

## Profilování českých chmelových odrůd prostřednictvím analýz $\alpha$ - a $\beta$ -hořkých kyselin, silic a polyfenolů

### *Profiling of Czech Hop Varieties by Means of Analyses of $\alpha$ - and $\beta$ -Bitter Acids, Essential Oils and Polyphenols*

LUKÁŠ JELÍNEK, MONIKA DOLEČKOVÁ, TEREZA HUDCOVÁ, MARCEL KARABÍN, PAVEL DOSTÁLEK  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6*  
e-mail: lukas.jelinek@vscht.cz

**Jelínek, L. – Dolečková, M. – Hudcová, T. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Profilování českých chmelových odrůd prostřednictvím analýz  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin, silic a polyfenolů. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 272–276.**

U osmi českých chmelových odrůd byl stanoven obsah a zastoupení pryskyřic, silic a polyfenolů. Z těchto dat byly vybrány obsahy typické pro jednotlivé chmely (markery), které byly dále využity pro sestavení odrůdových profilů a diagramu sloužícímu k identifikaci českých chmelových odrůd.

**Jelínek, L. – Dolečková, M. – Hudcová, T. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Profiling of czech hop varieties by means of analyses of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids, essential oils and polyphenols. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 272–276.**

The contents of resins, essential oils and polyphenols in eight Czech hop varieties were determined. The typical values (markers) chosen were used for a compilation of variety profiles and a diagram which can be used for the identification of Czech hop varieties.

**Jelínek, L. – Dolečková, M. – Hudcová, T. – Karabín, M. – Dostálek, P.: Profilierung der tschechischen Hopfensorten durch Analyse der  $\alpha$ - a  $\beta$ -Bittersäuren, Silizium und Polyphenole. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 272–276.**

Bei acht tschechischen Hopfensorten wurde der Gehalt an Harze, Silizium und Polyphenole und Zusammensetzung der Harze analysiert. Aus diesen Ergebnissen wurden für die einzelne Hopfensorten (Marker) typische Werte ausgesucht, die weiter zur Zusammenstellung der Hopfensortenprofile und des zur Identifikation der tschechischen Hopfensorten dienenden Diagrams angewandt wurden.

**Klíčová slova:** chmel, české chmelové odrůdy,  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořké kyseliny, silice, polyfenoly

**Keywords:** hop, Czech hop varieties,  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids, essential oils, polyphenols

## 1 ÚVOD

Identifikace chmelových odrůd je poslední dobou velmi diskutovaným tématem. Šlechtitelé chmele vyžadují přesné a spolehlivé metody, které jim usnadní cílené šlechtění. Pěstitelé pak díky těmto metodám mohou kontrolovat odrůdovou stejnorodost chmelnic. V pivovarském průmyslu nacházejí identifikační metody uplatnění coby užitečný pomocník pro ověřování pravosti nakupované chmelové suroviny.

V současnosti lze metody sloužící k identifikaci chmele rozdělit do dvou skupin. *Genetické metody* [1–3] vycházejí z faktu, že každá chmelová odrůda je jedinečná svým genomem, a tudíž může být autentičtější na základě tzv. DNA fingerprintingu. Nespornou výhodou těchto metod je jejich přesnost, která je ovšem přímo spojena s nemalými finančními náklady vynakládanými zejména na vývoj těchto metod a jejich následnou aplikaci.

Tyto nedostatky mohou být částečně kompenzovány použitím metod *fyzikálně-chemických* [4–6], které jsou založeny na předpokladu, že každá chmelová odrůda je unikátní složením určitých sekundárních metabolitů (odrůdových markerů). Pro vývoj fyzikálně-chemických metod je tedy nutné vytvořit profily chmelových odrůd obsahující právě charakteristické složení sekundárních metabolitů, kterým se dané odrůdy liší od ostatních.

Jako odrůdové markery jsou s výhodou využívány homology  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin, silice a některé polyfenoly. Za hlavní nevýhodu těchto látek je považována závislost jejich obsahu na řadě vnějších faktorů jakými jsou například pěstitelská oblast [7], zdravotní stav rostliny [8] a způsob zpracování [9], a proto je nutné veškeré výsledky profilování potvrzovat nejen opakovaným měřením vzorků z různých ročníků sklizně, případně pěstitelských oblastí, ale také statistickou analýzou.

