznikají spontánní bazicky katalyzovanou cyklizací 6- a 8-prenyl naringeniny. Princip aktivního estrogenního působení zůstal neobjasněn, dokud nebyl 8-prenyl naringenin



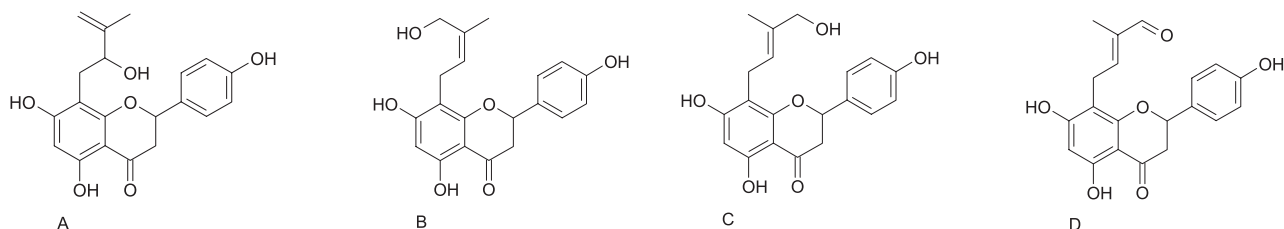
Obr. 5 Biosyntéza chalconaringenu [2]



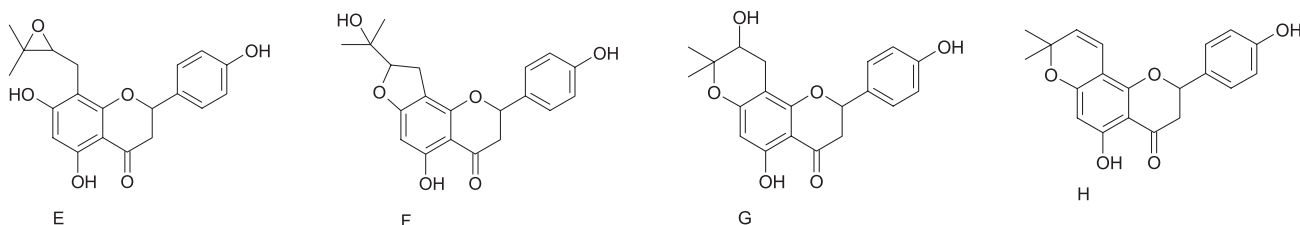
Obr. 6 Biosyntéza desmethylxanthohumolu [2]



Obr. 7 Izomerace desmethylxanthohumolu na 6-prenylnaringenin [2]



Obr. 8 Produkty metabolismu s necyklickým oxidovaným prenylovým řetězcem [6]



Obr. 9 Produkty metabolismu epoxidového původu [6]

izolován použitím biologicky aktivních látek, díky nimž se podařilo frakcionovat estrogenní látky. 8-Prenylnaringenin dokonce vykazoval vyšší estrogenní aktivitu než dosud známé estrogeny coumestrol, genistein a daidzein. Ačkoliv je 8-prenylnaringenin mnohem slabší estrogen než ženský 17 $\beta$ -estradiol, je nakonec nejsilnějším dosud známým fytoestrogenem [2].

Estrogenní aktivita byla zjišťována použitím lidských buněk Ishikawa Var I ( $c = 2,5 \cdot 10^4$  buněk/100  $\mu$ l). Na destičku s 96 jamkami bylo do každé jamky nakapáno estrogenní médium s lidskými buňkami Ishikawa Var I. Pro ohodnocení specifické odezvy byl do některých jamek dán anti-estrogen ICI. Chmelový extrakt a standardy sledovaných estrogenních látek byly rozpuštěny v roztoku ethanolu. Tento roztok byl pak přidán do každé jamky.

