

Hodnocení obsahu hořkých kyselin a polyfenolů ve sklizni českých chmelů v roce 2013 – II: Obsah polyfenolů

Evaluation of Bitter Acids and Polyphenols Content in Czech Hops harvest in 2013 – Part II: The Content of Polyphenols

Alexandr MIKYŠKA, Marie JURKOVÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. / Research Institute of Brewing and Malting Plc, Lípová 15, 120 44 Praha 2

e-mail: mikyska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Mikyška, A. – Jurková, M.: Hodnocení obsahu hořkých kyselin a polyfenolů ve sklizni českých chmelů v roce 2013 – II: Obsah polyfenolů. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 7–8, s. 191–197

Obsah polyfenolových látek a antioxidačních vlastností chmelů významných českých odrůd – Žateckého poloraného červeňáku (ŽPČ), Sládek, Premiant a Agnus – byl hodnocen u výběru sklizňových vzorků (24, 12, 12, 4 vzorky) po extrakci z chmele vodným acetonem a porovnán s výsledky ze sklizní 2011 a 2012. Obsah celkových polyfenolů (TP), významných z hlediska CHZO České pivo, i anthoky-anogenů a flavanoidů je závislý na odrůdě, nejvyšší obsah byl u ŽPČ, nejnižší obsah u odrůdy Sládek. Poměr TP k α -kyselinám klesá v řadě ŽPČ – Sládek – Premiant – Agnus, významný je pouze rozdíl mezi ŽPČ a ostatními odrůdami. Antiradikální aktivita chmelů odrůd ŽPČ, Premiant a Agnus ve sklizni 2013 byla o přibližně 15 % rel. a u odrůdy Sládek o 25 % rel. nižší oproti sklizni 2012. Nejvyšší obsah majoritního prenylflavonoidu xanthohumolu (XN) byl stanoven u chmelů Agnus (7,73 mg/g), následovaly chmele Sládek (5,21 mg/g), Premiant (3,54 mg/g) a nejnižší hodnoty byly stanoveny pro ŽPČ (2,59 mg/g). Obsah XN byl u chmelů jednotlivých odrůd poměrně vyrovnaný (relativní směrodatná odchylka 8,0 % až 15,9 %). Oproti sklizni 2012 byl významně nižší obsah u odrůdy ŽPČ (o 24,3 %) a Premiant (o 15,2 %). Poměr XN k α -kyselinám je nejvyšší u odrůd ŽPČ a Sládek, nejnižší u chmelů Premiant. Průměrný obsah fytoestrogenu 8-prenylaringenin byl v roce 2013 u chmelů Sládek, Premiant a Agnus na úrovni 29 až 33 μ g/g, nižší obsah byl u odrůdy ŽPČ (22 μ g/g). Obsah této látky a dalších prenylflavonoidů, 6-prenylaringenin a iso-xanthohumolu je značně ročníkově závislý. Nejvyšší obsah byl v ročníku 2012, následoval ročník 2013 a nejnižší byly hodnoty v roce 2011.

Mikyška, A. – Jurková, M.: Evaluation of bitter acids and polyphenols content in Czech hops harvest in 2013 – Part II: The content of polyphenols. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 7–8, pp. 191–197

The contents of polyphenolic compounds and the antioxidative properties of the important Czech hop varieties Saaz, Sladek, Premiant and Agnus were evaluated in selected samples (24, 12, 12 and 4). The hops were extracted with a water/acetone solution, and then analyzed. The results were compared with those from hops harvested in 2011 and 2012. The content of total polyphenols (TP), which are important in terms of the Protected Geographical Indication (PGI) as well as the contents of anthocyanogens and flavonoids are dependent on the variety. The highest content was found in the Saaz variety and the lowest in the Sladek variety. The ratios of TP to α -acids decrease in the order Saaz, Sladek, Premiant and Agnus. The only significant difference resulted between the Saaz variety and the other varieties. The antiradical activity of the hops varieties Saaz, Premiant and Agnus harvested 2013 was about 15 % rel. lower than in 2012. The antiradical activity of the Sladek variety was even 25% rel. lower. The highest content of the dominantly present prenylflavonoid xanthohumol (XN) was found in the Agnus variety (7.73 mg/g) followed by the varieties Sladek (5.21 mg/g), Premiant (3.54 mg/g) and Saaz (2.59 mg/g). The XN contents in the single hops varieties were relatively well balanced with relative standard deviations (RSD) from 8.0% to 15.9%. They were significantly lower in the varieties Saaz (by 24.3%) and Premiant (by 15.2%) when compared with the harvest 2012. The ratio of XN to α -acids was highest in the Saaz variety and lowest in the Premiant variety. The average contents of the phytoestrogen, 8-prenylaringenin in the Sladek, Premiant and Agnus varieties harvested in 2013 varied from 29 to 33 μ g/g. A lower content was found in the Saaz variety (22 μ g/g). The contents of XN and other prenylflavonoids such as 6-prenylaringenin and isoxanthohumol depend strongly on the year of the harvest. The highest values were found in hops harvested in 2012 followed by the years 2013 and 2011.

Mikyška, A. – Jurková, M.: Die Auswertung des Gehalts an Buttersäuren und Polyphenols im Hopfen aus der Ernte 2013 - II: Gehalt an Polyphenols. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 7–8, S. 191–197

Nach der Hopfenextraktion mit wässrigem Aceton wurde der Gehalt an Polyphenolstoffen und Antioxidationsseigenschaften von bedeutenden tschechischen Hopfensorten „Žatecký poloraný červeňák“ (ŽPČ = Saazer Halbfrüher Rothopfen), „Sládek“, „Premiant“ und „Agnus“, bei dem Auswahl der Erntemuster (24, 12, 12, 4 Muster) ausgewertet und verglichen mit den Ergebnissen aus den Ernten 2011 und 2012. Gehalt an gesamten Polyphenols (TP) bedeutend aus der Hinsicht der Geschützten geographischen Angabe „Tschechisches Bier“ und an Anthokyanogen und Pflavanoide hängt von der Hopfensorte ab, der höchste Gehalt an diese Stoffen wurde bei der Sorte ŽPČ, der niedrigste Gehalt an diese Stoffen bei der Sorte Sládek festgestellt. Das Verhältnis der TP zu den α -Säuren sinkt in der folgenden Reihe ŽPČ – Sládek – Premiant – Agnus, der bedeutende Unterschied gibt's nur zwischen ŽPČ und der anderen Sorten. Im Vergleich mit der Ernte 2012 wurde die antiradikale Aktivität der Hopfensorten ŽPČ, Premiant und Agnus aus der Ernte 2013 um 15% (rel.) und bei der Sorte Sládek um 25% (rel.) niedriger. Der höchste Gehalt an majoritäten Prenylflavonoid Xanthohumol (XN) wurde bei der Hopfensorte Agnus (7,73 mg/g) festgestellt, weiter folgten die Sorten Sládek (5,21 mg/g), Premiant (3,54 mg/g) und der niedrigste Wert wies die Sorte ŽPČ (2,59 mg/g) auf. Der Gehalt an XN wurde bei allen Hopfensorten relativ ausgeglichen (relative Standardabweichung 8,0% bis zu 15,9%). Im Vergleich mit der Ernte wurde der Gehalt an XN bei der Sorte ŽPČ bedeutend niedriger um 24,3% und bei anderer Sorten Premiant um 15,2%. Das Verhältnis des XN zu den α -Säuren wurde das höchste bei den Sorten ŽPČ und Sládek und das niedrigste bei der Sorte Premiant. Im Jahre 2013 wurde der durchschnittliche Gehalt an Phytoestrogen 8-Prenylaringenin bei der Sorten Sládek, Premiant und Agnus auf dem Niveau 29 až 33 μ g/g, ein niedrigerer Gehalt wurde bei der Sorte ŽPČ (22 μ g/g) festgestellt. Der Gehalt an diesen Stoff und an weitere Prenylflavonoide, 6-Prenylaringenin und Iso-Xanthohumol hängt wesentlich von dem Jahrgang ab. Im Jahre 2012 wurde Gehalt der höchste, dann folgte Jahrgang 2013 und 2011 gab es den niedrigsten Gehalt.

