

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Vladimíra Jandovská

STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK VE
CHMELU METODOU LC/HR-MS

Determination of biologically active compounds in hops by LC/HR-
MS method

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Školitel: Ing. Martin Dušek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 5. 2016

Podpis

ABSTRAKT

Obsahem této práce je vývoj a optimalizace metody pro identifikaci polyfenolických látek pocházejících ze chmelu (*Humulus lupulus* L.) s potencionální antimikrobiální aktivitou. V rámci extrakce látek ze chmelu byly sušené chmelové hlávky aplikovány do růstového media, odkud látky difundovaly do agaru a po naočkování bakteriálním kmenem *Streptococcus aureus* vytvořily inhibiční zónu. Pro extrakci látek z agaru byla optimalizována metoda kombinující extrakci acetonem s vysolením metodou QuEChERS. Měření probíhalo s použitím LC/HR-MS s hybridním analyzátozem kvadrupól-orbitální pastí. MS metoda byla vyvinuta jako screening s následnou fragmentací látky na základě seznamu hmot. Látky extrahované z inhibiční zóny byly následně identifikovány buď proti databázi, anebo byla jejich struktura objasněna pomocí fragmentačních spekter.

ABSTRACT

This thesis describes development and optimization of method for identification of polyphenols compounds present in hops (*Humulus lupulus* L.) that have potential antimicrobial activity. Within extraction of compounds from hop, minced hop cones were applied in a growth medium, where compounds diffused into the medium and created an inhibition zone after inoculated with *Streptococcus aureus*. The method combining extraction with acetone and salting out using QuEChERS principles was optimized for extraction of compounds from solid growth medium. The analysis was carried out using LC/HR-MS with a quadrupole-orbitrap hybrid mass analyzer. The MS method was developed as a screening method with a subsequent fragmentation of compound of interest on the basis of inclusion mass list. The compounds extracted from inhibition zone were identified either by searching against a database or their structures have been elucidated on the basis of their fragmentation spectra.

Klíčová slova: HPLC, MS, chmel, biologicky aktivní látky

Key words: HPLC, MS, hops, biologically active compounds

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Martinu Duškovi, Ph.D., za cenné rady, trpělivost a zkušenosti, které mi předal při zpracování diplomové práce. Doc. MUDr. Pavlu Čermákovi, CSc., děkuji za mikrobiologickou přípravu vzorků. A RNDr. Janě Olšovské, Ph.D., a Mgr. Františku Frantíkovi děkuji za korektury textu.

Dále děkuji Grantové agentuře ČR, která podpořila tuto studii v rámci projektu 14-10233S, *Humulus lupulus* L. – zdroj látek s antimikrobiálními účinky.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	8
2.2	Hmotnostní spektrometrie	8
2.2.1	Druhy ionizace a iontové zdroje	9
2.2.2	Analyzátory	10
2.2.3	Detektory	13
2.3	Spojení LC a MS	13
2.4	Chmel	14
2.4.1	Morfologie chmele	14
2.4.2	Biologicky aktivní látky ve chmelu	15
2.5	Testování antimikrobiální aktivity	23
2.5.1	Kvantitativní metody	23
2.5.2	Kvalitativní metody	24
2.6	Stanovení aktivních látek ve chmelu pomocí hmotnostní spektrometrie	25
3	Experimentální část	27
3.1	Chemikálie	27
3.2	Vzorky	27
3.3	Přístroje	28
3.4	Postup	29
3.4.1	Příprava standardních roztoků	29
3.4.2	Příprava kalibračních roztoků	29
3.4.3	Předseparace antimikrobiálních látek pomocí agarové difúzní metody	30
3.4.4	Extrakce z pevného agarového media	31
3.4.5	Postup měření	32
4	Výsledky	37
4.1	Optimalizace extrakčního procesu polyfenolických látek z pevného agarového media 37	
4.2	Analýza dat pomocí softwaru SIEVE	40
4.3	Identifikace a strukturní elucidace neznámých látek	41
4.3.1	Strukturní elucidace	42
4.3.2	MS ⁿ – strukturní elucidace založena na fragmentaci ve zdroji	48
5	Diskuze	52
6	Závěr	54

Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BVD	bovinní virová diarrhoea
CCM	česká sbírka mikroorganismů
CI	chemická ionizace
CV	variační koeficient
ddMS ²	závislé MS ² skeny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FWHM	šířka v polovině výšky píku
HSV	herpes simplex virus
ICR, FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
IT	iontová past
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
m/z	poměr hmotností ku náboji
MALDI	desorpce laserem za přítomnosti matrice
MBC	minimální baktericidní koncentrace [μmol/l]
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace [μmol/l]
MS	hmotnostní spektrometrie
Q	kvadrupól
QqTOF	hmotnostní analyzátor kombinující kvadrupól a analyzátor doby letu
QuEChERS	extrakčně vysolovací metoda, (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
TI-TOF	hmotnostní analyzátor kombinující iontovou past s analyzátozem doby letu
TOF	analyzátor doby letu
TSI	ionizace termosprejem
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast

1 ÚVOD

Antimikrobiální vlastnosti chmele jsou obecně známy, je však jen málo informací o antimikrobiální aktivitě jednotlivých chmelových látek. Cílem této práce bylo popsat látky, zejména polyfenolické sloučeniny, pocházející z chmele a vykazující potenciální antimikrobiální vlastnosti. Vlastní experimenty budou založeny na použití difuzní agarové metody k preselekcii látek s potenciálně antimikrobiálními účinky, vývoji a optimalizaci extrakčního postupu a dále pak na identifikaci těchto látek pomocí spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem umožňujícím měření přesné hmoty (LC/HR-MS).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je jeden z druhů kapalinové chromatografie, při kterém se pro zlepšení účinnosti separace používají stacionární fáze s částicemi menšími než 2 μm . Ultra-vysokoúčinné chromatogramy pracují při tlacích okolo 100 MPa i více, a v kombinaci velikostí částic lze dosáhnout vyššího rozlišení píků a zkrácení délky kolony na 50 – 150 mm (délka kolony u HPLC metod je až 250 mm), a tím k výraznému zkrácení doby analýzy. Dále je možná i úspora rozpouštědel.

Materiály pro stacionární fázi v UHPLC se volí podle polarit analytu. Pro nepolární analyty se používají nemodifikované materiály jako silikagel, mobilní fázi bývá pak například hexan. Pro separaci na reverzní fázi, tedy pro polární analyty, se volí modifikovaný silikagel s navázanými nepolárními skupinami, nejčastěji C18 nebo méně často C8. Nejvyšší nároky jsou kladené na stabilitu jak chemickou, pro použití v širokém rozmezí pH, tak mechanickou stabilitu, důležitou pro odolnost vůči velmi vysokým tlakům¹.

2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometry jsou tvořeny třemi základními částmi: iontovým zdrojem, analyzátozem a detektorem částic.

Počátky hmotnostní spektrometrie se datují od konce 19. století. V této době byl objasněn pohyb nabitých částic v elektrickém i magnetickém poli. J. J. Thomson později sestavil přístroj, který uměl měřit poměr hodnot e/m (poměr elektronu ku hmotě) a nepřímo tak měřit hmotu elektronu. Poté s pomocí F. W. Astona sestavil první parabolický hmotnostní spektrometr pro analýzu nabitých částic. Následoval velký rozvoj při navrhování hmotnostních spektrometrů především v oblasti rozlišovací schopnosti, a díky tomu byla v roce 1913 dokázána existence izotopie^{2,3}.

Vývoj hmotnostní spektrometrie provází i několik Nobelových cen v oblasti fyziky i chemie, a to za objev izotopů neradioaktivních prvků prostřednictvím hmotnostního spektrometru (F. W. Aston, 1922), za vývoj techniky iontové pasti (W. Paul, 1989) a za vývoj měkkých ionizačních technik elektrospreje (ESI) a desorpční ionizaci laserem (MALDI) pro analýzu biologických makromolekul (J. B. Fenn, K. Tanaka, 2002)^{4,5}.

2.2.1 Druhy ionizace a iontové zdroje

V iontových zdrojích vznikají ionty v plynné fázi, které se mohou dále rozpadat neboli fragmentovat. Mohou vznikat kladně M^+ nebo záporně M^- nabitě pseudomolekulární ionty, adukty nebo fragmenty ionizovaných molekul¹.

V iontových zdrojích vznikají ionty v plynné fázi, které se mohou dále rozpadat neboli fragmentovat.

Elektronová ionizace (EI) je založena na předávání energie letících elektronů molekulám analyzované látky. Tento druh ionizace je vhodný pro těžké a termostabilní látky. U chemické ionizace (CI) nejdříve dochází k ionizaci reakčního plynu, následně pak se ionizují molekuly analytu. Obě ionizační techniky se používají především v hmotnostní spektrometrii spojené s plynovou chromatografií.