Cílem této práce bylo sestavení profilů českých chmelových odrůd na základě obsahů pryskyřic, silic a polyfenolů, mezi které byl nově zařazen i prenylovaný flavonoid xanthohumol a na základě těchto profilů pak sestavit diagram sloužící k identifikaci chmelových odrůd.

## 1 INTRODUCTION

Recently, the identification of hop varieties is a frequently discussed topic. Hop growers demand accurate and reliable methods for facilitation of targeted cultivation. Hop cultivators use these methods for controlling plant homogeneity in hop yards.

The identification methods are also used in breweries for the verification of purchased hops or hop products.

Generally, two kinds of methods for the identification of hops exist.

*Genetic methods* [1–3] based on the fact that each variety has a specific genome and therefore can be identified on the basis of DNA analysis (DNA-fingerprinting). The indisputable advantage of this method is its exactness; a big disadvantage is its cost specifically, for both for the development of these methods and for their application.

The use of *physico-chemical methods* [4–6] compensates this disadvantage. They are based on the assumption that each hop variety has a specific composition of particular secondary metabolites (variety markers). However, for the development of these methods it is necessary to establish profiles of hop varieties containing characteristic compositions of these distinct secondary metabolites.

Homologues of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids, essential oils and selected polyphenols are often used as variety markers. The main disadvantage of this method is that the contents of these substances depend on a number of external factors such as growing area [7], plant health [8] and processing method [9]. Therefore, all results of profiling not only must be confirmed by repeated analyses of samples from different years of harvest and different growing areas but also by statistical analyses.

The aim of this study was firstly to establish profiles of Czech hop varieties based on the contents of resins, essential oils and polyphenols including prenylated flavonoid xanthohumol. Secondly, these profiles were used as the basis for the compilation of a diagram which enables their identification.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Chmel

Chmelové odrůdy Žatecký poloraný červeňák – Osvaldův klon 72 (ŽPČ), Agnus, Sládek, Harmonie, Rubín, Bor, Premiant a Vital ze sklizně 2009 byly dodány ve formě sušených hlávek firmami V. F. Humulus, s. r. o., a Chmelařský institut, s. r. o. Vzorky chmele byly uchovávány při teplotě 8 °C.

### 2.2 Chemikálie a standardy

**Pro stanovení homologů  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin a xanthohumolu byly použity:** Diethylether p.a. – Penta (Česká Republika); methanol p.a. – Penta (Česká Republika); kyselina chlorovodíková 38% – Penta (Česká Republika); acetonitril pro HPLC – Sigma-Aldrich (Německo); kyselina fosforečná 85% – Penta (Česká Republika); kalibrační extrakt ICE 2 – Labor Veritas (Švýcarsko); Xantho-Pure extrakt – Hopsteiner (Německo).

**Pro stanovení chmelových silic byly použity:** Síran sodný (bezvodý) p.a. – Lach-Ner (Česká Republika); diethylether p.a. – Penta (Česká Republika); n-hexan Suprasolv – MERCK (Německo); borneol – MERCK (Německo).

**Pro stanovení chmelových polyfenolů byly použity:** Dichlormethan p.a. – Lach-Ner (Česká Republika); Aceton p.a. – Lach-Ner (Česká Republika); methanol pro HPLC – Sigma-Aldrich (Německo); kyselina octová 99% – Penta (Česká Republika); standardy kyselin protocatechové, gentisové, kávové, ferulové, sinapové, rutinu, katechinu a epikatechinu Sigma-Aldrich (Německo); kyselina *p*-hydroxybenzoová a kumarin – Fluka (Švýcarsko).

### 2.3 Příprava vzorků

**Extrakce  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin a xanthohumolu:** Hořké kyseliny a xanthohumol byly extrahovány 120 ml směsí methanol : diethylether (1 : 5) metodou The American Society of Brewing Chemists – Methods of Analysis [10] a následně stanoveny pomocí HPLC-DAD.

**Extrakce chmelových silic:** Chmelové silice byly 2 hodiny destilovány vodní párou (100 g mletých chmelových hlávek a 2 l vody) a tento destilát byl následně extrahován diethyletherem (3 x 10 ml) [11]. Zastoupení jednotlivých silic poté bylo stanoveno pomocí GC-MS.

**Extrakce chmelových polyfenolů:** Chmelový materiál byl nejprve pomocí dichlormethanu zbaven pryskyřic a následně byl extrahován 70% acetonem. Z tohoto extraktu byl poté odpařen aceton a vodný roztok byl analyzován pomocí HPLC-DAD [11].