Ishikawa Var I buňky obsahují enzym alkalickou fosfatasy, jejíž účinek je stimulován látkami s estrogenní aktivitou. Aktivita alkalické fosfatasy se zjistí po 72-hodinovém monitorování reakce přeměny p-nitrofenylfosfátu na p-nitrofenol a měřením rychlosti

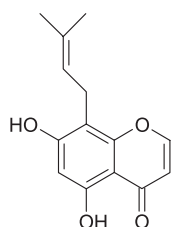
vzniku p-nitrofenolu. Tato rychlost je vyhodnocena z hodnot absorpance vzniklého p-nitrofenolu při 405 nm, která s rostoucí koncentrací stoupá (obr. 13, obr. 14) [7].

Ke stanovení estrogenní aktivity látek se také široce používá analýza pomocí lidského receptoru (ER $\alpha$ ) na kvasinkové buněčné stěně. Kvasinkový kmen (*Saccharomyces cerevisiae*) obsahuje na své buněčné stěně rekombinovaný lidský estrogenní receptor. Také obsahuje plazmid s DNA-sekvencí citlivou na estrogen (regulační sekvence, která váže steroidní hormony, a tím se mění intenzita transkripce). Plazmid obsahuje gen na syntézu enzymu  $\beta$ -galaktosidasy. Estrogenní aktivita pak může být zjištěna přímo spektrofotometricky.  $\beta$ -Galaktosidasa hydrolyzuje bezbarvý chromogenní substrát (chlorfenolová červeň glykosidicky vázaná s  $\beta$ -galaktopyranosou) na barevný produkt (chlorfenolová červeň). Absorbance vznikajícího barevného produktu se pak měří při 540 nm. Měřením koncentrace absorbujícího produktu se zjistí indukce daného genu, tím je i změřena afinita sloučeniny vůči receptoru ER $\alpha$  a tím i estrogenní aktivita [8].

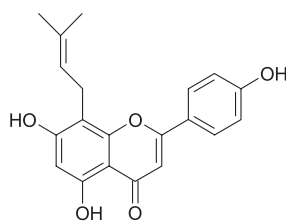
Existují dva typy lidských estrogenních receptorů – ER $\alpha$ , ER $\beta$ . Vzájemně se liší svou strukturou, ale nebyly zjištěny odlišnosti v jejich funkcích. 8-Prenylnaringenin se vyskytuje ve dvou enantiomerních formách – 2R, 2S. Oba mají podobnou estrogenní aktivitu na receptory umístěné na kvasinkové buněčné stěně. Při působení na estrogenně citlivé Ishikawa Var I buňky bylo zjištěno, že oba enantiomery 8-prenylnaringeninu vykazují vysokou afinitu a silnou selektivitu k  $\alpha$  formě estrogenního receptoru oproti  $\beta$  formě. Tato afinita enantiomerů k ER $\alpha$  byla změřena 3,6krát vyšší než k ER $\beta$ . 2S(-)-8-prenylnaringenin vykazuje celkově vyšší afinitu k oběma receptorům než 2R enantiomer [9].

Bylo prokázáno, že 8-prenylnaringenin (8-pn) vykazuje nejvyšší afinitu k ER $\alpha$  receptoru ze všech rostlinných estrogenů [9]:

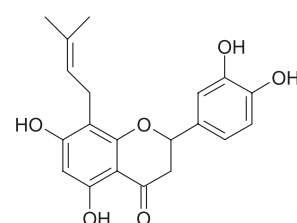
- 8-pn je asi 10-krát silnější estrogen než coumestrol (měřeno in vitro s použitím rekombinovaných lidských receptorů)
- 8-pn je asi 100-krát silnější estrogen než genistein (měřeno in vitro)
- 8-pn je asi 70-krát slabší estrogen než 17 $\beta$ -estradiol (měřeno in vitro)



Obr. 10 8-prenylchromon [6]



Obr. 11 8-prenylapigenin [6]



Obr. 12 8-prenyleriodictyol [6]