Velmi využívaná metoda pro spojení MS s chromatografií kapalinovou je ionizace elektrosprejem (ESI), která využívá vysokého napětí za atmosférického tlaku. Tato technika je vhodná pro ionogenní molekuly a molekuly polárního charakteru, a to i o vyšších molekulárních hmotnostech, jako jsou například biopolymery. Za atmosférického tlaku lze provádět tzv. chemickou ionizaci (APCI), a to za pomoci elektrického výboje. Technika je vhodná pro ionizaci méně polárních látek, není však použitelná pro vysokomolekulární látky. Velmi dobře pomocí APCI ionizují steroidní látky nebo např. flavonoidy. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) využívá UV záření k fotoexcitaci molekuly analytu převedeného do plynné fáze a následné ionizace. Stanovovanými analyty mohou být i látky velmi nepolární. Tento zdroj může být použit i jako termosprej (TSI), protože molekuly některých analytů mohou ionizovat i bez interakce s fotonem. S těmito způsoby ionizace lze měřit v pozitivním i negativním módu. V pozitivním módu mohou vznikat kladně nabitě M^+ pseudomolekulární ionty a

adukty s H^+ , NH_4^+ , ale i s Na^+ a K^+ . Nevýhodné jsou adukty s Na^+ , protože velmi obtížně fragmentují. V pozitivním módu dobře fragmentují látky, které mají ve své struktuře NH funkční skupinu. Ionty s hydroxylovou funkční skupinou lépe fragmentují v módu negativním^{6,3}.

Lze využít i desorpční techniky, např. desorpční ionizaci vzorku laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Tato ionizační technika nemusí být spojena se separační technikou. Je vhodná především při analýze biologických makromolekulárních látek, například pro intaktní proteiny. U analytů lze měřit náboj nebo molekulovou hmotnost.

2.2.2 Analyzátoary

V analyzátoaru hmotnostního spektrometru dochází k dělení iontů z iontového zdroje za vakua, na základě poměru hmotnosti iontu a jeho náboje (m/z), pomocí elektrického nebo magnetického pole nebo kombinace obou.

Skenující analyzátoary kontinuálně v čase separují jen určitou hmotu m/z . Do této skupiny hmotnostních analyzátoarů patří kvadrupól, který na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitury střídavého napětí, vloženého na tyče, nechá projít s ionty s určitou hodnotou m/z mezi kvadrupólovými tyčemi k detektoru. Kvadrupólový analyzátoar (Q) může pracovat ve dvou režimech, ve skenovacím režimu dojde k proměření všech hmot m/z v krátkém časovém úseku, ve druhém režimu prochází jen ionty s určitou hodnotou m/z . V iontových pastech dochází k zadržování iontů v pasti a následnému vypuzení podle jejich poměrů hodnot m/z . V průletových analyzátoarech dochází k transmissi všech iontů současně. K separaci dojde díky rozdílné rychlosti letu ve vztahu k m/z . Příkladem průletového analyzátoaru je TOF neboli analyzátoar doby letu. Záchytové analyzátoary pracují na základě zachycení iontů v cele nebo pasti. Cyklotronová rezonance (ICR) a Orbitrap využívají Fourierovu transformaci, takže mohou fungovat zároveň jako detektor³.

Analyzátoar doby letu

V tomto typu průletového analyzátoaru se ionty akcelerují elektrickým polem vakuové trubice. V trubici se měří doba letu iontů od iontového zdroje k detektoru,

kteřá je úměrná hodnotě m/z daných iontů. Ionty s nižší hmotností mají vyšší rychlost, potřebují tedy kratší dobu k překonání vzdálenosti mezi detektorem a zdrojem³. U TOF analyzátorů existují dvě uspořádaní, s kolmou akcelerací nebo s reflektorem. V prvním případě jsou ionty akcelerovány kolmo na proud iontů. To vede k tomu, že akcelerované ionty mají stejnou kinetickou energii. Při uspořádaní s reflektorem se letící ionty pohybují v oblasti omezené kvadratickým potenciálem, který působí jako iontové zrcadlo, což vede k zvětšení dráhy letu iontů a k zvýšení rozlišovací schopnosti⁷.

Iontová past

Iontová past (IT) je tvořena kruhovou elektrodou a koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Při vloženém napěťovém pulzu do cely vlétají elektrony. Změnou poměrů napětí mezi koncovými elektrodami a kruhovou elektrodou jsou elektrony uvnitř pasti zadržovány nebo vylévají z cely podle jejich hodnot m/z ⁸. Používá se zde tlumící plyn pro zlepšení záchytu, a tedy i rozlišení. Při lineárním uspořádaní pasti dochází k větší efektivitě záchytu iontů v pasti, rychlejšímu skenování a většímu rozlišení⁹.

Cyklotronová rezonance

Analýza iontů v ICR je založena na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli v cyklotronové cele. Z iontového zdroje se ionty pohybují se vzrůstajícím vakuem do cely, která je umístěna uvnitř supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem. Ionty jsou stabilizovány v cele díky elektrostatickému poli na zachycovacích elektrodách a rotují po daných drahách s danou frekvencí, která závisí na poměru hmotnosti iontu a náboje m/z . Ionty v cele rotují po úzkých orbitách, po aplikaci rychlého frekvenčního napěťového pulzu je pohyb iontů excitován a ionty se stejnou hodnotou m/z se synchronizují do oblaků. Pohyb oblaků je v rezonanci s excitovaným napětím na vyšších orbitách. Na detekčních elektrodách je měřen střídavý proud, který je při průletu indukován. Intenzita frekvence je úměrná počtu iontů v oblaku. Změnou frekvence excitačního napětí dojde k zrušení rezonance pro oblak iontů o daném poměru m/z a k jejich následné relaxaci a pádu iontů opět na nízké orbity. Proměřením

všech m/z v určitém rozsahu dostaneme spektrum detekovaných frekvencí v čase, Fourierovou transformací se spektrum frekvencí převede na spektrum intenzit a transformací na další formát získáme výsledné hmotnostní spektrum intenzit závislé na m/z ^{10,11}.

Orbitální past

Orbitální past (Orbitrap) je hmotnostní analyzátor, díky kterému jsou hmotnostní analýzy s vysokým rozlišením dostupné i pro běžné analytické a biologické laboratoře¹². Orbitální past pracuje na principu detekce proudového obrazu s využitím elektrostatického pole. Analyzátor je tvořen třemi elektrodami, dvěma vnějšími osově souměrnými elektrodami a středovou neboli centrální elektrodou, která má tvar vřetena. Ionty jsou transferovány do prostoru mezi elektrodami a pohybují se okolo a podél středové elektrody. Vložení napětí na elektrody dojde k vytvoření elektrického pole, díky kterému je trajektorie proudu iontů zakřivována směrem ke středové elektrodě, zároveň jsou ionty stlačovány k nejširší části iontové pasti a dojde ke stabilizaci trajektorie. Poměr mezi hmotností iontu a nábojem m/z souvisí s frekvencí oscilace iontu^{13,14}. Obíháním náboje vznikají indukované proudy, u kterých se měří oscilace. Tyto oscilace se následně pomocí Fourierovy transformace převedou z časové domény na frekvence, které odpovídají hodnotám m/z měřených iontů¹².

Rozlišovací schopnost orbitální pasti je nižší než u ICP, a to 100 až 240 tisíc. Správnost určení hmotnosti je 1-3 ppm, hmotnostní rozsah je do 6000 Da. Oproti FT-ICR má orbitální past výrazně nižší pořizovací náklady a je mnohem méně prostorově náročná¹².

Hybridní kombinace analyzátorů

V některých případech lze využít dva nebo i více analyzátorů, a tím zkombinovat různé výkonnostní charakteristiky jednotlivých typů analyzátorů v jednom hmotnostním spektrometru. Lze tak zvýšit rozlišovací schopnost, rychlost analýzy¹⁵ nebo správnost měření. Nejběžnější hybridní kombinací analyzátorů je QqTOF, který se skládá z trojitého kvadrupólu (Q; 2. analyzátor) a analyzátoru doby letu (TOF; 1. analyzátor),

mezi kterými je umístěna kolizní cela (q). Kvadrupól je obvykle umístěn na transmisi iontů s danou konstantní hodnotou m/z . Ionty prochází prvním analyzátozem, který skenuje, dále ionty fragmentují v kolizní cele, jsou však detekovány pouze tehdy, pokud vznikají fragmenty se specifickou hodnotou m/z . Ionty produkující stejné charakteristické fragmenty jsou detekovány selektivně¹⁶. Kombinaci lineární iontové a orbitální pasti umožňuje široký rozsah detekce s vysokou rozlišovací schopností (min. 100 000 FW HM), přesností a dynamickým rozsahem. Lze provádět MSⁿ analýzy komplexních matric¹⁵. Další příklady hybridních typů analyzátozů jsou IT-TOF, LIT/FT-ICR nebo MALDI/Orbitální past.

2.2.3 Detektory

Detektor zaznamená ionty, které prošly hmotnostním analyzátozem. Detektory, založené na přímém měření elektrického proudu, zaznamenávají všechny ionty, signál je zesilován násobičem a vyhodnocen. Cyklotronová rezonance a orbitální past mohou detekovat ionty ve vztahu k velikosti hodnot m/z a signál je dále zpracován Fourierovou transformací³.