### 2.4 HPLC-DAD a GC-MS analýza

Veškerá chromatografická stanovení byla provedena metodikou podle Jelínek a kol. [11].

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Hops

Hop varieties Saaz – Osvald's clone 72 (ŽPČ), Agnus and Sladek, Harmonie, Rubin, Bor Premiant and Vital from the 2009 harvest were supplied in the form of dry cones by the companies V.F. Humulus, Plc. and Hop Institute, Plc. All hop samples were stored at 8°C.

### 2.2 Chemicals and standards

**For the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acid homologues and xanthohumol the following chemicals were used:** diethyl ether p.a., methanol p.a., hydrochloric acid 38% and phosphoric acid 85 % from Penta (Praha, CZ), acetonitrile for HPLC from Sigma-Aldrich Chemie (München, D), calibration extract ICE 2 from Labor Veritas (Zürich, CH) and Xantho-Pure extract from Hopsteiner (Mainburg, D).

**For the determination of essential oils the following chemicals were used:** anhydrous sodium sulphate p.a. from Lach-Ner (Neratovice, CZ), diethyl ether p.a. from Penta (Praha, CZ), n-hexane Suprasolv and borneol from MERCK (Frankfurt D).

**For the determination of hop polyphenols the following chemicals were used:** dichloromethane p.a. and acetone from Lach-Ner (Neratovice, CZ), methanol for HPLC from Sigma-Aldrich Chemie (München, D), acetic acid 99 % from Penta (Praha, CZ), standards of protocatechuic acid, gentisic acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapinic acid, rutin, catechin, and epicatechin from Sigma-Aldrich Chemie (München, D) and 4-hydroxybenzoic acid and coumarin from Fluka (Buchs, CH).

### 2.3 Sample preparation

**Extraction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids and xanthohumol:** The bitter acids and xanthohumol were extracted using a 120 ml mixture of methanol : diethyl ether (1 : 5) according to the ASBC (The American Society of Brewing Chemists) – Methods of analysis [10] and determined by HPLC equipped with a DAD (diode array detector).

**Extraction of essential oils:** Essential oils of hops were water distilled (100 g of hop powder and 2 l of water) for 2 hours and the distillate was subsequently extracted with diethyl ether (3 x 10 ml) [11]. The selected oils were determined using GC-MS.

**Extraction of hop polyphenols:** to clean the sample of essential oils, the samples were rinsed with dichloromethane. Afterwards, the polyphenols were extracted using 70 % acetone in water. Next, the acetone was evaporated and the water solution was analyzed by HPLC-DAD [11].

### 2.4 HPLC – DAD and GC – MS

All chromatographic determinations were carried out according to Jelínek *et al.* [11].

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Obsah vybraných sekundárních metabolitů chmele v českých odrůdách

Obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin ( $\alpha$ - a  $\beta$ -HK) a jejich homologů je uveden v tab. 1. Z výsledků je patrné unikátní postavení odrůdy Agnus, která se svým zastoupením pryskyřic značně odlišuje od ostatních českých odrůd. Společně s Rubínem a Vitalem patří do kategorie vysokoobsažných chmelů. U těchto tří odrůd se množství  $\alpha$ -HK standardně pohybuje kolem 11 % hm. Agnus je charakteristický vysokým zastoupením kohumulonu (koh) a kolupulonu (kol) a naopak velice

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 The contents of selected secondary metabolites in Czech varieties

The contents of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -BA) and their homologues are summarized in Tab. 1. The results show the unique position of the Angus variety. Its content of essential oils differs considerably from other Czech varieties. It belongs together with the Rubin and Vital varieties to the high alpha hop category. In the case of those three hops, the usual content of  $\alpha$ -BA is about 11 % w/w. This variety is distinctive due to high contents of cohumulone (coh) and colupulone

Tab. 1 Obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin v českých chmelových odrůdách / The contents of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids in Czech hop varieties