Klíčová slova: sklizeň chmele, český chmel, polyfenoly, xanthohumol, antioxidační aktivita

Keywords: hop harvest, Czech hops, polyphenols, xanthohumol, antioxidative activity

1 ÚVOD

Polyfenolové látky mají vliv na kvalitu piva, jeho koloidní a velmi pravděpodobně i senzorickou stálost. Jedná se o velmi diverzifikovanou skupinu látek, jejíž jednotlivé složky se vyznačují různými

1 INTRODUCTION

The polyphenolic substances belong to a very heterogeneous group, which influences the quality of beer, its colloidal stability and very probably the sensory stability as well. The particular compounds

mi vlastnostmi z hlediska antiradikálových vlastností, zákalotvorné aktivity, a tedy vlivu na senzoričnou stabilitu piva i afinitou k tvorbě koloidních zákalů. Některé jednoduché i složitější polyfenoly a jejich oxidační produkty jsou senzoričsky aktivní, ovlivňují hořkost a trpkost piva (Callemien et al., 2005; McLaughlin et al., 2008). Vyšší obsah polyfenolů je uveden jako jeden z charakteristických znaků Českého piva (obsah celkových polyfenolů v ležáku 130–230 mg/l) (Anonymous, 2008), kterými se odlišuje od zahraničních. Podílí se na tom jak polyfenoly surovin, tak technologie výroby.

Některé isoflavonoidy (daidzein, genistein, formononetin a biochanin; obr. 1) jsou známými fytohormony a antioxidanty, ve chmelu se na rozdíl od sladu nacházejí i prenylflavonoidy (xanthohumol, isoxanthohumol, 6- a 8-prenylnaringenin; obr. 2). Význam prenylflavonoidů v posledním desetiletí stoupl z důvodu objevení řady bioaktivních účinků (Stevens a Page, 2004). U xanthohumolu se jedná především o inhibiční působení na některé typy rakovinného bujení, antimikrobiální, protizánětlivé a antioxidační účinky (Henderson et al., 2000; Miranda et al., 2000; Gerhauser, 2005). Xanthohumol společně s některými složkami chmelových pryskyřic také působí inhibičně při vzniku osteoporózy (Tobe et al., 1997). Bioaktivní účinky isoxanthohumolu jsou obdobné jako u xanthohumolu, ale slabší (Kondo, 2003). Nižší účinnost je do určité míry kompenzována vyššími koncentracemi a snadnou dostupností v pivu. Jako původce estrogenních účinků chmele byl identifikován 8-prenylnaringenin (Milligan et al., 1999). V roce 2012 bylo prokázáno, že Česká piva obsahují vyšší množství prenylflavonoidů s prokázaným zdravotním benefitem (antioxidanty, kancerostatika, fytoestrogeny) (Olšovská et al., 2013). Antioxidanty sladu i chmele mají vliv na senzoričnou stabilitu piva a pro jeho konzumenty jsou příspěvkem k ochraně organismu před volnými radikály.

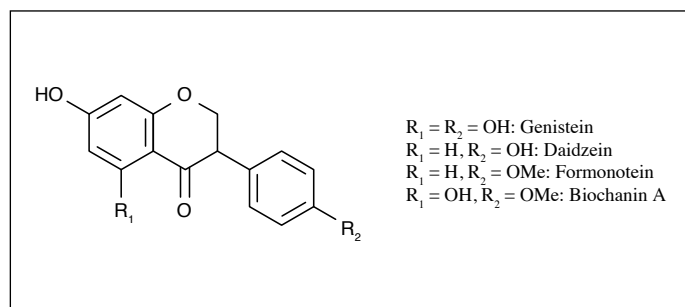
Hodnocení obsahu hořkých kyselin čerstvé sklizeného chmele se ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském (VÚPS) provádí od roku 1950. Analyzovány jsou vzorky odebírané v průběhu sklizně ze všech tří pěstitelských oblastí v ČR dle odběrní mapy. Hodnoty jsou predikci založenou na analýze 170–180 vzorků chmele. Výsledky tohoto hodnocení jsou uvedeny v části I článku (Mikyška a Jurková, 2014).

Část II se zabývá hodnocením obsahu polyfenolových látek a antiradikálové aktivity. Obsah polyfenolových látek (celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů) a antioxidační aktivity u výběru ze souboru sklizňových vzorků je na našem pracovišti systematicky sledován od roku 2008, po vypracování vlastní HPLC metody stanovení obsahu isoflavonoidů a prenylflavonoidů po extrakci chmele acetonem je od roku 2011 hodnocen obsah všech skupin polyfenolových látek v tomto extraktu. K dispozici jsou tak tříleté výsledky analýz.

2 MATERIÁL A METODY

Pro hodnocení obsahu polyfenolových látek a antioxidačních vlastností byl, obdobně jako v letech 2011 a 2012, analyzován výběr vzorků odrůd Žatecký poloraný červeňák (24 vzorků), Sládek (12 vzorků), Premiant (12 vzorků) a Agnus (5 vzorků).

Polyfenolové látky byly ze vzorku jemně pomletého chmele extrahovány 70% vodným acetonem. Analýzy celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů ve výluzech byly provedeny podle Pivovarsko-sladařské analytiky (Basařová et al., 1994). Analýza obsahu isoflavonoidů a prenylflavonoidů byla provedena dříve vypracovanou metodou. Isoflavonoidy (daidzein, genistein, formononetin, biochanin A) a prenylflavonoidy (xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin) byly po separaci pomocí SPE stanoveny HPLC s detektorem DAD v gradientu voda – acetonitril. Výsledky jsou uvedeny v $\mu\text{g/g}$ chmele (Jurková et al., 2013).