2.3 Spojení LC a MS

Hlavním kritickým bodem spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je převedení analyzované látky do plynného skupenství, odstranění velkého nadbytku mobilní fáze proudem sušícího plynu a vyrovnání pracovního prostředí, protože analyty jsou na výstupu kapalinového chromatogramu unášeny proudem mobilní fáze za atmosférického tlaku, zatímco hmotnostní spektrometr pracuje v prostředí vysokého vakua¹⁷.

Spojení chromatografických technik s hmotnostní spektrometrií se využívá například při organických analýzách v environmentálních i jiných vědních oborech, nebo pro charakterizaci biologických látek, např. pro stanovení molekulové hmotnosti. Důležité je i využití při studiu metabolismu léčiv a xenobiotik a sekvenování proteinů¹.

2.4 Chmel

2.4.1 Morfologie chmele

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) je dvoudomá liánovitá rostlina patřící do čeledi *Cannabaceae*¹⁸. Samčí rostliny vytvářejí nažloutlé drobné květy, samičí květy se skládají ze zelených krátkých klasů, tzv. šištic nebo chmelových hlávek. V pivovarství nebo ve farmaceutickém průmyslu a bylinkářství se používají jen květy samičích rostlin.

Chmelová hlávka je tvořena stopkou, věténkem, krycími a pravými listeny s lupulinovými žlázkami. Krycí a pravé listy jsou strukturou podobné listu a jsou připojeny k věténku, které vyrůstá ze stopky a připojuje tak hlávku k větévce. Krycí listeny jsou špičaté, mají ochranou funkci a obsahují malé množství lupulinových žláz. Na rozdíl od pravých listenů, které mají zaoblený tvar, obsahují velké množství lupulinových žláz. Ty jsou tvořeny drobnými žlutými váčky a nacházejí se na spodní straně okvětních listů chmelové hlávky¹⁹.

Během zrání produkují lupulinové žlázy sekundární metabolity, které jsou pro chmel charakteristické (pryskyřice, silice a polyfenolické látky), a které se nacházejí na pravých listenech²⁰. Tvrdé pryskyřice jsou složeny z oxidačních produktů měkkých pryskyřic vznikajících během zrání chmele, po sklizni, ale i během skladování. Tvrdé pryskyřice obsahují xanthohumol, nejvýznamnější prenylovaný chalkon chmelu. Xanthohumol je vylučován jako součást chmelových pryskyřic žlázkovými trichomy na vnějším povrchu krycích listenů hlávky a na spodní straně mladých listů chmele²¹. Měkké pryskyřice obsahují alfa-hořké kyseliny (humulony), beta-hořké kyseliny (lupulony) a další necharakterizované měkké pryskyřice.

Polyfenolické látky se vyskytují v největších koncentracích v zelené části chmelové hlávky (stopka, krycí a pravé listeny), ale v různých částech hlávky se vyskytují různé skupiny polyfenolických sloučenin. K syntéze většiny polyfenolů dochází v nespecifických buňkách pletiv^{22,19}. Polyfenoly jsou sekundární produkty metabolismu chmele obsahující více než jednu hydroxylovou skupinu. Mezi polyfenoly patří skupiny jako flavonoly, flavan-3-oly, fenolové karboxylované kyseliny a další. Jednou z významných skupin jsou prenylflavonoidy, které lze ale řadit i do chmelových

pryskyřic. Prenylflavonoidy vznikají stejně jako pryskyřice v lupulinových žlázkách, na rozdíl od většiny polyfenolických látek¹⁹.

2.4.2 Biologicky aktivní látky ve chmelu

Mezi hlavní skupiny látek s biologickou aktivitou nacházející se ve chmelu patří silice, tvrdé a měkké pryskyřice a polyfenolické látky. Chemické složení chmele ovšem závisí na odrůdě, pěstebních podmínkách, klimatických podmínkách a dále pak na způsobu skladování a úpravách chmele po sklizni.

2.4.2.1 Silice

Jako silice se označuje komplexní směs těkavých látek obsažených především ve chmelové hlávce. Tyto látky jsou odpovědné za charakteristickou vůni chmele a posléze i piva. Doposud bylo identifikováno přes několik set až tisíc složek patřících do chmelových silic²³.

Silice se rozdělují do tří hlavních skupin, kde největší zastoupení mají uhlovodíky, dále pak oxidované sloučeniny a asi 1 % silic tvoří sirná frakce²⁴. Mezi uhlovodíky převládají monoterpeny (např. myrcen, linalol, geraniol), seskviterpeny (např. alfa-humulen, beta-karyofylen) a alifatické uhlovodíky o šesti až jedenácti atomech uhlíku²⁵. Nejvýznamnější sloučeninou je beta-myrcen, který ve chmelu tvoří 30 až 60 procent celkových silic. Tento monoterpen je velmi těkavý a čerstvému chmelu dává štiplavý zápach⁹. Seskviterpen alfa-humulen se velmi ochotně transformuje na epoxidy, jejichž oxidační produkty také přispívají k typické vůni piva²³.

U chmelových silic byly popsány pozitivní účinky, kterých se využívá nejen ve farmacii a při alternativních léčbách nejrůznějších obtíží. Mírný sedativní efekt je využíván především při poruchách spánku²⁶. Chmelový extrakt silic a hořkých kyselin pomáhá uvolnit napětí a nervozitu a v kombinaci nejčastěji s kozlíkem lékařským (*Valeriana officinalis*) jej lze použít jako doplněk k sedativním farmakům nebo jejich alternativu²⁷.

2.4.2.2 Měkké pryskyřice

Měkké pryskyřice neboli hořké kyseliny patří mezi významné složky chmelových pryskyřic²⁸. Jsou to deriváty floroglucinolu a lze je rozdělit na alfa- a beta-hořké kyseliny. Sušený chmel obsahuje 2 – 17 % alfa kyselin a 2 – 10 % beta kyselin v závislosti na odrůdě chmele²³. Obě skupiny obsahují acylový postranní řetězec o různém počtu uhlíků²⁷. Vzhledem k některým strukturním rozdílům alfa a beta kyselin jsou odlišné i jejich vlastnosti. Alfa kyseliny mohou izomerovat za zvýšené teploty a vytvářet tak iso-alfa kyseliny, které jsou více rozpustné. Na rozdíl od beta kyselin, které neizomerují, protože ve struktuře beta-hořkých kyselin je terciární alkoholová skupina na šestém uhlíku aromatického jádra nahrazena prenylovým řetězcem²⁹. Také proto má molekula jako celek hydrofobní charakter, oproti alfa kyselinám, které jsou ve vodě rozpustné mnohem více²⁸. Kromě toho beta kyseliny velmi ochotně podléhají oxidačním procesům²⁹.

Hořké kyseliny jsou ve chmelu přítomné v komplexních směsích o různém složení a různých koncentracích. Mezi hlavní alfa kyseliny neboli humulony se řadí humulon, který může být zastoupen ze 35 až 70 % v celkových alfa kyselinách, kohumulon a adhumulon. Mezi hlavní beta kyseliny neboli lupulony patří lupulon, kolupulon a adlupulon. Ve stopovém množství mohou být ve chmelu přítomné další homology hořkých kyselin jako posthumulony a prehumulony, respektive postlupulony a prelupulony²⁷.

Alfa-hořké kyseliny jsou široce využívanými látkami v oblasti fyto medicíny²³. Už od středověku se chmel využíval ke zmírnění bolestivých zánětlivých onemocnění, například zánětů ucha nebo při revmatických obtížích³⁰. Alfa kyseliny také vykazují potenciální antikarcinogenní účinky²³.

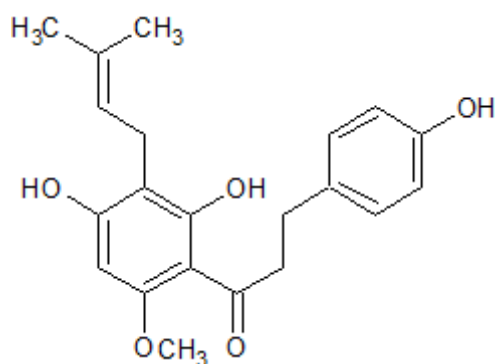
Antimikrobiální účinky chmele byly rozpoznány už ve středověku. Chmel byl zpočátku do piva přidáván pouze jako konzervační prostředek a jednou z hlavních sloučenin inhibující růst bakterií jsou právě hořké kyseliny. U beta-hořkých kyselin byl prokázán tento účinek proti celé řadě bakterií. V první polovině dvacátého století byl chmel používán při léčbě tuberkulózy. Účinky byly pozorovány na pracovnících v pivovarech, kteří měli snížený výskyt vzniku toho onemocnění v porovnání s dělníky pracující v jiných odvětvích. Později se ukázalo, že hlavní aktivní složkou byly beta-

hořké kyseliny. Silný inhibiční účinek byl prokázán proti některým druhům bakterií, které přispívají k zhoršení neurodermatitid a aknézních stavů pokožky, neboli zánětům vývodu kožních mazových žláz³⁰. Hořké kyseliny byly také testované proti širokému spektru kmenů bakterie *Helicobacter pylori*, která může způsobovat žaludeční vředy a záněty zažívacího traktu, které mohou vést až k rakovině žaludku. V této studii byla potvrzena vyšší účinnost beta-hořkých kyselin oproti alfa kyselinám³¹.