Odrůda Variety	$\alpha$ -HK / $\alpha$ -BA (%)	Koh / Coh (% rel.)	Hum / Hum (% rel.)	$\beta$ -HK / $\beta$ -BA (%)	Kol / Col (% rel.)	Lup / Lup (% w/w)	Poměr / Ratio $\alpha$ / $\beta$
Agnus	11.60	32.93	51.21	7.47	55.82	32.66	1.55
Bor	9.49	21.71	76.92	4.30	41.63	48.37	2.21
Harmonie	10.93	23.60	63.31	7.94	43.45	46.10	1.38
Premiant	10.59	18.22	71.48	6.06	39.77	49.83	1.75
Rubín	12.83	25.88	60.72	4.36	47.94	41.06	2.94
Sládek	7.93	23.20	64.44	7.47	47.12	41.10	1.06
Vital	11.87	20.64	66.55	8.35	41.92	47.07	1.42
ŽPČ / Saaz	3.83	22.72	64.75	5.12	39.84	48.05	0.75

Tab. 2 Obsah silic v českých chmelových odrůdách (% rel.) / The contents of essential oils in Czech hop varieties (% rel.)

Silice / Essential oil	Agnus	Bor	Harmonie	Premiant	Rubín	Sládek	Vital	ŽPČ
$\beta$ -myrcen / $\beta$ -myrcene	24.79	15.11	25.21	17.35	15.70	14.73	10.59	15.61
Nonanal / Nonanal	N.S.	0.08	0.06	0.11	N.S.	0.10	0.13	0.21
2-undekanon / 2-undecanone	0.63	1.65	0.98	0.93	0.49	1.18	3.51	1.18
Methyl 4-decenoat / Methyl 4-decenoate	1.40	1.99	1.70	1.41	1.12	1.01	2.80	1.57
Methyl geranat / Methyl geranate	3.71	0.67	0.99	0.75	0.47	0.94	0.04	0.13
Karyofylen / Caryophyllene	17.96	16.49	9.89	15.09	12.35	18.83	18.19	10.43
Humulen / Humulen	27.71	47.42	27.55	46.51	33.39	46.82	3.79	32.45
$\beta$ -farnesen / $\beta$ -farnesene	N.S.	0.36	N.S.	2.59	0.07	0.06	2.36	20.64
$\gamma$ -selinen / $\gamma$ -selinene	N.S.	0.16	0.36	N.S.	0.45	N.S.	3.40	N.S.
$\beta$ -selinen / $\beta$ -selinene	1.54	0.77	8.97	0.54	10.41	0.49	16.90	0.40
$\alpha$ -selinen / $\alpha$ -selinene	1.61	1.01	10.82	0.65	12.07	0.61	18.80	0.40
$\gamma$ -kadinen / $\gamma$ -cadinene	1.99	1.79	1.33	1.73	2.09	2.10	0.91	1.46
$\alpha$ -kadinen / $\alpha$ -cadinene	3.25	2.93	2.18	3.01	2.73	3.72	1.20	2.16
Karyofylen epoxid / Caryophyllene epoxide	2.58	0.30	0.11	0.27	0.24	0.71	0.32	0.76
Humulen epoxid / Humulene epoxide	3.47	1.01	0.30	0.81	0.30	1.69	0.58	2.38
$\alpha$ -11-selinen-4-ol / $\alpha$ -11-selinene-4-ol	0.79	1.32	0.57	0.58	1.24	N.S.	5.48	1.54
$\alpha$ -limonen epoxid / $\alpha$ -limonene epoxide	0.44	0.21	0.12	0.06	0.15	0.19	0.59	0.22
Celkové silice (% w/w) / Total essential oils (% w/w)	1.68	0.77	1.15	1.11	0.88	0.99	0.77	0.39
N.S. – nebylo stanoveno / N.D not determined								

nízkými obsahy humulonu (hum) a lupulonu (lup). Odrůda ŽPČ bývá tradičně snadno rozpoznatelná díky nejnižšímu obsahu  $\alpha$ -HK (zpravidla nebývá vyšší než 4,5 % hm.) a navíc jako jediná česká odrůda má poměr  $\alpha/\beta$  menší než 1. Opačný extrém byl zjištěn u odrůdy Rubin, u níž byl stanoven velmi vysoký obsah  $\alpha$ -HK a poměr  $\alpha/\beta$  v tomto případě se blížil 3. Obsah  $\beta$ -HK by mohl být použit jako marker odrůdy Vital, u níž jako u jediné převyšoval 8 % hm.