Obr. 1 Struktura isoflavonoidů – fytoestrogenů (Jurková et al., 2013) / Fig. 1 Structures of isoflavonoids – phytoestrogens (Jurková et al., 2013)

have different properties in terms of antiradical activity and haze-forming capability and therefore, they have an impact on the sensory stability of beer. Some of the polyphenols and their oxidation products influence the bitterness and the astringency of beer (Callemien et al., 2005; McLaughlin et al., 2008). High content of polyphenols is one of the characteristics of Czech Beer. The content of TP in a Czech lager beer varied from 130–230 mg/l (Anonymous, 2008). This is due to the raw material as well as to the production technology.

Some of the isoflavonoids such as daidzein, genistein, formononetin and biochanin A (Fig. 1) act as phytohormones and antioxidants. Unlike malt, hops also contains prenylflavonoids such as XN, isoxanthohumol, 6- and 8-prenylnaringenin (Fig. 2). During the last decade, the importance of these prenylflavonoids has increased due to the discovery of a number of bioactive effects (Stevens and Page, 2004). XN has antimicrobial and anti-inflammatory effects and antioxidative properties that could inhibit some kinds of cancers (Henderson et al., 2000; Miranda et al., 2000; Gerhauser, 2005).

According to Tobe et al. (1997), XN along with some other compounds from hops resins act as inhibitors at the onset of osteoporoses. The bioactive effects of isoxanthohumol are similar to XN, but less intensive (Kondo, 2003). The lower activity is partially compensated through higher concentrations and easy availability in the beer. 8-prenylnaringenin was identified as acting like the female sex hormone oestrogens (Milligan et al., 1999). In the year 2012, it was certificated that Czech beers contain a higher amount of prenylflavonoids with proven health benefits by acting as antioxidants, cancer statics and phytoestrogens (Olšovská et al., 2013). The antioxidants from malt and hops have an impact on the sensory stability of beer and in addition they contribute to the consumer protection against free radicals.

The Research Institute of Brewing and Malting (RIBM) has been carrying out evaluations of the content of bitter acids in freshly harvested hops since 1950. The samples for analyses are collected during the harvest from all three regions of hops cultivation in the Czech Republic according to a schedule. The values are a prediction based on the analysis of 170–180 hop samples. The results of these evaluations were given in Part I of the study (Mikyška and Jurková, 2014).

Part II deals with the evaluation of the contents of polyphenolic substances and their antiradical activity. Since 2008, the contents of TP, anthocyanogens and flavonoids and their antioxidative properties were systematically determined in selected samples at our Research Institute. In 2011, our own HPLC method for the determination of isoflavonoids and prenylflavonoids contents after an extraction of the hops with acetone was developed. Since then, the contents of all groups of polyphenolic substances have been determined. Therefore, the results of consecutive analyses from hop harvested last three years are available.

2 MATERIAL AND METHODS

As in 2011 and 2012, the selected samples of the Saaz (24 samples), Sládek (12 samples), Premiant (12 samples) and Agnus (5 samples) varieties were analysed in order to determine the contents of polyphenols and their antioxidative properties.

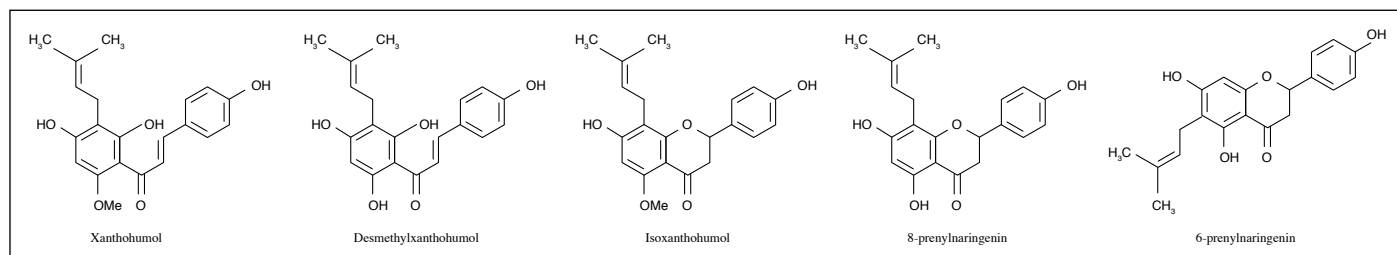
The samples were finely ground and subsequently extracted with a solution of 70% acetone in water. The analyses of TP, anthocyanogens and flavonoids were carried out according to Pivovarsko-sladařská analytika (Basařová et al., 1994). The content determinations of isoflavonoids and prenylflavonoids were done according to the method developed previously. The isoflavonoids such as daidzein, genistein, formononetin and biochanin A and prenylflavonoids such as XN, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin and 6-prenylnaringenin were separated by means of solid phase extraction (SPE) and analysed by HPLC equipped with a diode array detector (DAD) in the gradient water – acetonitrile. The results are given in $\mu\text{g/g}$ of hops (Jurková et al., 2013).

The determination of the antioxidative activities in the extracts were done using the DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) free radical scavenging method according to the approach developed previously by Mikyška et al. (Mikyška et al., 2006). This method is specific for slowly reducing compounds, particularly for polyphenols. The following values have been measured:

ARA1 [%] – radical activity 1, the decrease of the DPPH value after 1 minute of reaction time,

ARA2 [%] – radical activity 2, the decrease of the DPPH value after 10 minutes of reaction time,

ARP [%] – the integrated decrease of DPPH, 0–10 minutes reaction time.



Obr. 2 Struktura prenylflavonoidů chmele a piva / Fig. 2 Structures of prenylflavonoids in hops and beer

Stanovení antioxidační aktivity ve vyluzích pomocí volného radikálu DPPH bylo provedeno podle dříve vypracovaného postupu (Mikyška et al., 2006). Metoda postihuje zejména pomalu redukující látky, především polyfenoly. Stanovují se tyto veličiny:

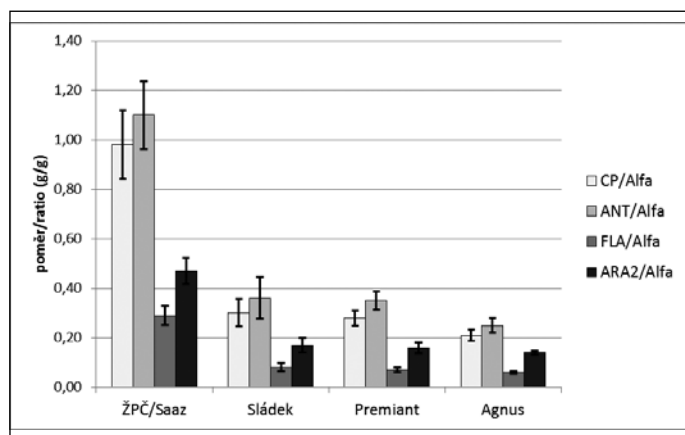
ARA1 (%) – antiradikálová aktivita 1, úbytek hodnoty DPPH po 1 minutě reakce,

ARA2 (%) – antiradikálová aktivita 2, úbytek hodnoty DPPH po 10 minutách reakce,

ARP (%) – integrovaný úbytek hodnoty DPPH 0–10 minut reakce.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky stanovení antiradikálové aktivity, celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavanoidů, isoflavonoidů a prenylflavonoidů ve chmelech jsou po odrůdách shrnuty v tab. 1 až 4.