Hořké kyseliny jsou účinné proti metabolickým poruchám, které mohou vést onemocněním jako *diabetes mellitus*, kardiovaskulárním onemocněním nebo metabolickému syndromu³². U hořkých kyselin byly objeveny také účinky na centrální nervovou soustavu, především jde o hypnotické, analgetické, protikřečové a hypotermické účinky^{33,34}. Dále byly prokázány antivirotické a antifungální účinky hořkých kyselin. Chmelový extrakt byl testován proti plísním, které mohou způsobovat onemocnění nohou. Výsledky ukázaly, že by alfa- a beta-hořké kyseliny mohly být používány při léčbě těchto dermatologických potíží, kterými trpí zejména sportovci³⁰.

2.4.2.3 Tvrdé pryskyřice

Tvrde pryskyřice jsou látky, které jsou obecně špatně rozpustné ve vodě i některých organických rozpouštědlech, jako např. hexan. Skládají se především z oxidačních produktů měkkých pryskyřic, tedy alfa- a beta-hořkých kyselin. Nejvýznamnější sloučeninou tvrdých pryskyřic je xanthohumol, který je v pryskyřicích doprovázen přinejmenším třinácti příbuznými chalkony, přítomnými v desetkrát až stokrát menších koncentracích než xanthohumol^{23,21}. Xanthohumol je jednoduchý prenylovaný chalkon (struktura je na obrázku 2.1) a vzhledem ke své struktuře se řadí jak mezi tvrdé pryskyřice, tak mezi prenylflavanoidy³⁵. Obsahuje volnou hydroxylovou skupinu a může tak izomerovat například na isoxanthohumol nebo na jiné flavanony. Vyskytuje se pouze v rostlinách chmele a v sušené rostlině je obsažen z 0,1 – 1 %.



Obr 2.1 Strukturní vzorec xanthohumolu

Xanthohumol je velmi studovanou látkou v mnoha laboratořích po celém světě právě pro široké spektrum pozitivních účinků. Některé studie potvrdily preventivní účinky xanthohumolu proti vzniku mnoha typů nádorových bujení²¹, například rakoviny prsu nebo dělohy, kde xanthohumol díky svým antiestrogenním účinkům efektivně inhibuje vznik hormonu 17beta-estradiolu, který stimuluje buněčný růst a je tak považován za endogenní promotor vzniku tumoru³⁶. Nikolic a kol.³⁷ ve své studii popisuje xanthohumol jako antiproliferační látku proti nádorům tlustého střeva.

Antioxidační účinek xanthohumolu byl prokázán při testování inhibičního efektu na oxidační reakci nízkodenzitního lipoproteinu, LDL. Velké množství tohoto lipoproteinu v lidském organismu může způsobovat aterosklerózu, která v mnoha případech může vést k cévním onemocněním, infarktu myokardu nebo mrtvici³⁸.

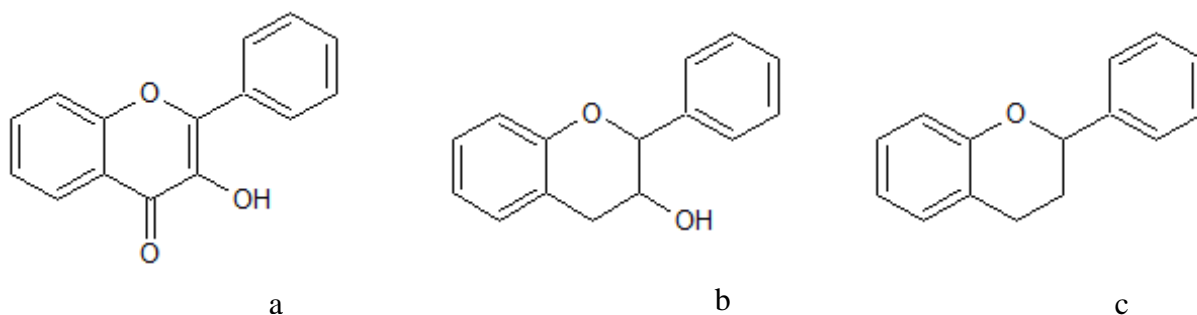
Při léčbě osteoporózy se dnes již běžně využívá preparát z xanthohumolu, který byl patentován v USA v roce 1997^{39,35}. Xanthohumol působí i protizánětlivě a antivirotický³⁸. Antivirotické působení bylo pozorováno proti RNA viru, který způsobuje bovinní virovou diarrhoeu (BVD), infekční onemocnění skotu, nebo proti některým cytomegalovirům, jako například herpes simplex virům (HSV), které u lidí způsobují celoživotní infekce projevující se puchýři na kůži i sliznicích. Další zajímavé terapeutické využití by mohl xanthohumol představovat při léčbě proti infekci virem HIV-1⁴⁰.

2.4.2.4 Polyfenoly

Polyfenolické látky zahrnují velký rozsah sloučenin nacházejících se ve chmelu, které obsahují více než jednu fenolovou hydroxylovou skupinu. Tyto látky lze rozdělit do několika skupin podle jejich struktury. Mezi flavonoly, jejichž struktura je na obrázku 2.2, patří například kvercetin, kemferol nebo rutin. Do skupiny flavan-3-olů, rovněž znázorněných na obrázku 2.2, lze zařadit katechin, epikatechin a taniny, což je souhrnné označení pro dimery, oligomery a polymery flavanolů. Jinými skupinami jsou pak fenolové karboxylové kyseliny, prenylflavonoidy a další²³. Více než 80 % polyfenolů je tvořeno z vyšších molekulárních sloučenin, jako katechin taninové látky nebo taninové kyseliny, a zbylých 20 % je složeno z monomerů, například fenolových karbonylových kyselin, flavonoidů a glykosidů flavonoidů⁴¹.

Mnohým polyfenolickým látkám jsou připisovány zdraví prospěšné účinky. Antioxidační vlastnosti polyfenolických látek pocházejících nejen z chmelu jsou dobře známé. Antioxidační látky mohou zhaset reaktivní radikály kyslíku nebo jejich tvorbu omezovat, a to například chelatací především iontů železa, které katalyzují vznik volných hydroxylových radikálů^{42,43}, a tím znemožňují oxidační destrukci látek. Antioxidanty přijímané v potravě jsou často spojované s prevencí některých onemocnění, kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch nebo nemocí spojenými s procesy stárnutí⁴⁴.

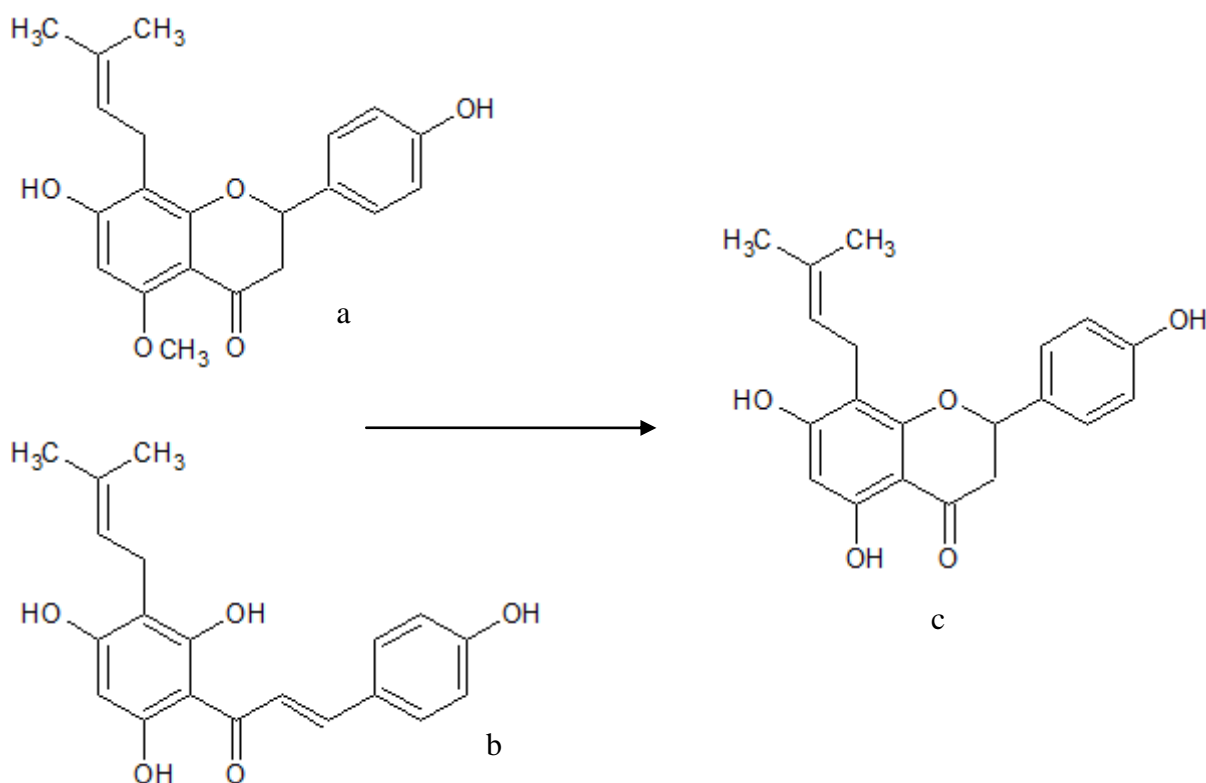
Jednou z nejvýznamnějších skupin chmelových polyfenolů jsou flavonoidy, které strukturálně vychází z flavanu. Jeho struktura je znázorněna na obrázku 2.2. Tato třída látek byla objevena ve 30. letech 20. století a její objevitel tyto látky pojmenoval vitamin P^{45,41}.