Další skupinou látek, které lze úspěšně využít k profilování a identifikaci chmelových odrůd, jsou silice. V tabulce 2 jsou uvedeny relativní obsahy silic, hojně se vyskytujících v chmelových hlávkách. Nejčastěji uváděným silicovým markerem českých chmelů je bezesporu vysoký obsah  $\beta$ -farnesenu u Žateckého poloraného červeňáku. Tento obsah bývá zpravidla vždy vyšší než 10% rel., což umožňuje tuto odrůdu velmi snadno odlišit od ostatních. Jako další snadno identifikovatelný chmel se ukázal Vital, který je unikátní především velmi nízkým obsahem humulenu (< 10% rel.) a vysokým obsahem  $\gamma$ -selinenu (> 2% rel.). Obsah karyofylenu by mohl být použit jako marker odrůdy Harmonie, neboť pouze v tomto případě nepřevyšuje hranici 10% rel.. Poslední českou odrůdou vhodnou k profilování na základě charakteristických obsahů silic byl Agnus. Tento chmel obsahoval největší množství celkových silic a rovněž i suverénně největší podíl methyl geranatu a karyofylen epoxidu.

V případě, že odrůda nemohla být identifikována pomocí markerů ze skupiny pryskyřic či silic, lze k tomuto účelu využít polyfenoly. Obsah a zastoupení vybraných fenolových látek jsou popsány v tabulce 3. Agnus je v tomto případě charakteristický velmi nízkým obsahem katechinu (< 20 % rel.), naopak epikatechinu obsahoval vzorek tohoto chmele téměř trojnásobně množství než většina ostatních odrůd. Kyseliny gentisová (> 20 rel.) a protokatechová (< 1% rel.) byly vyhodnoceny jako markery charakterizující odrůdu Bor. Obsah protokatechové kyseliny byl rovněž unikátní u odrůdy Premiant, u které jako jediné přesahoval hranici 5% rel. Pro odrůdu Sládek byl charakteristický obsah kumarinu (> 10% rel.). Odrůdy ŽPČ a Vital byly jedinečně značně vysokým podílem katechinu (> 40% rel.). Tento marker je však prozatím doporučeno využívat pouze u odrůdy ŽPČ, u které byl ověřen měřením na několika ročních sklizně.

### 3.2 Profily českých chmelových odrůd a jejich identifikace pomocí diagramu

Před začátkem samotného profilování je třeba si uvědomit, že z látek využitých k identifikaci chmelových odrůd jsou obsahy chmelo-

(col) and low contents of humulone (hum) and lupulone (lup). The Saaz variety is characterised by the lowest content of  $\alpha$ -BA (usually not higher than 4.5 %) and is the only Czech variety with a  $\alpha/\beta$  ratio lower than 1. Another extreme case in the opposite direction was found with the Rubin variety. The content of  $\alpha$ -BA was very high and the  $\alpha/\beta$  ratio was almost 3. The high content of  $\beta$ -BA of 8 % alone could be considered as a marker for the Vital variety.

The next group of compounds which can be used for the profiling and the identification of hop varieties includes the essential oils. The relative contents of essential oils frequently found in hop cones are given in Tab. 2. The marker most frequently mentioned is the high content of the essential oil  $\beta$ -farnesene in the Saaz variety. This content, regularly higher than 10 % rel., enables distinguishing the Saaz variety from other varieties. Furthermore a very easily identifiable variety proved to be the Vital variety. It is unique especially due to the very low content of humulene (< 10 % rel.) and the high content of  $\gamma$ -selinene (> 2 % rel.). The content of caryophyllene can be considered as a marker for the Harmonie variety. Only in this variety is the content lower than 10 % rel. The last Czech variety suitable for identification based on a distinguishable content of essential oils is the Agnus variety. This hop contained the largest amount of total essential oils and by far the largest occurrence of methyl geranate and caryophyllene epoxide.

If the hop variety cannot be identified with the resin or essential oil markers, polyphenols can be used for this purpose. The presence and the contents of selected phenol compounds are detailed in Tab. 3. The Agnus variety is distinguishable by a very low content of catechin (< 20 % rel.). On the contrary, the content of epicatechin in this variety was almost three times higher than in the majority of the others varieties. The contents of gentisic acid (> 20 % rel.) and protocatechuic acid (< 1 %) were evaluated as characteristic markers for the Bor variety. A content of protocatechuic acid higher than 5 % rel. was also specific to the Premiant variety. Specific to the Sládek variety was the coumarin content (> 10 % re.). The Saaz and Vital varieties were distinctive due to very high contents of catechin (> 40 % rel.). Nevertheless, for the time being the use of this marker is only recommended for the Saaz variety as this has been validated with measurements from several errors.