Obr. 3 Poměr polyfenolových látek k α-kyselinám ve chmelech českých odrůd ve sklizni 2013 / Fig. 3 Ratio of polyphenols to α-acids in Czech hop varieties harvested in 2013

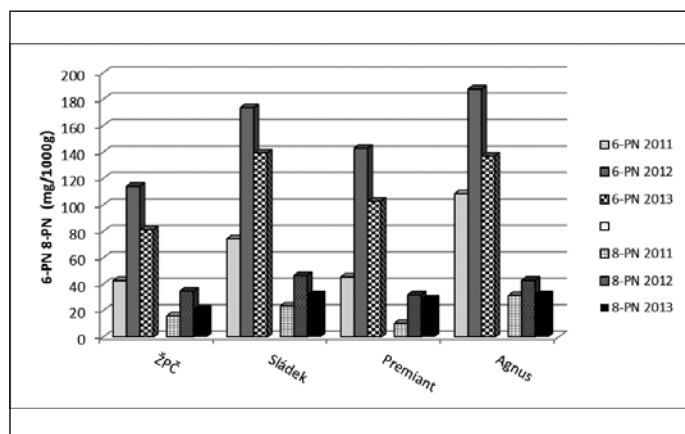
TP: Celkové polyfenoly / Total polyphenols

ANT: Anthokyanogeny / Anthocyanogens

FLA: Flavanoidy / Flavanoids

ARA2: Antiradikálová aktivita / Antiradical activity

Alfa : α-kyseliny / α-acids



Obr. 5 Obsah 6-prenylnaringeninu a 8-prenylnaringeninu ve chmelech českých odrůd ve sklizních 2011 až 2013 / Fig. 5 Contents of 6-prenylnaringenin and 8-prenylnaringenin in Czech hop varieties in harvests from 2011 to 2013

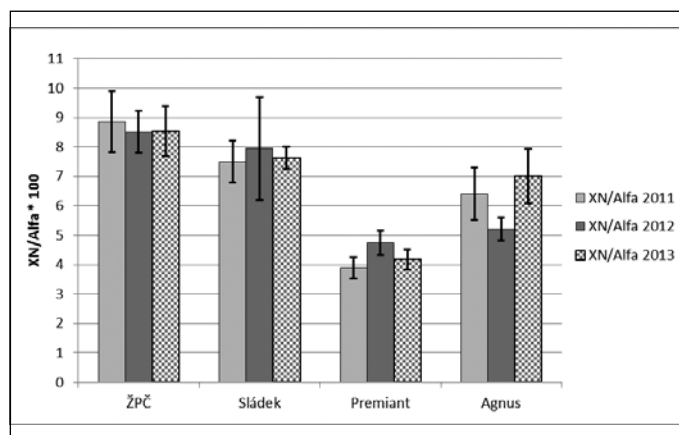
6-PN: 6-prenylnaringenin

8-PN: 8-prenylnaringenin

3 RESULTS AND DISCUSSION

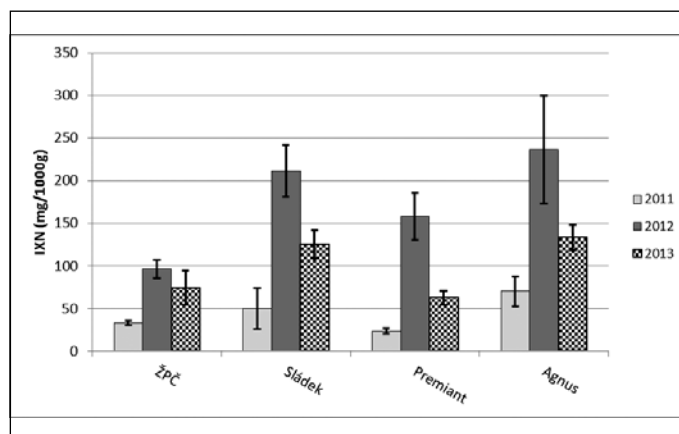
The results of the determinations of antiradical activity, TP, anthocyanogens and flavonoids in the single hops varieties are summarised in Tables 1 to 4.

The highest contents of TP, anthocyanogens and flavonoids were found in the Saaz variety and the lowest values in the Sládek variety. This matches the results found in previous past years (Tab. 5). The average content of TP in the Saaz variety was 30.6 mg/g and in the Sládek variety only 19.5 mg/g. The variations in the contents of polyphenolic substances as well as in the values for antiradical activity from a particular hops variety were lower when compared with the variations in the contents of α- and β-bitter acids. For example, the RSDs for the content of TP varied from 6.8% for the Agnus variety to 14.1% for the Premiant variety.



Obr. 4 Poměr xanthohumolu k α-kyselinám ve chmelech českých odrůd ve sklizních 2011 až 2013 / Fig. 4 The ratio of xanthohumol to the α-acids in Czech hop varieties in harvests from 2011 to 2013

XN/Alfa: Poměr xanthohumolu a α-kyselin / xanthohumol to α-acids ratio



Obr. 6 Obsah iso-xanthohumolu ve chmelech českých odrůd ve sklizních 2011 až 2013 / Fig. 6 Contents of iso-xanthohumol in Czech hop varieties in harvests from 2011 to 2013

IXN Iso-Xanthohumol

Tab. 1 Obsah polyfenolových látek a antiradikálová aktivita u chmelů odrůdy ŽPČ ve sklizni 2013 / Table 1 The content of polyphenols and antiradical activity in a Saaz hops variety harvest in 2013