Obr 2.2 Základní struktury polyfenolů: flavonol (a), flavan-3-ol (b), flavan (c)

8-prenylnaringenin

Biologicky aktivním prenylovaným flavonoidem je například 8-prenylnaringenin, jehož struktura je na obr 2.3. Ten může vznikat působením bakterií trávicího traktu na isoxanthohumol, izomerní formu chalconu xanthohumolu (viz tvrdé pryskyřice). Další cestou pro vznik 8-prenylnaringeninu, případně 6-prenylnaringeninu, je spontánní transformace desmethylxanthohumolu⁴⁶. Strukturální vzorce isoxanthohumolu a desmethylxanthohumolu jsou také uvedeny na obr 2.3. 8-prenylnaringenin zejména působí jako fytoestrogen. Fytoestrogeny jsou látky rostlinného původu, které jsou strukturálně nebo svým působením podobné ženským hormonům estrogenům a mohou tak být alternativnou k tzv. náhradní hormonální terapii, která může mít značné vedlejší účinky⁴⁷. 8-prenylnaringenin je vhodný při léčbě obtíží v období menopausy nebo jako prevence osteoporózy pro ženy po menopauze. 6-prenylnaringenin vykazuje jen slabé estrogení účinky²¹.

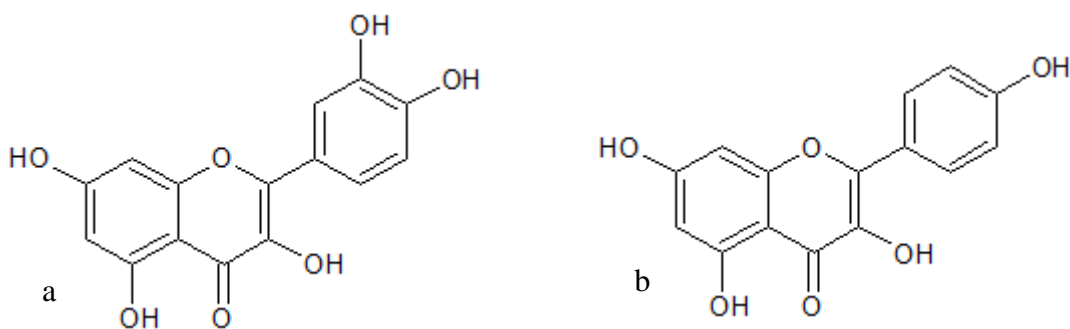


Obr 2.3 Vznik 8-prenylnaringeninu (c) dvěma možnými cestami: bakteriálním působením z isoxanthohumolu (a) nebo transformací desmethylxanthohumolu (b)

Kvercetin a kemferol

Další biologicky aktivními flavonoidy jsou kvercetin a kemferol. Jejich struktura na obrázku 2.4 je odvozená od flavonolu a ve chmelu se oba nachází navázané na různé glykosidy. Kemferol se od kvercetinu liší pouze jednou hydroxylovou skupinou⁴¹.

U obou těchto látek byly nalezeny antialergenní účinky⁴⁸. Kvercetin je popisován jako látka s velmi silným antioxidačním a antikarcinogenním potenciálem. Proto se také kvercetin nachází v mnoha potravinových doplňcích volně prodávaných ve Spojených státech⁴⁹. Kemferol i kvercetin byly studovány jako možné inhibitory aldosa reduktasy, což je enzym, který hraje důležitou roli v rozvoji komplikací spojeným s diabetem mellitus. Kemferol i kvercetin měly nejslibější inhibiční výsledky ze všech testovaných rostlinných látek a mohly by tak nahradit syntetické inhibitory, které mají řadu vedlejších účinků⁵⁰.

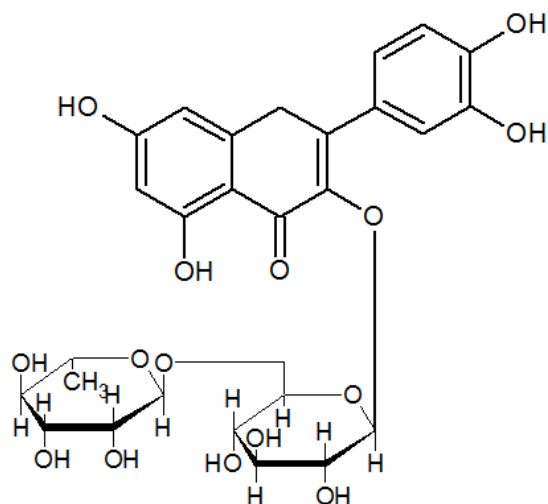


Obr 2.4 Strukturní vzorce kvercetinu (a) a kemferolu (b)

Rutin

Rutin je glykosid odvozený od kvercetinu, obsahuje 2 sacharidové jednotky rutinosy. Struktura této látky je na obr 2.5. U rutinu, kvercetinu a hesperidinu bylo testováno protizánětlivé působení na akutní i chronické záněty, všechny tyto látky byly efektivní, rutin projevoval největší aktivitu proti chronickým zánětům⁵¹. Rutin hraje také ochrannou roli proti vzniku karcinomu jater. Tento druh rakovinového bujení vyvolávají

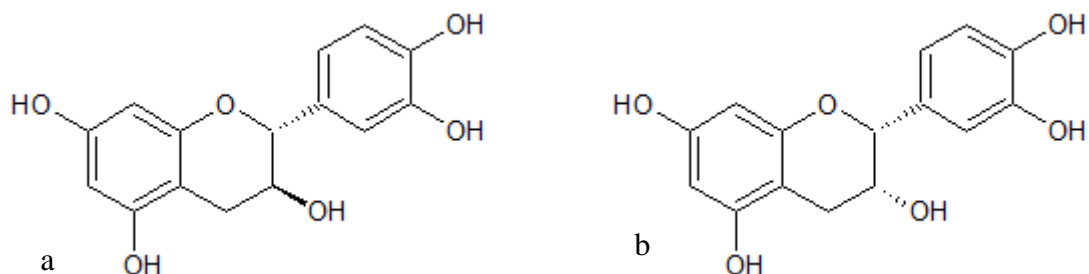
chemické karcinogeny, které tak poškozují DNA⁵². Už ve 40. letech 20 století byla sledována schopnost rutinu posilovat pružnost krevních kapilár^{53,54}.



Obr 2.5 Struktura rutinu

Katechin a epikatechin

Podskupinou flavonoidů jsou katechiny, látky odvozené od flavan-3-olu. Biologicky aktivními zástupci této skupiny jsou katechin a epikatechin, stereoizomer katechinu. Katechin zaujímá trans- konfiguraci, epikatechin naopak cis-, jak je vidět na obrázku 2.6. Jednotlivé molekuly spolu mohou vytvářet oligomerní a polymerní struktury⁴³, například prokyanidiny či proanthokyanidiny neboli kondenzované třísloviny (oligomery katechinu a epikatechinu). Monomery, oligomery i polymery se mohou vyskytovat ve chmelu ve formě glykosidů.



Obr 2.6 Struktura katechinu (a) a epikatechinu (b)

Proanthokyanidiny vykazují toxické účinky proti houbám a plísním, kvasinkám a bakteriím⁴³. Katechin a epikatechin přijímané v potravě jsou spojované s pozitivním působením na lidský organismus⁵⁵. U prokyanidinů byly prokázány ochranné účinky především na kardiovaskulární systém a to snížením pravděpodobnosti vzniku poškození srdce vlivem ischemie, nedokrvení srdce u krys nebo významným snížením aterosklerózy u králíků⁵⁶. Oligomery katechinu i epikatechinu pak mohou působit prevenčně proti rakovině prostaty u mužů a oligomery epikatechinu jsou účinné v potlačování vzniku biofilmu a kyselého prostředí, které vytváří grampozitivní bakterie *Streptococcus mutans* v ústní dutině⁵⁵.

2.5 Testování antimikrobiální aktivity

Pro testování antimikrobiální aktivity se používá mnoho metod. Tyto metody lze rozdělit do dvou skupin, kvalitativní difúzní a kvantitativní diluční metody.

2.5.1 Kvantitativní metody

Diluční metody se používají ke kvantitativnímu stanovení antimikrobiálních látek a to jako minimální inhibiční koncentraci MIC, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu za 24 hodin⁵⁷, nebo jako minimální baktericidní koncentraci MBC, tedy nejnižší koncentraci aktivní látky, která usmrtí alespoň 99,9 % mikroorganismů. V praxi se rutinně využívají pro kvantitativní stanovení bujonová nebo agarová diluční metoda a mikrodiluční testy.