Tab. 2 Retenční časy vybraných prenylflavonoidů zjištěné metodou HPLC [5]

Název sloučeniny	Retenční čas (min)
Isoxanthohumol	9,13
8-Prenylnaringenin	11,63
Desmethyloxanthohumol	12,45
6-Prenylnaringenin	13,27
Xanthohumol	14,18
6-Geranylnaringenin	16,82

Tab. 3 Hodnoty poměrů m/z vybraných prenylflavonoidů naměřených metodou MS/MS [5]

Název sloučeniny	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)
Xanthohumol	355	179
Isoxanthohumol	355	179
8-Prenylnaringenin	341	165
Desmethyloxanthohumol	341	165
6-Prenylnaringenin	341	165
6-Geranylnaringenin	409	165

– 8-pn je asi 20000-krát slabší estrogen než 17 $\beta$ -estradiol (měřeno in vivo z děložní sliznice nedospělých samic krys) [9].

#### Analytika prenylflavonoidů

Pokud analyzujeme obsah prenylflavonoidů v chmelu, je nutná methanolová extrakce. Snažíme se omezit extrakční a čisticí kroky na minimum a následně využít na separaci kapalinovou chromatografii nebo plynovou chromatografii a následnou MS/MS detekci [5, 16]. U plynové chromatografie je poměrně náročnější fáze čištění extraktu, a zejména se používá ještě následná sililace pro zvýšení těkavosti [16]. Při kapalinové chromatografii prenylflavonoidů se používá kolona s reverzní fází C<sub>18</sub> a gradientová eluce: A- acetonitril, B- 1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě. Při vlastní analýze jsou aplikovány dva kroky: 1. 40 %-100 % B v A po dobu 15 minut a 2. 100 % B po dobu 5 minut při průtokové rychlosti 0,8 ml/min [5].

Retenční časy jednotlivých vybraných sloučenin odečtené z chromatogramu jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 2) [5]. Pro vlastní koncovku se používá metoda MS/MS.

Analytická metoda MS/MS (tandemová

hmotnostní spektrometrie) se využívá ke kvalitativní a kvantitativní analýze mnoha sloučenin, a je také ve spojení s HPLC ideální metodou pro analýzu prenylflavonoidů z chmele a piva. Tato metoda umožňuje velmi selektivní detekci těchto látek v surovém chmelovém extraktu bez většího přečištění. V hmotnostním spektrometru jsou jednotlivé sloučeniny ionizovány, a vzniklé ionty jsou separovány podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z. Ionizace vzorku nastává zpravidla nárazem prudce letících elektronů nebo je využita ionizace, kdy ionty vznikají chemickou reakcí.

MS/MS je technika detekce, při které jsou prvním spektrometrem separovány sloučeniny podle rozdílného poměru m/z (tzv. parent ion). Před vstupem do druhého spektrometru dochází k jejich kolizi se svazkem elektronů a sloučeniny jsou rozbity na fragmenty. Tyto fragmenty jsou pak druhým spektrometrem separovány podle hodnot m/z (tzv. daughter ion). Hodnoty m/z jednotlivých sloučenin jsou uvedeny v tabulce (tab. 3). Tato metoda ale nedokáže rozlišit rozdíly u dvou sloučenin se stejnou relativní molekulovou hmotností (např. izomery 6- a 8-prenylnaringenin nebo xanthohumol a isoxanthohumol). Tyto látky se také štěpí na stejné

fragmety. Proto je nutné před analýzou metodou MS/MS nejprve tyto sloučeniny separovat pomocí HPLC [5].