		Průměr / Average	Maximum	Minimum	SD	RSD (%)	Median
α-kyseliny / α-acids %		3.12	4.38	1.85	0.72	22.9	3.06
Polyfenoly Polyphenols mg/g	TP	30.6	36.5	21.0	3.60	11.7	31.3
	ANT	34.2	39.1	27.7	3.40	10.0	33.9
	FLA	8.9	10.6	6.9	1.0	11.8	9.1
Antiradikálová aktivita Antiradical activity %/g	ARA1	7.57	8.96	5.69	0.89	11.79	7.85
	ARA2	14.73	16.39	11.91	1.28	8.67	15.39
	ARP	11.00	12.24	8.73	1.04	9.44	11.51
Isoflavonoidy Isoflavonoids μg/g	Daidzein	12.8	30.7	0.9	9.2	72.3	13.5
	Genistein	20.9	65.8	0.0	22.9	109.8	6.4
	Formononetin	2.8	7.2	0.2	1.7	60.1	2.2
	Biochanin A	2.6	19.5	0.4	3.8	147.5	1.6
Prenylflavonoidy Prenylflavonoids μg/g	6-PN	81.2	106.0	53.8	15.9	19.6	82.5
	8-PN	21.6	31.4	14.0	4.5	20.9	20.8
	IXN	74.5	248.7	34.7	47.1	63.2	60.0
	XN	2588	3152	1629	354	13.7	2618

Tab. 2 Obsah polyfenolových látek a antiradikálová aktivita u chmelů odrůdy Sládek ve sklizni 2013 / Table 2 The content of polyphenols and antiradical activity in a Sládek hop variety harvest in 2013

		Průměr / Average	Maximum	Minimum	SD	RSD (%)	Median
α-kyseliny / α-acids %		6.50	7.87	4.19	0.90	13.9	6.60
Polyfenoly Polyphenols mg/g	TP	19.5	23.8	16.5	2.70	13.9	18.0
	ANT	23.6	32.7	18.2	4.00	16.9	23.5
	FLA	5.2	7.3	4.1	1.1	20.7	5.0
Antiradikálová aktivita Antiradical activity %/g	ARA1	6.96	8.61	5.03	1.00	14.36	6.96
	ARA2	11.19	13.90	8.04	1.57	14.04	11.18
	ARP	8.81	10.93	6.37	1.24	14.03	8.81
Isoflavonoidy Isoflavonoids μg/g	Daidzein	3.7	7.0	0.9	1.9	53.0	3.6
	Genistein	40.4	87.8	6.1	22.6	55.9	37.1
	Formononetin	7.1	11.7	2.7	2.9	41.5	6.7
	Biochanin A	2.2	11.2	0.0	3.0	138.6	1.6
Prenylflavonoidy Prenylflavonoids μg/g	6-PN	139.2	243.6	104.8	38.3	27.5	122.7
	8-PN	32.6	42.6	21.8	6.4	19.7	32.7
	IXN	125.3	173.8	84.8	26.0	20.8	122.8
	XN	5210	5934	4276	417	8.0	5182

Tab. 3 Obsah polyfenolových látek a antiradikálová aktivita u chmelů odrůdy Premiant ve sklizni 2013 / Table 3 The content of polyphenols and antiradical activity in a Premiant hop variety harvest in 2013

		Průměr / Average	Maximum	Minimum	SD	RSD (%)	Median
α-kyseliny / α-acids %		8.53	10.13	5.85	1.28	15.0	8.71
Polyfenoly Polyphenols mg/g	TP	23.7	27.0	17.0	3.30	14.1	24.9
	ANT	30.0	35.0	21.2	4.70	15.6	32.3
	FLA	6.1	7.0	4.5	0.8	13.2	6.3
Antiradikálová aktivita Antiradical activity %/g	ARA1	8.41	11.40	6.38	1.31	15.59	8.20
	ARA2	13.83	16.82	11.54	1.29	9.31	13.79
	ARP	10.82	13.79	8.75	1.26	11.65	10.68
Isoflavonoidy Isoflavonoids μg/g	Daidzein	2.2	15.3	0.0	4.1	185.9	0.5
	Genistein	11.0	16.9	6.6	3.4	30.6	10.3
	Formononetin	4.4	9.2	0.0	2.9	65.9	5.2
	Biochanin A	2.1	4.8	0.0	1.6	77.7	1.4
Prenylflavonoidy Prenylflavonoids μg/g	6-PN	102.8	132.3	72.9	18.7	18.1	102.4
	8-PN	29.1	38.5	18.3	6.0	20.7	29.2
	IXN	62.6	87.7	34.5	12.8	20.4	65.6
	XN	3544	4387	2637	562	15.9	3638

Tab. 4 Obsah polyfenolových látek a antiradikálová aktivita u chmelů odrůdy Agnus ve sklizni 2013 / Table 4 The content of polyphenols and antiradical activity in a Agnus hop variety harvest in 2013

		Průměr / Average	Maximum	Minimum	SD	RSD (%)	Median
α-kyseliny / α-acids %		11.00	11.73	10.00	0.69	6.3	11.14
Polyfenoly Polyphenols mg/g	TP	23.2	25.8	21.5	1.60	6.8	22.8
	ANT	27.7	30.2	25.6	1.70	6.2	27.6
	FLA	6.1	7.0	5.7	0.5	8.0	5.9
Antiradikálová aktivita Antiradical activity %/g	ARA1	10.27	11.68	9.04	1.20	11.69	10.19
	ARA2	15.37	16.82	13.84	1.37	8.94	15.41
	ARP	12.45	13.86	11.06	1.29	10.32	12.44
Isoflavonoidy Isoflavonoids μg/g	Daidzein	70.7	156.7	0.0	70.5	99.6	63.1
	Genistein	12.6	19.6	4.6	5.3	42.3	13.0
	Formononetin	12.1	15.2	9.0	2.7	22.2	12.2
	Biochanin A	6.6	9.0	5.1	1.5	22.1	6.2
Prenylflavonoidy Prenylflavonoids μg/g	6-PN	137.0	142.4	131.1	5.4	3.9	137.2
	8-PN	32.6	34.9	31.0	1.5	4.4	32.2
	IXN	133.4	142.9	113.3	11.8	8.8	138.7
	XN	7725	9251	6689	982	12.7	7479

TP Celkové polyfenoly / Total polyphenols; ANT Anthokyanogeny / Anthocyanogens; FLA Flavonoidy / Flavonoids;
ARA1, ARA2: Antiradikálová aktivita / Antiradical activity; ARP: Antiradikálový potenciál / Antiradical potential;
6-PN 6-Prenylnaringenin; 8-PN 8-Prenylnaringenin; XN Xanthohumol; IXN Iso-Xanthohumol

Tab. 5 Obsah polyfenolových látek a antiradikálová aktivita ve chmelech českých odrůd ve sklizních 2011 až 2013 / Table 5 Contents of polyphenols and antiradical activity in Czech hop varieties in harvests from 2011 to 2013