Bujonová diluční metoda

Při testování mikrobiálních vlastností látek pomocí bujonové diluční metody je aktivní látka přidána do zkumavky s Mueller-Hintonovým bujónem. Ředící řadou se připraví sada roztoků a požadovaných koncentrací. Následně je do každé zkumavky přidána suspenze s testovaným mikroorganismem. Jirovetz a kol. (2006)²⁵ použili

k testování antimikrobiálních vlastností některých chmelových silic i agarovou diluční metodu. Testy prokázaly antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* a gramnegativním kmenům *Escherichia coli* a *Salmonella* sp.

Mikrodiluční metody

Mikrodiluční metoda jsou založeny na stejném principu jako metoda bujonová. Testování není prováděno ve zkumavkách, ale v jamkách na mikrodestičkách o objemu asi 0,1 ml. Po inkubaci se vyhodnocuje viditelný růst mikroorganismu nejčastěji v podobě zákalu. Carson a Riley (1995)⁵⁸ použili bujonovou mikrodiluční metodu pro určení MIC a MBC látek z rostlinných silic proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*.

2.5.2 Kvalitativní metody

Kvalitativní metody jsou vhodné pro ověření nebo určení antimikrobiálních vlastností látek či pro určení citlivosti bakterií k nejrůznějším látkám. Tyto metody jsou založené na difuzi a řadí se sem disková metoda, agarová metoda a E-testy.

Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda je založena na umístění papírového diskového filtru obsahující antimikrobiální látku na hladinu média s naočkovaným mikroorganismem. Po inkubaci se vlivem koncentračního gradientu aktivní látky vytvoří inhibiční zóna okolo disku a antimikrobiální aktivita je vyhodnocena jako poloměr inhibiční zóny nebo se fotografie Petriho misky zpracuje pomocí příslušného softwaru. Tuto metodu použili Proestos a kol. (2005)⁵⁹ pro testování antimikrobiálních vlastností některých rostlinných polyfenolů jako katechin a kvercetin. Rostlinné extrakty inhibovaly růst především bakterie *Bacillus cereus*.

Agarová difúzní metoda

V případě agarové difúzní metody je vzorek aplikován do otvoru vytvořeného například korkovrtem do agarové plotny. Po naočkování a inkubaci se vytvořená inhibiční zóna vzniklá difúzí aktivní látky do agaru vyhodnotí stejně jako v předchozím případě pomocí příslušného softwaru nebo změřením poloměru.

Epsilometer test

U E-testů neboli Epsilometer testů se používá diagnostický proužek obsahující rostoucí koncentraci aktivní látky, proužek je opatřen stupnicí. Proužek se položí na hladinu růstového media s naočkovaným mikroorganismem. Po inkubaci se vytvoří inhibiční zóna, která protíná testovací proužek právě v místě, které udává hodnotu MIC⁶⁰.

2.6 Stanovení aktivních látek ve chmelu pomocí hmotnostní spektrometrie

K analýze výše uvedených látek kromě silic se běžně využívá kapalinové chromatografie. Silice jsou vzhledem ke své těkavosti stanovovány pomocí chromatografie plynové. Důležitou součástí analýzy látky je příprava vzorku. Chmel je velmi komplexní matrice, a proto každá skupina látek vyžaduje specifický způsob přípravy. Tou obvykle bývá extrakce s použitím různých rozpouštědel. Při extrakci chmelových pryskyřic se využívá jejich dobré rozpustnosti v methanolu nebo diethyletheru, alfa- a beta-hořké kyseliny se navíc dobře rozpouštějí v hexanu²³. Pro těkavé silice se používá extrakce do acetonu.

Callemien a kol. (2005)⁶¹ extrahovali chmelový polyfenol resveratrol pomocí toluenu a cyklohexanu. Analýzu prováděli pomocí HPLC-MS/MS. Ke stanovení metabolického profilu v běžných odrůdách chmele použili Fagar a kol. (2012)⁶², mimo jiné kapalinovou chromatografii ve spojení hmotnostní spektrometrií s různými analyzátory, jako iontovou pastí nebo iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací.

Extrakty chmelových pryskyřic připravili za použití ethanolu. Zhang a kol. (2004)⁶³ použili pro separaci a přímou charakterizaci hořkých kyseliny RP-HPLC-MS s chemickou ionizací za atmosferického tlaku. Využili ultrazvukovou extrakci směsi hořkých kyselin ze surového chmelu pomocí etanolu. Jurková a kol. (2013)⁴⁶ při stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů použili pro extrakci chmelových preparátů 70% aceton ve vodě s následnou filtrací přes filtrační papír. Dušek a kol. (2014)⁶⁴ stanovovali beta-hořké kyseliny a jejich oxidativní produkty v pivu pomocí LC-MS/MS. K extrakci hořkých kyselin použili metodu QuEChERS.

3 EXPERIMENTNÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- Xanthohumol C₂₁H₂₂O₅ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Isoxanthohumol C₂₁H₂₂O₅ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 8-prenylnaringenin C₂₀H₂₀O₅ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 6-prenylnaringenin C₂₀H₂₀O₅ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Katechin C₁₅H₁₄O₆ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Epikatechin C₁₅H₁₄O₆ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rutin C₂₇H₃₀O₁₆ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kvercetin C₁₅H₁₀O₇ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kemferol C₁₅H₁₀O₆ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Probenecid C₁₃H₁₉NO₄S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Acetonitril CH₃CN, LC-MS ≥ 99,9% (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Aceton CH₃COCH₃, ≥ 99,98% (Lachner, Neratovice, Česká Republika)
- Methanol CH₃OH, LC-MS, (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chlorid sodný NaCl (Lachner, Neratovice, Česká Republika)
- Bezvodý síran hořečnatý MgSO₄, > 98% (Pentra, Praha, Česká Republika)
- Mravenčí kyselina HCOOH, LC-MS, 98% (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo).

3.2 Vzorky

- Chmel otáčivý – odrůda Kazbek, sklizeň 2014, Žatec, sušený
- Bakteriální kmen *Streptococcus aureus* CCM 3953 (0,5 McFarlandovy stupnice)
- Růstové medium Mueller-Hiltonovův agar (Bio-Rad, Francie).

3.3 Přístroje

Kapalinový chromatograf:

- Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 UPLC (Dionex Softron GmbH, Německo)
- Kolonový termostat TCC 3000RS (Thermo Fisher Scientific Inc, Walham, USA)
- Automatický dávkovač WPS-3000TRS (Thermo Fisher Scientific Inc, Walham, USA)
- Kolona RP C18 Atlantis T3, 2,1 x 100 mm, 3 μ m (Waters, Milford, MA, USA)
- Předkolona C18 SecurityGuard ULTRA (Phenomenex, Aschaffenburg, Německo).

Hmotnostní spektrometr:

- Hybridní hmotnostní detektor Quadrupole-Orbitrap QExactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Iontový zdroj HESI II (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Softwarové programy:

- Xcalibur 2.2 SP1 Thermo
- SIEVE 2.2 Thermo
- ExactFinder 2.5 Thermo.

Ostatní:

- Milli-Q systém pro čištění vody, odpor >180 Ω (Merck-Millipore, Darmstadt, Německo)
- Rotační odparka Hei-Vap Precision (Heidolph, Německo)
- Odstředivka (PragoLab, Česká Republika)
- Filtrační papír 1288 (Munkte, Švédsko)

3.4 Postup

3.4.1 Příprava standardních roztoků

Nejprve byly připraveny standardní roztoky xanthohumolu, isoxanthohumolu, 8-prenylnaringenin, 6-prenylnaringenin, kvercetin, katechin, epikatechin, kemferol a rutin o koncentraci 1 mg/ml přesným navážením 10 mg jednotlivých polyfenolů do 10ml odměrné baňky a doplněním baňky destilovanou vodou po rysku. Poté bylo odpipetováno po 1 ml ze standardních roztoků jednotlivých látek do jedné 100ml odměrné baňky a ředící řadou byl připraven výsledný směsný standardní roztok obsahující 1 mg/l polyfenolických látek. Roztok interního standardu byl připraven přesným navážením 10 mg probenecidu do 10ml odměrné baňky, která byla následně doplněna destilovanou vodou. Roztok byl naředěn na konečnou koncentraci interního standardu 1 mg/l. Všechny standardní roztoky byly uchovávány při teplotě asi -18 °C.

3.4.2 Příprava kalibračních roztoků

Do 2ml skleněných viálek bylo napipetováno potřebné množství směsného standardního roztoku polyfenolů o koncentraci 1 mg/ml. Ke standardnímu roztoku byl připipetován potřebný objem methanolu na celkový objem 1 ml. Obsah viálky byl důkladně promíchán pomocí vortexu. Koncentrace a pipetované objemy standardních roztoků a methanolu pro jednotlivé kalibrační roztoky jsou uvedeny v tabulce 3.1.