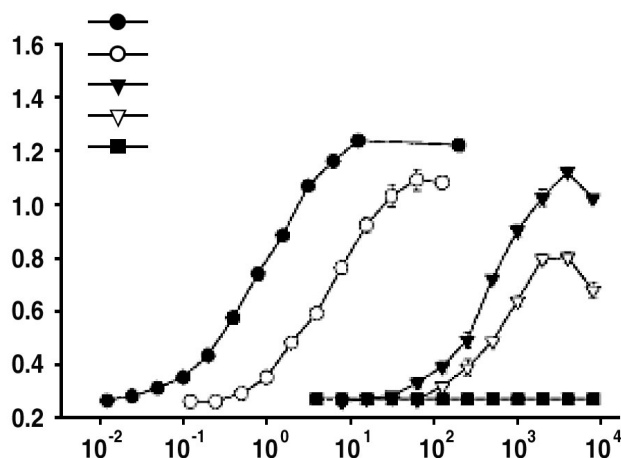
Dalšími metodami stanovení prenylflavonoidů jsou imunochemické metody, z nichž nejlepší výsledky dává metoda RIA (Radio Immuno Assay) [19]. Pro vyvolání imunitní odezvy na přípravu protilátky je nutno prenylnaringenin vázat na hapteny [15].

#### Syntéza 8-prenylnaringeninu

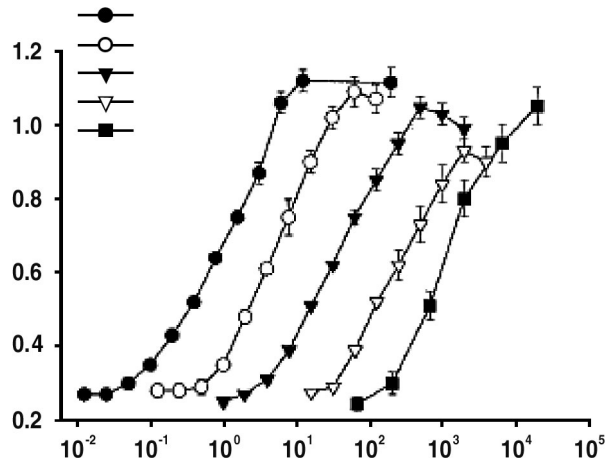
8-Prenylnaringenin (1, obr. 15) je vzhledem ke svým biologicky významným aktivitám velmi žádanou, a proto také komerčně ne nejlevnější látkou. Jeho separace, přečištění, identifikace nejsou nejjednoduššími a nejjednoduššími operacemi. Navíc není obsah 8-prenylnaringeninu v přírodních zdrojích významný, spíše se objevuje ve stopových množstvích. Proto se využívá k jeho syntéze komerčně dostupný citrusový flavonoid naringenin (3, obr. 15). Naringenin je tedy výchozí látkou k syntéze 8-prenylnaringeninu, který vzniká spolu s 6-(1,1-dimethylallyl)naringeninem (2, obr. 15) jako racemická směs užitím prenylalkoholu. Jde o čtyřstupňovou reakci, která vede k celkovému výtěžku 42-45 % 8-prenylnaringeninu. Tento postup byl použit k vůbec první syntéze 6-(1,1-dimethylallyl)naringeninu [10].

Prvním krokem je chemoselektivní acetylace fenolických hydroxylových skupin v polohách C7 na A-kruhu a C4' na B-kruhu (obr. 7), která probíhá v přítomnosti pyridinu. Tento krok vede k racemické směsi naringeninu a acetylovaného analogu naringeninu (4, obr. 15) v objemovém poměru 19:81. Acetylaci je položen základ k instalaci potřebného prenyletheru na pozici C5 A-kruhu. Zatímco pokus o prenylaci acetylovaného naringeninu prenylbromidem v přítomnosti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se setkal s větším potížením, reakce s prenylalkoholem hladce vede k požadovanému produktu O-prenyldiacetátnaringeninu (5, obr. 15) v dobrém výtěžku (74 %).