		Rok / Year	ŽPČ/Saaz		Sládek		Premiant		Agnus	
			R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD
Polyfenoly Polyphenols mg/g	TP	2011	37.1	12.4	23.1	13.7	24.1	4.9	26.9	14.2
		2012	37.6	8.2	22.8	16.8	24.7	11.4	25.5	14.2
		2013	30.6	11.7	19.5	13.9	23.7	15.0	23.2	6.3
	ANT	2011	38.5	10.8	33.3	10.3	30.2	7.2	38.3	14.2
		2012	39.3	11.2	28.8	15.8	36.6	8.4	33.8	9.0
		2013	34.2	11.8	23.6	13.9	30.0	14.1	27.7	6.8
	FLA	2011	8.7	12.2	4.3	16.8	4.3	9.1	5.7	17.2
		2012	10.2	12.2	5.8	18.0	6.4	17.0	5.2	17.2
		2013	8.9	10.0	5.2	20.7	6.1	13.2	6.1	8.0
Antiradikálová aktivita Antiradical activity %/g	ARA2	2011	16.6	8.1	15.0	10.7	16.1	3.8	18.4	12.8
		2012	17.0	9.5	14.9	10.5	15.9	15.3	17.9	4.7
		2013	14.7	8.7	11.2	16.9	13.8	15.6	15.4	6.2
Isoflavonoidy Isoflavonoids μg/g		2011	43.2	22.1	43.4	27.1	36.3	41.4	44.0	32.6
		2012	50.2	40.0	69.0	40.2	53.8	69.9	58.1	34.0
		2013	40.2	48.0	53.3	42.1	19.7	28.0	35.4	35.8
Prenylflavonoidy Prenylflavonoids μg/g	6-PN	2011	42.6	35.3	74.4	36.9	45.4	27.6	108.5	16.2
		2012	114.2	15.6	173.7	17.7	143.0	15.5	187.8	19.5
		2013	81.2	19.6	139.2	27.5	102.8	18.1	137.0	3.9
	8-PN	2011	15.8	16.6	23.6	44.6	10.3	37.9	31.2	8.1
		2012	34.7	24.5	46.5	18.7	31.9	17.9	42.9	18.9
		2013	21.6	20.9	32.6	19.7	29.1	20.7	32.6	4.4
	IXN	2011	33.0	10.6	49.7	46.1	23.6	13.3	70.3	15.5
		2012	96.5	23.3	211.4	22.7	157.9	27.7	236.6	21.5
		2013	74.5	63.2	125.3	20.8	62.6	20.4	133.4	8.8
	XN	2011	3809	12.6	6288	41.1	3919	20.6	7565	12.7
		2012	3420	12.6	5337	7.3	4180	21.2	6251	18.0
		2013	2588	13.7	5210	8.0	3544	15.9	7725	12.7

R: Průměr/Average

RSD: Relativní směrodatná odchylka / Relative standard deviation

Isoflavonoidy: Suma analyzovaných isoflavonoidů / Sum of analyzed isoflavonoids

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavonoidů byl stanoven pro Žatecký poloraný červenák (ŽPČ), nejnižší obsah měly chmele odrůdy Sládek. To koresponduje s výsledky získanými v minulých letech (tab. 5). Průměrný obsah celkových polyfenolů pro chmele ŽPČ byl 30,6 mg/g, pro odrůdu Sládek 19,5 mg/g. Variabilita obsahu diskutovaných polyfenolových látek stejně jako variabilita antiradikálové aktivity u chmelů jednotlivých odrůd byla v rozmezí nižším oproti variabilitě obsahu α - a β -hořkých kyselin. Například relativní směrodatná odchylka obsahu celkových polyfenolů se pohybovala od 6,8 % (Agnus) do 14,1 % (Premiant).

Při praktickém hodnocení příspěvku polyfenolů chmele k jejich obsahu v pivu je nutno brát v úvahu obsah α -kyselin ve chmelu, který určuje dávku chmele při chmelovaru. Z tohoto pohledu měly chmele ŽPČ jednoznačně nejvyšší hodnoty relativního obsahu polyfenolů, poměru celkových polyfenolů (průměr 0,98 g/g) i dalších polyfenolových látek k α -kyselinám. Relativní obsah u odrůd Sládek a Premiant byl srovnatelný, nejnižší byly hodnoty u hořké odrůdy Agnus (obr. 3). Oproti sklizni 2012 byl ve sklizni 2013 obsah polyfenolů nižší přibližně v relaci s rozdílem v obsahu α -kyselin, takže relativní obsah polyfenolových látek v obou sklizních nebyl výrazně odlišný.

Je obecně známo, že obsah hořkých kyselin ve chmelu silně závisí na ročníku, průběhu vegetace. Obsah polyfenolových látek ve sklizni chmele není běžně hodnocen. V tab. 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty celkových polyfenolů, anthokyanogenů a flavonoidů hodnocených odrůd chmele ve sklizních 2011 až 2013. Obsah celkových polyfenolů ve sklizních 2011 a 2012 se prakticky nelišil, ve sklizni 2013 byl zaznamenán pokles. Rovněž obsah anthokyanogenů v roce 2013 byl oproti sklizni 2012 nižší (o cca 18 %). Obsah flavonoidů ve chmelech ze sklizně 2013 byl s výjimkou odrůdy Agnus mírně nižší (o 5 až 12 %) oproti sklizni 2012. Průměrné hodnoty antiradikálové aktivity chmelů ve sklizni 2013 byly u odrůd ŽPČ, Premiant a Agnus o cca 15 %, u odrůdy Sládek o 25 % nižší oproti hodnotám sklizně 2012. Hodnota antiradikálové aktivity chmele je vázána na obsah polyfenolových látek (Krofta et al., 2008). Jak je uvedeno výše, ve sklizni 2013 byl obsah polyfenolových látek ve chmelech oproti roku 2012 nižší.

Sumární obsah isoflavonoidů (součet obsahu daidzeinu, genisteinu, formononetinu, biochaninu A) ve chmelech sledovaných odrůd stoupal v pořadí Premiant (20 μ g/g), ŽPČ (39 μ g/g), Sládek (53 μ g/g) a Agnus (102 μ g/g). Ve skupině analyzovaných isoflavonoidů kromě chmelů odrůdy Agnus převažoval genistein. Obsah isoflavonoidů byl značně nevyrovnaný, relativní směrodatné odchylky pro jednotlivé látky u jednotlivé odrůdy byly několik desítek procent. Sumární obsah isoflavonoidů ve sklizni 2013 byl u všech odrůd s výjimkou Agnus výrazně nižší oproti sklizni 2012 a srovnatelný se sklizní 2011 (tab. 5).