### 3.2 Profiles of Czech hop varieties and their identification using the diagram

It must be realized that from the substances used for the identification of hop varieties the content of hop resins is a feature which is

Tab. 3 Obsah polyfenolů v českých chmelových odrůdách (% rel.) / The contents of polyphenols in Czech hop varieties (% rel.)

Polyfenoly / Polyphenols	Agnus	Bor	Harmonie	Premiant	Rubín	Sládek	Vital	ŽPČ
Protocatechová kyselina / <i>Protocatechuic acid</i>	2.8	0.7	2.4	6.3	3.5	2.3	1.3	1.6
4-hydroxybenzoová kyselina / <i>4-hydroxybenzoic acid</i>	0.6	1.3	1.2	1.8	0.7	1.3	1.0	1.2
Rutin / <i>Rutin</i>	23.6	13.3	23.5	18.2	20.9	17.2	14.9	18.7
Katechin / <i>Catechin</i>	17.3	37.2	33.3	34.7	31.1	29.9	41.9	44.8
Epikatechin / <i>Epicatechin</i>	16.3	5.7	4.2	6.2	5.4	5.7	13.5	4.5
Kumarin / <i>Coumarin</i>	8.8	8.0	6.8	5.5	4.5	11.7	2.5	2.5
Gentisová kyselina / <i>Gentisic acid</i>	13.5	22.3	15.9	13.2	17.1	13.5	16.2	16.6
Kávoová kyselina / <i>Caffeic acid</i>	3.5	1.6	2.2	4.11	4.0	6.3	1.1	3.7
Ferulová kyselina / <i>Ferulic acid</i>	1.9	0.4	1.5	1.8	1.8	1.3	1.0	0.7
Sinapová kyselina / <i>Sinapinic acid</i>	4.4	2.1	2.2	3.3	3.0	6.0	1.6	1.6
Xanthohumol / <i>Xanthohumol</i>	0.9	0.4	0.5	0.4	0.5	0.7	0.8	0.2
$\Sigma$ Polyfenolů / $\Sigma$ Polyphenols (mg/100g)	266	445	303	275	235	349	417	730

vých pryskyřic nejvíce ovlivnitelné vnějšími faktory. Naopak obsahy silic lze považovat za stabilní a obecně se jim při vývoji identifikačních metod dává přednost.

Z tabulky 4 je patrné, že nejsnáze identifikovatelným českým chmellem je Agnus, který lze charakterizovat celkem osmi odrůdovými markery, z toho třemi ze skupiny silic. Naopak Rubín se dvěma markery ze skupiny pryskyřic lze z tohoto hlediska považovat za velmi obtížně identifikovatelnou odrůdu. Výhodou této odrůdy je poměrový marker, u kterého se v zásadě předpokládá, že obsah  $\alpha$ - i  $\beta$ -HK je vnějšími faktory ovlivněn stejnou měrou, tudíž lze tento poměr považovat za relativně spolehlivý ukazatel.

Výsledné profily byly použity k sestavení klíčového diagramu (obr. 1), s jehož pomocí je možné snadno identifikovat český chmel. Ze základní skupiny je každá odrůda oddělena pomocí markerů uvedených nad šipkou. Je důležité vědět, že správně identifikovaný

most susceptible to external factors. On the contrary, the contents of essential oils should be considered as a stable factor which should be preferred in the development of identification methods.

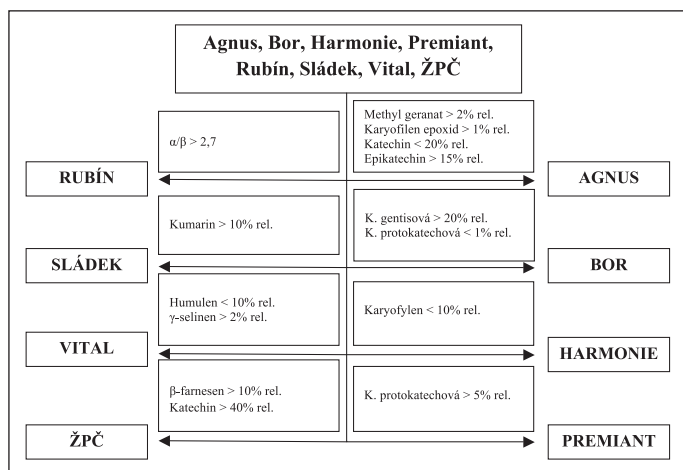
Tab. 4 shows that the easiest recognizable Czech variety is the Agnus variety. It could be characterized by a total of eight variety markers including three from the group of essential oils. From this point of view, the Rubin variety with only two markers from the group of resins is considered to be a very difficult variety to identify. The preferred and relatively reliable marker in this case is the ratio marker of  $\alpha/\beta$  BA. Here it is assumed that the contents of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids is influenced to the same extent by external factors.