Nekatalytický termální přesmyk O-prenyldiacetátnaringeninu (5, obr. 15) na diacetátprenylnaringenin (6, obr. 15) probíhá ve zpětném toku (refluxu) dekalínu. Po dvouhodinovém refluxu v dekalínu je veškerá látka

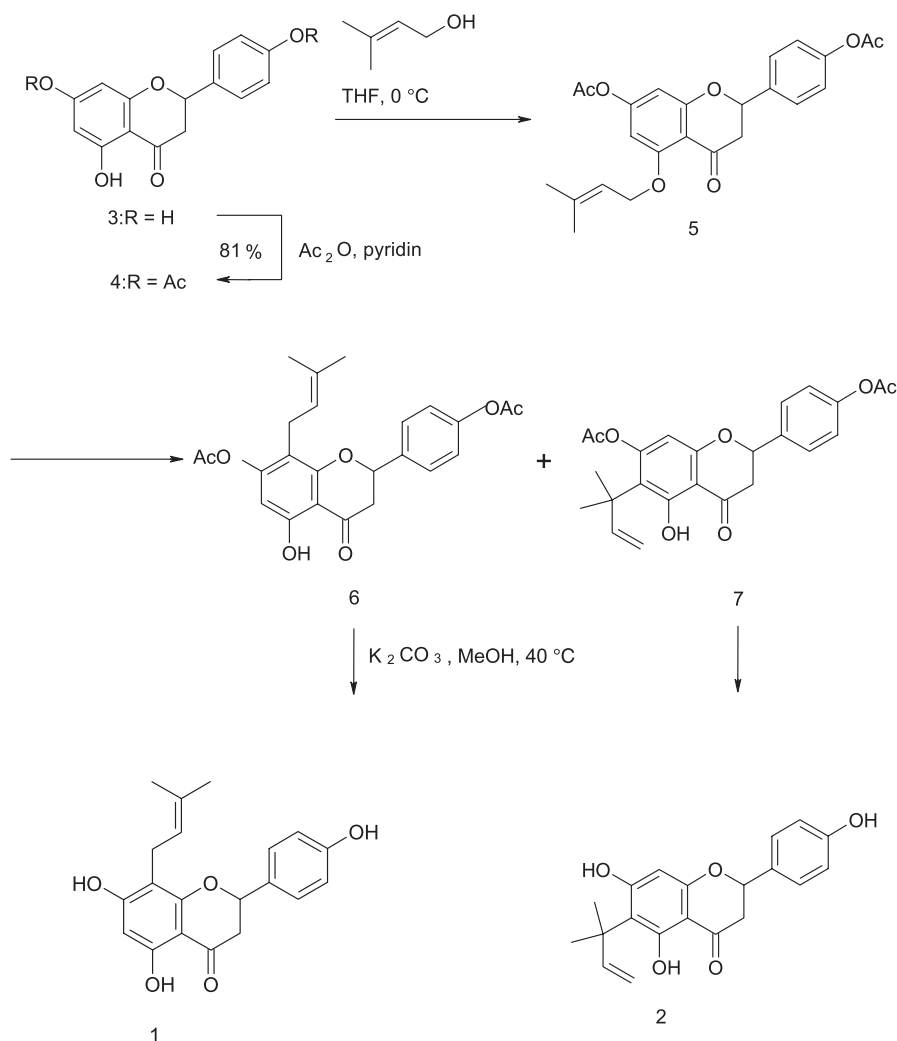


Obr. 13 Závislost absorbance p-nitrofenolu při 405 nm na koncentraci (nM) 17 $\beta$ -estradiolu, 8-prenylnaringeninu a příbuzných prenylovaných polyfenolických látek, isoxanthohumolu, 6-prenylnaringeninu a xanthohumolu, měřená použitím buněk Ishikawa Var I [7]



Obr. 14 Závislost absorbance p-nitrofenolu při 405 nm na koncentraci (nM) 17 $\beta$ -estradiolu, 8-prenylnaringeninu, coumestrolu, genisteinu a daidzeinu, měřená použitím buněk Ishikawa Var I [7]