Ve skupině prenylflavonoidů je dominantní xanthohumol. Nejvyšší průměrný obsah byl stanoven u chmelů Agnus (7,73 mg/g), následovaly chmele Sládek (5,21 mg/g), Premiant (3,54 mg/g) a nejnižší hodnoty byly stanoveny pro ŽPČ (2,59 mg/g). Obsah xanthohumolu u chmelů jednotlivých odrůd byl poměrně vyrovnaný (RSD 8,0 % až 15,9 %). V porovnání se sklizní 2012 byl stanoven významně nižší průměrný obsah u odrůdy ŽPČ (o 24,3 %) a Premiant (o 15,2 %) (tab. 5). Poměr xanthohumolu k α -kyselinám je nejvyšší u odrůd ŽPČ a Sládek, nejnižší u chmelů Premiant. Hodnota závisí větší měrou na odrůdě, mezi sklizněmi byly zjištěny významné rozdíly pouze u sklizní Premiant 2011/2012 a Agnus 2012/2013 (obr. 4).

Odlišná situace je u 8- a 6-prenylaringeninů. Průměrný obsah 8-prenylaringeninů byl ve sklizni 2013 u chmelů Sládek, Premiant a Agnus na úrovni 29 až 33 μ g/g, nižší obsah byl u odrůdy ŽPČ (22 μ g/g). Obsah 6-prenylaringeninů ve sklizni 2013 byl 81 μ g/g (ŽPČ) až 139 μ g/g (Sládek) a koreloval s obsahem 8-prenylaringeninů ($r = 0,758$, $n = 52$). Obsah diskutovaných látek je pravděpodobně značně závislý na ročníku. V porovnání s rokem 2012 byl zjištěn výrazně nižší obsah u odrůd ŽPČ (o 38 %), Sládek (o 30 %) a Agnus (o 24 %), v roce 2011 byly stanoveny hodnoty nižší v porovnání s rokem 2012 i 2013 (obr. 5).

Chmele obsahují i určité množství iso-xanthohumolu, jeho hlavní podíl vzniká izomerací xanthohumolu až při chmelovaru. Obsah iso-xanthohumolu slabě koreloval s obsahem xanthohumolu ($r = 0,458$, $n = 52$). Obsah iso-xanthohumolu je pravděpodobně značně ročníkově závislý, rozdíly mezi ročníky korespondovaly s rozdíly v obsahu 8- a 6-prenylaringeninů. V porovnání se sklizní 2012 byl obsah iso-xanthohumolu u sledovaných odrůd o 22 % (ŽPČ) až 60 % (Premiant) nižší, avšak v porovnání s rokem 2011 byl výrazně vyšší (obr. 6). Je zjevné, že obsah 8- prenylaringeninů, 6-prenylaringeninů i iso-xanthohumolu značnou měrou závisí na ročníku sklizně.

The evaluation of the true contribution of the hops polyphenols to the total polyphenols content in beer must also consider the content of α -acids in the hops, as this sets the hops ratio for wort boiling. From this point of view, the Saaz variety has undoubtedly the highest values for the relative content of polyphenols and for the ratio of TP/ α -acids (average of 0.98 g/g) as well as for the ratios of other polyphenolic compounds to α -acids. The relative contents of polyphenols for the Sladek and Premiant varieties were similar. The lowest values were found in the bitter Agnus variety (Fig. 3).

When compared with 2012, the content of polyphenols in hops harvested in 2013 was lower but at about the same ratio due to the decrease in the α -acids content. Therefore, the relative content of polyphenolic substances in both years was not significantly different.

According to common knowledge, the content of α -acids in hops strongly depends on the year of the harvest and on the course of the growing season. The contents of polyphenolic substances in the harvested hops are not routinely estimated. Table 5 shows the average values for TP, anthocyanogens and flavonoids in the hops varieties evaluated, from the harvests of 2011 to 2013. The total amounts of polyphenols in hops harvested in 2011 and 2012 were very similar. The hops harvested in 2013 have less polyphenols. The content of anthocyanogens was also about 18% lower in hops harvested in 2013 when compared with the hops harvested in 2012. The contents of flavonoids in the 2013 harvest were slightly lower (by 5 to 12%) when compared with the hops from 2012. The exception was the Agnus variety. The average values of antiradical activity for hops harvested in 2013 were lower by about 15% in the Saaz, Premiant and Agnus varieties and by about 25% in the Sladek variety when compared with the values determined in 2012. The value of the antiradical activity in hops depends on its content of polyphenolic substances (Krofta et al., 2008). As indicated above, the content of polyphenolic substances was lower in 2013 than in 2012.

The sum of all the isoflavonoids, (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A) in the selected hops varieties increased in the order Premiant (20 μ g/g), Saaz (39 μ g/g), Sladek (53 μ g/g), Agnus (102 μ g/g). In the group of the isoflavonoids analysed, genistein was the most common in all varieties except the Agnus variety. The contents of isoflavonoids were very unbalanced. The RSDs of the single compounds in any single variety were several tens of percent. The total content of isoflavonoids in 2013 was for all varieties, except Agnus, significantly lower than in 2012 and comparable with 2011 (Tab. 5).

The dominant compound in the prenylflavonoids group is xanthohumol. The highest average content was found in the Agnus variety (7.73 mg/g) followed by Sladek (5.21 mg/g) and Premiant (3.54 mg/g). The lowest values were determined for the Saaz variety (2.59 mg/g). The contents of XN from any single variety were quite similar. The RSDs varied from 8.0% to 15.9%. When compared with the 2012 harvest, the average content was significantly lower in the Saaz variety (by 24.3%) and in the Premiant variety (by 15.2%) (Tab. 5). The ratio of XN to α -acids is highest in the Saaz and Sladek varieties and lowest in the Premiant variety. The values depend mainly on the variety. Significant differences were only found between the harvests of Premiant in 2011 and 2012 and Agnus in 2012 and 2013 (Fig. 4).

However, 8- and 6-prenylaringenin show a different picture. The average content of 8-prenylaringenin varied between 29 and 33 μ g/g in the Sladek, Premiant and Agnus varieties harvested in 2013. A lower content of 22 μ g/g was determined for the Saaz variety. The contents of 6-prenylaringenin in hops harvested in 2013 varied from 81 μ g/g in the Saaz variety to 139 μ g/g in the Sladek variety and were in good correlation with the content of 8-prenylaringenin ($r = 0.758$, $n = 52$). The contents of 8- and 6-prenylaringenin are probably dependent on the year of the harvest. In hops harvested in 2013, significantly lower contents were found than in 2012, namely in the Saaz variety by 38%, in the Sladek variety by 30% and in the Agnus variety by 24%. In 2011, even lower values than in the two following years were determined (Fig. 5).

Hops also contain a certain amount of isoxanthohumol. The main part is produced by the isomerization of XN during wort boiling. The content of isoxanthohumol correlated weakly with the XN amount ($r = 0.458$, $n = 52$). The differences between the years matched the differences in the contents of 8- and 6-prenylaringenin. In 2013, the content of isoxanthohumol was 22% lower in the Saaz hops and even 60% lower in the Premiant hops when compared with 2012, however, significantly higher when compared to the year 2011 (Fig. 6). It is obvious that the contents of isoxanthohumol as well as those of 8- and 6-prenylaringenin depend strongly on the course of the growing season.