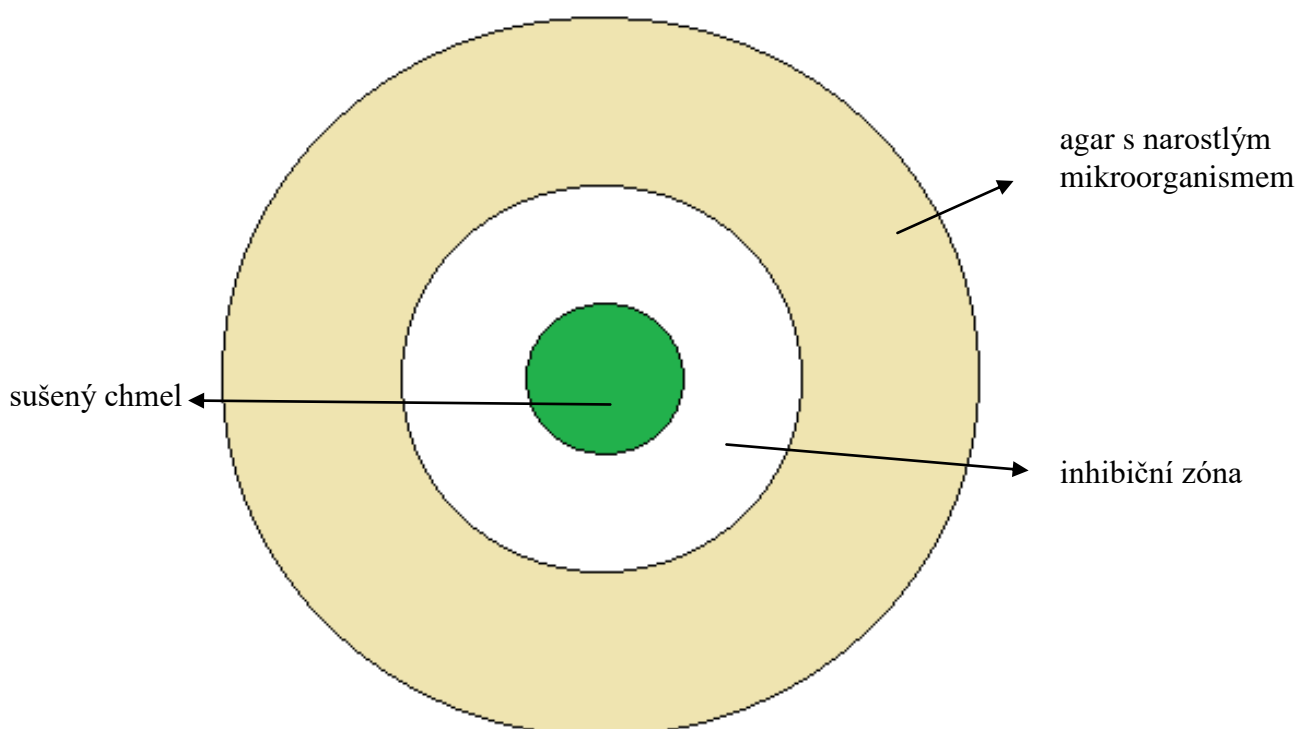
Tabulka 3.1 Příprava kalibračních roztoků

Číslo vzorku	Koncentrace [ng/l]	Objem stand. směsi [μl]	Objem CH ₃ OH [μl]
1	10	10	990
2	20	20	980
3	50	50	950
4	100	100	900
5	200	200	800
6	500	500	500

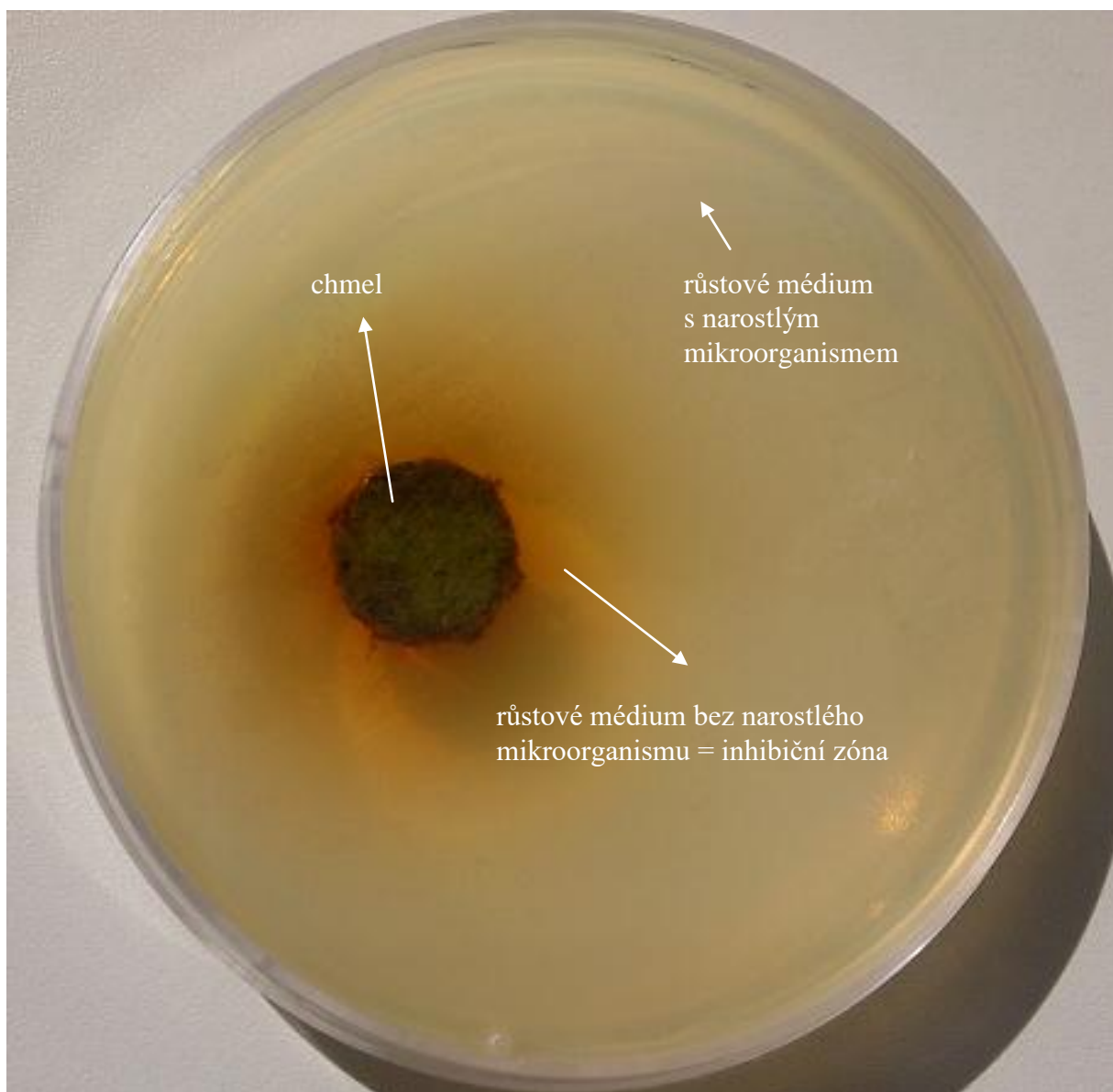
3.4.3 Předseparace antimikrobiálních látek pomocí agarové difúzní metody

Do vrstvy Mueller-Hiltonova agaru byl vyříznut kruhový otvor o průměru asi 1 cm. Otvor byl naplněn mletými sušenými chmelovými hlávkami. Následně byla celá hladina Petriho misky s chmelem zalita tenkou vrstvou agaru. Na celé růstové medium byla naočkovaná suspenze bakteriálního kmene *Streptococcus aureus* CCM 3953 (0,5 McFarlandovy stupnice). Po 24 hodinách inkubace při 37 °C se kolem otvoru s chmelem vytvořila inhibiční zóna, kde mikroorganismus nenarostl. Tato část přípravy vzorku byla prováděna na Mikrobiologickém oddělení Thomayerovy nemocnice.

Růstové medium s inhibiční zónou bylo vyříznuto a nakrájeno na menší kousky o velikosti asi 0,5 na 1 cm. Poté byly kousky ve zkumavce zmrazeny a následně lyofilizovány. Na obrázku 3.1 je ideální schematický nákres a reálná fotografie plotny po inkubaci je na obrázku 3.2.