Obr. 15 Reakční schéma syntézy 8-prenylnaringenu a 6-(1,1-dimethylallyl)naringenu z naringenu [10]

(5) spotřebována a výsledkem je směs látek (6) a (7) v objemovém poměru 3:1. Po prodloužení doby reakce na 2 dny je pozorován pouze produkt (6). Pro zvýšení procenta produktu (7) se přesmyk provádí za přítomnosti katalyzátoru, kterým je atom europia (patří mezi lanthanoidy) v oxidačním stavu +3 vázaný v komplexu. Posledním krokem je deacetylace látek (6) a (7) pomocí methanolu v přítomnosti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na konečné produkty 8-prenylnaringenu a 6-(1,1-dimethylallyl)naringenu [10].

#### Zdravotní účinky 8-prenylnaringenu a jiných fytoestrogenů

Pivo je nejvýznamnějším zdrojem přírodního 8-prenylnaringenu. Většina piv obsahuje méně než 100 µg 8-prenylnaringenu na litr (tab. 1). Na myších bylo pozorováno, jaké množství 8-prenylnaringenu může způsobit významný vzrůst vaginální mitózy, tedy negativní nárůst děložní sliznice. Zjištěná hodnota byla 100 µg 8-prenylnaringenu na mililitr pitné vody. Při této koncentraci, která je asi 1000-krát vyšší, než je obsah 8-prenylnaringenu v pivu, nebyl pozorován žádný vliv na funkci dělohy. Proto tedy vědci zastávají názor, že fytoestrogeny obsažené

v pivu nemají pro lidský organismus škodlivý zdravotní účinek [17, 18]. Je ale riskantní používat potravní doplňky, u nichž není dostatek informací o množství fytoestrogenů látek [2].

Ze všech laboratorních a klinických studií vyplývá, že fytoestrogeny mají ochranný efekt proti rakovině [20, 21]. V Asii je častým zdrojem stravy sója, která je bohatým zdrojem fytoestrogenů. To má zřejmě vliv na to, že je v Asii výskyt nádorových onemocnění spojených s hormonální tvorbou (jako je rakovina prsu, vaječníků) výrazně nižší než u západní populace. Výzkum v různých částech ženské populace poukázal na to, že u žen s vyšším příjmem fytoestrogenů je riziko rakoviny prsu nebo vaječníku menší [21]. Způsob, jakým fytoestrogeny zabírají růst rakovinných buněk, je závislý na druhu zhoubné buňky a na druhu fytoestrogenu. Je známo, že některé fytoestrogeny blokují estrogenní receptory a tím inhibují růst zhoubných buněk [21].

Pokusy i měření bylo potvrzeno, že 8-prenylnaringenin a další fytoestrogen genistein inhibují angiogenesi in vitro i in vivo. Angiogenese je buněčný růst a množení buněk na vnitřní výstelce sliznic, a je tedy spojena s mnohými chronickými nemocemi včetně rakoviny. Existuje proto možnost použití těchto

fytoestrogenů pro léčbu vaskulárních forem rakoviny [11].

Flavonoidy mohou být různě substituovány na svých kruzích A,B,C (obr. 1), což úzce souvisí s jejich biologickou aktivitou a toxicitou. V případě prenylace to může mít vliv na rychlostí množení buněk. Další malé strukturní změny mohou mít silný efekt na biologickou aktivitu povrchových struktur molekul, jako například enzymů a receptorů.

Toxicita flavonoidů byla testována použitím celkového testu toxicity, kterým lze určit počet metabolicky aktivních buněk. K testu byly použity dva druhy buněk (leukemické a rakovinné) a byl sledován jejich růst v přítomnosti jednotlivých flavonoidů. U 8-prenylnaringenu nebyl pozorován žádný negativní efekt na růst buněk ani při koncentraci 50 nmol/l. Naopak u flavonoidů s prenylovaným uhlíkem C5 na A-kruhu (obr. 1) byla zjištěna určitá toxicita, kdy docházelo k indukci apoptózy (řízená buněčná smrt) již při nízkých koncentracích [12].