4 ZÁVĚR

Studie provedená na sklizni 2013 poskytla data pro tříleté kontinuální hodnocení obsahu polyfenolových látek s potenciálním zdravotním benefitem ve chmelu.

Obsah celkových polyfenolů významných z hlediska CHZO České pivo, a rovněž tak obsah anthokyanogenů a flavanoidů závisí na odrůdě chmele, variabilita v rámci sklizně činí přibližně 20 až 30 % (RSD = ± 10 až 15 %), obdobnou variabilitu je možno očekávat v závislosti na ročníku. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů má odrůda ŽPČ, nejnižší odrůda Sládek, ale odrůdy Sládek, Premiant a Agnus se v tomto parametru výrazně neliší. Poměr celkových polyfenolů k α -kyselinám klesá v řadě ŽPČ (rok 2013 – 0,98 g/g) – Sládek – Premiant – Agnus (rok 2013–0,21 g/g), výrazný je pouze rozdíl mezi ŽPČ a hybridními odrůdami. V ročníku 2013 byl poměr TP/ α -kyseliny srovnatelný se sklizní 2012.

Dosavadní výsledky ukazují, že obsah isoflavonoidů ve chmelech konkrétní odrůdy ve sklizni značně kolísá, rozdíly mezi testovanými odrůdami nebyly prokázány.

Prenylflavonoidy jsou spolu s pryskyřicemi a silicemi obsaženy v lupulinových zrnech. Jejich obsah ve chmelu je primárně dán odrůdou. Obsah majoritní složky, xanthohumolu je u chmelů jednotlivých odrůd poměrně vyrovnaný (RSD 8,0 % až 15,9 %) a klesá v pořadí Agnus – Sládek – Premiant – ŽPČ. Poměr xanthohumol/ α -kyseliny je nejvyšší u odrůd Sládek a ŽPČ, nejnižší u odrůdy Premiant.

Obsah dalších prenylflavonoidů, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin (fytoestrogeny) a iso-xanthohumolu je v porovnání s xanthohumolem řádově nižší a jejich obsah ve chmelu jeví velkou variabilitu v závislosti na ročníku. Tomuto aspektu bude věnována pozornost v další práci.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, projekt RO1013 „Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin“.

4 CONCLUSIONS

The study performed on the hops harvested in 2013 provides data for the continuous evaluation of contents of the polyphenolic substances with potential health benefits over the last three years.

The contents of total polyphenols, which are very important in terms of the PGI for Czech beer as well as the contents of anthocyanogens and flavonoids depend on the hops variety. The variability within the harvest was about 20 to 30% (RSD = ± 10 –15%). A similar variability can be expected, independent of the year of harvest. The Saaz variety has the highest amount of total polyphenols and the Sladek variety the lowest. However, regarding this parameter, the Sladek, Premiant and Agnus varieties are very similar. The ratio of TP to α -acids analysed in 2013 decreases in the order the Saaz variety with a value of 0.98 followed by the varieties Sladek and Premiant and the Agnus variety a value of 0.21. The only significant difference is between the Saaz variety and the other hybrid varieties. The ratio of TP to α -acids was comparable with the values from the 2012 harvest.

The current results indicate a considerable variability in the contents of isoflavonoids in the single varieties. Nevertheless, no significant differences were proven in the varieties evaluated.

Prenylflavonoids along with resins and essential oils are present in the lupulin corns. Their content in hops is primarily set by the variety. The content of xanthohumol, which is the most common compound in this group, is quite similar in the single varieties. The RSDs varied from 8.0 to 15.9%. The content decreases in the order Agnus, Sladek, Premiant and Saaz. The ratio of XN to α -acids is highest in the Sladek and Saaz varieties and lowest in the Premiant variety.

The contents of other prenylflavonoids in hops such as the phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-prenylnaringenin, and isoxanthohumol when compared with XN are significantly lower and more variable. They depend strongly on the year of the harvest. This aspect will be the subject of a following study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was accomplished within the framework of the Research Project RO1013 “Research of Quality and Processing of Malting and Brewing Raw Materials” with the financial support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

Translated by Eva Paterson

LITERATURA / REFERENCES

- Anonymous, 2008: Úřední věstník EU, C016, 23/01/2008, 0014–0022.
- Basařová, G., 1994: Pivovarsko sladařská analytika, Merkanta, Praha 1994.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství, Vydavatelství VŠCHT Praha.
- Callemien, D., Bennani, M., Counet, C., Collin, S., 2005: Which polyphenols are involved in aged beer astringency? Assessment by HPLC and time-intensity method. Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Prague, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, CD-ROM, 2005: 809–814.
- Derdelinckx, G., 2008: Polyphenols in wort and beer: State of art in 2008: Where and why? Cerevisia, 33 (4): 74–187.
- Gerhäuser, C., 2005: Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. European J. Cancer, 41: 1941–1954.
- Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2000: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hop, *Humulus lupulus*. Xenobiotica, 30 (3): 235–251.
- Jurková, M., Čejka, P., Houška, M., Mikyška, A., 2013: Simultaneous Determination of Prenylflavonoids and Isoflavonoids in Hops and beer by HPLC-DAD Method: Study of Green Hops Homogenate Application in the Brewing Process. Kvasny Prum. 59 (2): 41–49.
- Kondo, K., 2003: Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. Proceedings of the 29th EBC Congress, Dublin, Contribution 133.
- Krofta, K., Mikyška, A., Hašková, D., 2008: Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. Journal of the Institute of Brewing, 114(2): 160–166.
- McLaughlin, I. R., Lederer, C., Shellhammer, T.H., 2008: Bitterness-modifying properties of hop polyphenols extracted from spent hop material. Journal of American Society of Brewing Chemists, 66(3): 174–183.
- Mikyška, A., Jurková, M., 2014: Evaluation of bitter acids and polyphenols content in Czech hops harvest in 2013 – I Contents of α - and β - Bitter Acids. Kvasny Prum. 60(4): 88–95.
- Mikyška, A., Krofta, K., Hašková, D., 2006: Evaluation of antioxidant properties of hop and hop products: Kvasny Prum., 52(7–8): 214–218.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., De Keuleleire, D., 1999: Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83: 2249–2252.
- Miranda, C.L., Aponso, G.L.M., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2000: Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. Cancer Letters, 149: 21–29.
- Olšovská, J., Čejka, P., Benešová, K., Jurková, M., 2013: Czech beer and its effect on human health. Kvasny Prum., 59(10–11): 331.
- Stevens, J.F., Page, J.E., 2004: Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health? Phytochemistry, 65: 1317–1330.
- Tobe, H., Muraki, Y., Kitamura, K., Komiyama, O., Sato, Y., Sugioka, T., Maruyama, H.B., Matsuda, E., Nagai, M., 1997: Bone resorption inhibitors from hop extract. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61, 158–159.