The final profiles were used for a compilation of the key diagram (Fig. 1). This can be used for easy and solid identification of Czech hop varieties. Each variety is identified by markers indicated above the arrow. The correctly identified hop must match to all markers

Tab. 4 Markerové profily českých chmelových odrůd / Profile markers of Czech hop varieties

Odrůda / Variety	Pryskyřicové markery / Resin markers	Silicové markery / Essential oil markers	Polyfenolové markery / Polyphenol markers
Agnus	Koh. / Coh > 30% rel. Kol. / Col. > 50% rel. Lup. / Lup. < 40% rel.	Celkové silice / Total essential oils > 30% hm. Methyl geranat / Methyl geranate > 2 % rel. Karyofylen epoxid / Caryophyllene epoxide > 1 % rel.	Katechin Catechin < 20 % rel. Epikatechin Epicatechin > 15 % rel.
Bor			K. gentisová / Gentisic acid > 20% rel. K. protocatechová / Protocatechuic acid < 1% rel.
Harmonie		Karyofylen / Caryophyllene < 10 % rel.	
Premiant			K. protocatechová / Protocatechuic acid > 5% rel.
Rubín	$\alpha$ -HK / $\alpha$ -BA > 12% hm. $\alpha/\beta$ > 2,7		
Sládek			Kumarin / Coumarin > 10% rel.
Vital	$\beta$ -HK / $\beta$ -BA > 8% hm.	Humulen / Humulen < 10% rel. $\gamma$ -selinen / $\gamma$ -selinene > 2% rel.	
ŽPČ	$\alpha$ -HK / $\alpha$ -BA < 4,5% hm. $\alpha/\beta$ < 1	$\beta$ -farnesen / $\beta$ -farnesene > 10% rel.	Katechin / Catechin > 40 % rel.





Obr. 1 Diagram pro identifikaci českých chmelových odrůd

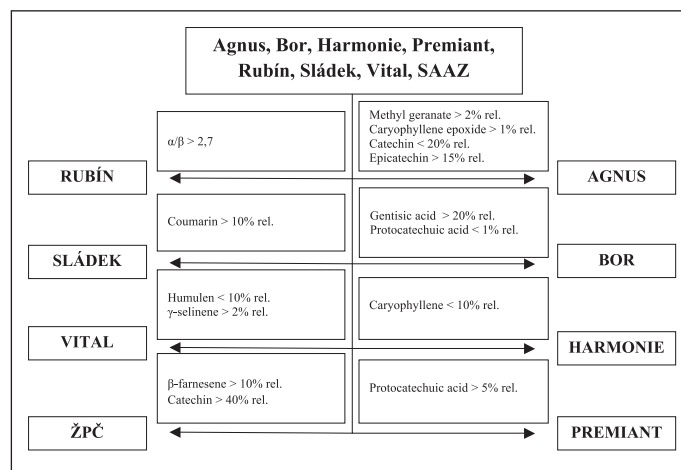


Fig. 1 Identification diagram for Czech hop varieties

chmel musí bezpodmínečně vyhovovat všem předepsaným markerům uváděným v klíčovém diagramu (ne v profilu). Není-li tato podmínka splněna, přesnost stanovení se výrazně snižuje.

Je zřejmé, že z českých chmelů jsou nejsnadněji identifikovatelné odrůdy Agnus a ŽPČ, a to především díky „silným“ markerům ze skupiny silic, které v kombinaci s doprovodnými charakteristickými obsahy pryskyřic a polyfenolů velmi odráží rovněž pivovarskou hodnotu těchto chmelů. Na druhé straně odrůda Rubín byla v tomto případě výjimečná pouze vysokým obsahem  $\alpha$ -HK, který je do značné míry ovlivněn ročníkem sklizně a o něco spolehlivějším poměrovým markerem  $\alpha/\beta$ .