#### Potravní doplňky s obsahem 8-prenylnaringenu

V současné době existují potravní doplňky, které mají vysoký obsah estrogenních látek, konkrétně 8-prenylnaringenu, a jsou vyrobeny z chmelového extraktu. Jsou určeny ženám v období klimakteria (45-55 let), u nichž dochází v důsledku přirozeného poklesu tvorby estrogenů k poruchám menstruačního cyklu, což může být doprovázeno dalšími potížemi. Tyto zdravotní přípravky tedy vyrovňávají hladinu estrogenů v těle, čímž přispívají k lepšímu vstřebávání vápníku do kostí a k celkovému posílení organismu v době klimakteria.

Příkladem takového potravního doplňku jsou tablety MenoHop. Podle informací na obalu obsahuje 120 mg vážení tableta 100 µg 8-prenylnaringenu. Předepsaná denní dávka je pak 1 tableta. Na obalu je také uvedeno upozornění, že se tyto tablety nesmí používat při depresích a v těhotenství [13].

#### Možnosti metabolického inženýrství v případě prenylflavonoidů

Pivo je sice zdrojem mnoha zdraví prospěšných látek, jako jsou antioxidanty, estrogenní látky, nicméně zdravotní prospěšnost spojená s vyšší konzumací piva si může odporovat s následnou závislostí na alkoholu. Jeden způsob zvýšení obsahu těchto látek je, že se mohou přidávat do piva během procesu, to ale zase vyžaduje jejich vysoké množství a náročné extrakce a purifikace těchto látek. Další možností je zvýšit jejich množství ovlivněním jejich biosyntézy během procesu, což je metabolické inženýrství [2].

Přeměny prenylflavonoidů metodami metabolického inženýrství může být docíleno expresí specifických enzymů nebo použitím regulátorů ovlivňujících biosyntézu flavonoidů. U chmele tohoto cíle může být dosaženo tak, že se zpomalí nebo zastaví metabolická cesta vedoucí ke vzniku hořkých kyselin na úkor prekurzorů, ze kterých pak vznikají prenylflavonoidové struktury. Dalším způsobem může být zvýšení množství lupulinových žláz produkujících hořké kyseliny na chmelových hlávkách [2].

Metabolické inženýrství v budoucnosti povede k rozvoji různých odrůd chmele, které

budou obsahovat vysoké množství 8-prenylaringeninů a budou použitelné k farmaceutickým účelům. Například v přítomnosti 6-methoxy skupiny se vylučuje účinek enzymu O-methyltransferasy nutné k izomeračním změnám na chalkonu (obr. 5). Tím se zabráňuje vzniku xanthohumolu a vede to k akumulaci jiného produktu – desmethyloxanthohumolu. A z toho pak působením enzymu chalkonnisomerasy vznikají 6-prenylaringenin (obr. 7) a 8-prenylaringenin v podmínkách in vivo [2].

#### Literatura

- [1] Hořta, P., Dostál, P., Basařová, G.: Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol? Chem. Listy **98**, 2004, 825-830.
- [2] Stevens, J. F., Page, J.E.: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry **65**, 2004, 1317-1330.
- [3] Čermák, J., et al.: Universum A-Z, všeobecná encyklopedie, Euromedia Group k. s., Praha, 2003.
- [4] Stevens, J. F., Taylor, A.W., Clawson, J.E., Deinzer, M.L.: Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. J. Agric. Food Chem. **47**, 1999, 2421-2428.
- [5] Stevens, J. F., Taylor, A. W., Deinzer, M. L.: Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A **832**, 1999, 97-107.
- [6] Nikolic, D., Li, Y., Chadwick, L.R., Grubjesic, S., Schwab, P., Metz, P., Van Bremen, R.B.: Metabolism of 8-prenylaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. Drug Metab. Dispos. **32**, 2004, 272-279.
- [7] Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., De Cooman, L., De Keukeleire, D.: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus*) and beer. J. Clin. Endocrinol. Metab. **84**, 1999, 2249-2252.
- [8] Milligan, S. R., Kalita, J. C., Pocock, V., Van De Kauter, V., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Rong, H., De Keukeleire, D.: The endocrine activities of 8-prenylaringenin and related hop (*Humulus lupulus*) flavonoids. J. Clin. Endocrinol. Metab. **85**, 2000, 4912-4915.
- [9] Schaefer, O., Hümpel, M., Fritzemeier, K. H., Bohlmann, R., Schleuning, W. D.: 8-prenylaringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **84**, 2003, 359-360.
- [10] Gester, S., Metz, P., Zierau, O., Vollmer, G.: An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)aringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement. Tetrahedron **57**, 2001, 1015-1018.
- [11] Proper, M. S., Hazel, S. J., Hümpel, M., Schleuning, W.D.: 8-prenylaringenin, a Novel Phytoestrogen, Inhibits Angiogenesis In Vitro and In Vivo. J. Cell. Physiol. **199**, 2004, 98-107.
- [12] Tokalov, S. V., Henker, Y., Schwab, P., Metz, P., Gutzeit, H. O.: Toxicity and Cell Cycle Effects of Synthetic 8-prenylaringenin and Derivates in Human Cells. Pharmacology **71**, 2004, 46-56.
- [13] Internet: <http://www.funciomed.be>, 3. 3. 2005.
- [14] Bednář, J., Ženíšek, A.: Identification of the estrogenic activity of hops. Brauwissenschaft **14**, 1961, 4-7.
- [15] Schaefer, O., Bohlmann, R., Schleuning, W. D., Schultze-Foster, K., Hümpel, M.: Development of a Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of 8-Prenylaringenin in Biological Matrices. J. Agric. Food Chem. **53**, 2005, 2881-2889.
- [16] Tekel, J., De Keukeleire, D., Rong, H., Daeseleire, E., Van Peteghem, C.: Determination of the Hop-Derived Phytoestrogen, 8-Prenylaringenin, in Beer by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. **47**, 1999, 5059-5063.
- [17] Naftalin, R. J., Thiagarajah, J. R., Pedley, K. C., Pocock, V. J., Milligan, S. R.: Progesterone stimulation of fluid absorption by the rat uterine gland. Reproduction **123**, 2002, 633-638.
- [18] Pocock, V. J., Sales, G. D., Milligan, S. R.: Comparison of the estrogenic effects of infant milk formulae, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered continuously in the drinking water to ovariectomised mice. Food Chem. Toxicol. **40**, 2002, 643-651.
- [19] Lapčík, O., Hill, M., Hampl, R., Wahala, K., Adlercreutz, H.: Identification of isoflavonoids in beer. Steroids **63**, 1998, 14-20.
- [20] Henderson, M. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Buhler, D. R.: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. Xenobiotica **30**, 2000, 235-251.
- [21] Moravcová, J., Kleinová, T.: Fytoestrogeny ve výživě – přináší užitek nebo riziko? Chem. Listy **96**, 2002, 282-289.

Lektoroval Ing. Alexandr Mikyška  
Do redakce došlo 15.6.2005

# negele

- Teplotní senzory
- Manometry, Tlakové senzory
- Detekce hladiny, Limitní senzory
- Monitory průtoku, průtokoměry
- Vodivostní senzory



**Hygienická provedení pro  
potravinářský průmysl**

**Výhradní zastoupení pro ČR a SR**



# REGOM INSTRUMENTS

Brabcova 2 / 1159, 147 00 PRAHA 4

☎ 241 402 206  
☎ 241 400 290

✉ [regom@regom.cz](mailto:regom@regom.cz)  
🌐 [www.regom.com](http://www.regom.com)