#### 4 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala hledáním obsahů sekundárních metabolitů charakteristických pro český chmel. Pro tento účel byl změněn obsah  $\alpha$ - a  $\beta$ -hořkých kyselin a jejich homologů, vybraných silic a fenolových látek u osmi českých chmelových odrůd. V tomto souboru dat byly nalezeny charakteristické obsahy sekundárních metabolitů, které byly následně použity k sestavení profilů českých odrůd a dále k vytvoření klíového diagramu pro jejich identifikaci. Jedinečnými, z hlediska množství markerů, byly shledány odrůdy Agnus a Vital. Naopak odrůda Rubín s pouhými dvěma markery byla obtížně identifikovatelná a mohla by být snadno zaměněna s jiným vysokoobsažným chmelem.

#### Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/ 2011), Výzkumného centra 1M0570 a Výzkumného záměru – MŠMT 6046137305.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 6. 5. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 24. 6. 2011

#### LITERATURA / REFERENCES

- Patzak, J.: Characterization of Czech hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes by molecular methods. *Rostlinná Výroba* **48**, 2002, 343–350.
- Patzak, J.: Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* **121**, 2001, 9–18.
- Jakše, J., Bandelj, D., Javorník, B.: Eleven new microsatellites for hop (*Humulus lupulus* L.). *Molecular Ecology Notes* **2**, 2002, 544–546.
- Kovačević, M., Kač, M.: Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chemistry* **77**, 2002, 489–494.
- De Cooman, L., Everaert, E., De Keukeleire, D.: Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. *Phytochemical Analysis* **9**, 1998, 145–150.
- Jelínek, L., Karabín, M., Dostálek, P., Šneberger, M.: Identifikace chmelových odrůd na základě obsahu pryskyřic, silic a polyfenolů.

given in the key diagram (not only in the profile). Without fulfilling this condition the correctness of the identification decreases significantly.

Evidently, the Agnus and the Saaz varieties are very easily identifiable due to strong markers from the group of essential oils. The brewing value of these varieties is reflected in the combination of the characteristic contents of resins and polyphenols. On the contrary, in our study the Rubin variety was exceptional only for its high content of  $\alpha$ -BA which is largely influenced by the year of harvest and for the little more solid  $\alpha/\beta$  BA ratio marker.

#### 4 CONCLUSIONS

The aim of this study was to find secondary metabolites specific to Czech hops. For this purpose, contents of  $\alpha$ - and  $\beta$ -bitter acids and their homologues, selected essential oils and polyphenols in eight Czech hop varieties were determined. Characteristic contents of secondary metabolites from these groups of compounds were selected and subsequently used for the compilation of the variety profiles and for the key diagram for their identification. Unique, due to the amount of markers found were the Agnus and Vital varieties. On the contrary the Rubin variety with only two markers was hard to identify and could be easily mistakenly confused with another hop with a similar high content of secondary metabolites.

#### Acknowledgements

This study was supported by the grant for Specific Academic Research MŠMT (Adjudication No. 21/2011), Research Centrum 1M0570 and Research project MŠMT 6046137305.

Translated by Ing. Eva Paterson

- Chmelařská Ročenka, 2010, s. 194–206., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a. s., Praha 2009, ISBN: 978-80-86576-36-7.
- Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A., Wanikawa, A.: Comparison of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one Contents in Hop Cultivars from Different Growing Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2002, 1051–1057.
- Patzak, J., Matoušek, J., Krofta, K., Svoboda, P.: Hop latent viroid (HLVd)-caused pathogenesis: effect of HLVd infection on lupulin composition of meristem culture-derived *Humulus lupulus*. *Biologia Plantarum* **44**, 2001, 579–585.
- Srećec, S., Rezić, T., Šantek, B., Marić, V.: Hop pellets type 90: Influence of manufacture and storage on losses of  $\alpha$ -acids. *Acta Alimentaria* **38**, 2009, 141–147.
- ANONYMOUS (2009): ASBC Methods of Analysis, Hops-14:  $\alpha$ -acids and  $\beta$ -acids in hops and hop extracts by HPLC, The American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, USA.
- Jelínek, L., Šneberger, M., Karabín, M., Dostálek, P.: Comparison of Czech hop cultivars based on their contents of secondary metabolites. *Czech Journal of Food Sciences* **28**, 2010, 309–316.