Obr 3.1 Schematický nákres plotny po naočkování mikroorganismem a inkubaci



Obr 3.2 Fotografie Petriho misky po aplikaci chmelu, naočkování a inkubaci

3.4.4 Extrakce z pevného agarového media

Do 50ml plastové centrifugační kyvety byly naváženy 2,00 g růstového média s inhibiční zónou. Ke vzorku media bylo přidáno 8 ml vody. Obsah centrifugační kyvety byl zcela rozpuštěn v mikrovlnné troubě nastavené na 700 W po dobu 15-20 sekund. K lehce zchlazenému roztoku bylo přidáno 25 μ l interního standardu probenecidu a obsah byl řádně promíchán pomocí vortexu. Následně bylo přidáno 24 ml acetonu. Kyveta byla umístěna na třepačku do vodorovné polohy a obsah byl třepán při maximálním výkonu po dobu 30 minut. Poté byl roztok přefiltrován přes filtrační papír

do 50ml srdcové odpařovací baňky, a následně byl odpařen podíl acetonu při 40 °C a 0,032 MPa. Roztok byl odpařen na zbylý objem asi 10 ml po zhruba 10 minutách. Zredukovaný roztok byl převeden do čisté 50ml kyvety s 10 ml acetonitrilu. Kapalná směs byla 1 minutu míchána pomocí vortexu, následně byla přidána předem navážená směs 4 g bezvodého MgSO₄ a 1 g NaCl. Kyveta byla pečlivě uzavřena a obsah byl intenzivně míchán v ruce opět po dobu 1 minuty. Poté byl vzorek odstředován 7 minut při 4500 min⁻¹. Z horní acetonitrilové vrstvy bylo odpipetováno 6 ml do 15ml plastové centrifugací kyvety obsahující 900 µg bezvodého MgSO₄ a tato směs byla třepána 30 vteřin a opět odstředěna při 4500 min⁻¹ po dobu 7 minut. Následně bylo odpipetováno 5 ml acetonitrilové vrstvy do 25ml srdcové odpařovací baňky a obsah byl odpařován dosucha zhruba 15 minut při 0,016 MPa. Nakonec byl vzorek rozpuštěn v 1 ml methanolu a převeden do vialky. Takto připravené vzorky byly uchovávány při -18 °C.

3.4.5 Postup měření

3.4.5.1 Podmínky měření

Kapalinová chromatografie:

Mobilní fáze A: 0,1% mravenčí kyselina ve vodě

Mobilní fáze B: 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu

Tabulka 3.2 Gradientová eluce

Čas analýzy min	Obsah MF A %	Obsah MF B %
0	95	5
1	95	5
13	70	30
24	95	5
30	95	5

průtok MF: 400 µl/min

teplota kolony: 40 °C

Hmotnostní spektrometrie:

Tabulka 3.3 Nastavení zdroje

Parametr	Hodnota
Sušící plyn (sheath gas)	32 AU
Pomocný plyn (auxiliary gas)	7 AU
Napětí zdroje	2,8 kV
Teplota kapiláry	295 °C
Teplota sušícího plynu	295 °C

Tabulka 3.4 Nastavení hmotnostního spektrometru – experiment 1

Parametr	Hodnota
mód	pozitivní
rozlišení	70 000 FW HM
AGC target	10^6
Max. čas plnění past (Max IT)	250 ms
Rozsah	100-900 Da

Tabulka 3.5 Nastavení – experiment 2: ddMS²

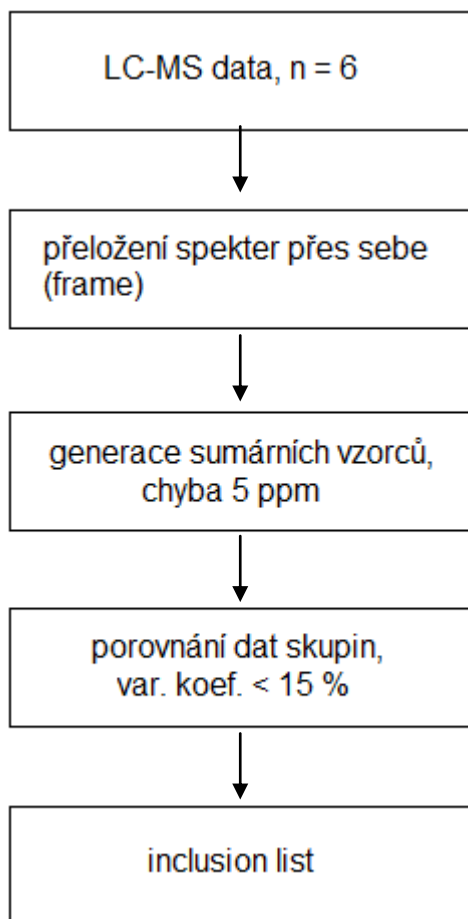
	Parametr	Hodnota
MS	Rozlišení	50 000 FW HM
	AGC target	$3 \cdot 10^6$
	Max IT	250 ms
	Rozsah	100-900 Da
MS/MS	Rozlišení	17 500 FW HM
	AGC target	$5 \cdot 10^4$
	Max. čas plnění pasti (Max IT)	60 ms
	Čas (dynamic excursion)	2 s
	Kolizní energie	25 eV
	Izolační šířka okna	2 amu

Přístroj byl externě kalibrován před každým měřením s použitím roztoku hmotnostních kalibrantů.

3.4.5.2 Zpracování dat

Cílem práce bylo najít látky, které pocházejí pouze z chmele. Softwarový nástroj pro diferenční analýzu naměřených dat, SIEVE 2.2, byl v experimentu č. 1 použit pro selekci látek z necílové MS analýzy. Schematicky je postup experimentu č. 1 je znázorněn na obrázku 3.3.

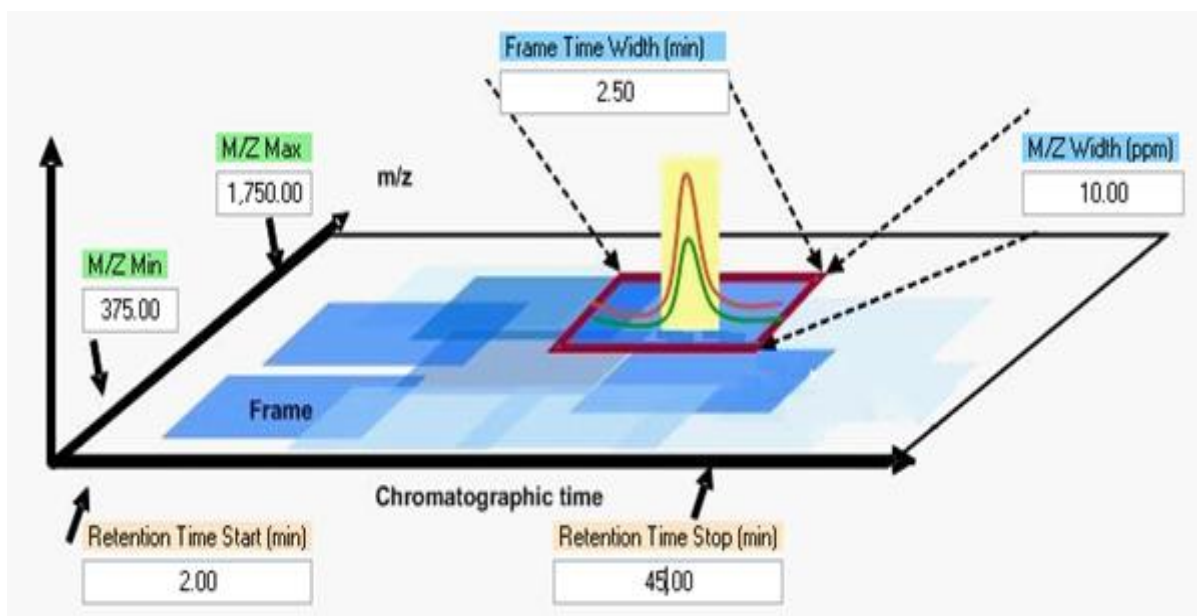
Pro následující analýzu byly připraveny dvě sady vzorků. Kontrolní skupina byla získaná extrakcí růstového media s narostlým mikroorganismem, tedy mimo oblast inhibiční zóny. Skupina vzorků reprezentuje extrakt inhibiční zóny v okolí chmelu. Měření bylo provedeno s rozlišením 70 000 FW HM pro obě skupiny po šesti opakováních. Následně byly pro softwaru SIEVE vloženy základné parametry, které jsou uvedené v tabulce 3.6 a na obrázku 3.4 je modelový obrázek framu. Poté byla spektra v rámci technického replikátu přeložena přes sebe a na základě zaznamenaných dat byly stanoveny důležité parametry seřazeny podle hodnot m/z do skupin (molecular feature). Na základě molekulového klastru byly vybrány pseudomolekulární ionty, pro které byly následně vygenerovány sumární molekulové vzorce s přesností 5 ppm. V dalším kroku byla konzistentnost dat ve skupině šesti opakování zajištěna tím, že byly pro další krok použity komponenty s hodnotou CV < 15 %. V závěrečném kroku byla porovnána data mezi kontrolní skupinou a skupinou vzorků, zvolený poměr kontroly ku vzorku byl od 0 do 2 (Ratio = 0-2), což znamená, že odezva látky v kontrolní skupině (růstovém médiu) byla maximálně 50% v porovnání s odezvou stejné látky ve skupině vzorkové (inhibiční zóna). Výsledkem toho porovnávání byl seznam látek (inclusion list) použitý pro experiment 2.



Obrázek 3.3 Schematické znázornění postupu zpracování dat v experimentu 1

Tabulka 3.6 Parametry pro software SIEVE

Parametr	Hodnota
Rozsah retenčních časů	2,5 min
Rozsah m/z	10 amu
Intenzita píku	500 000



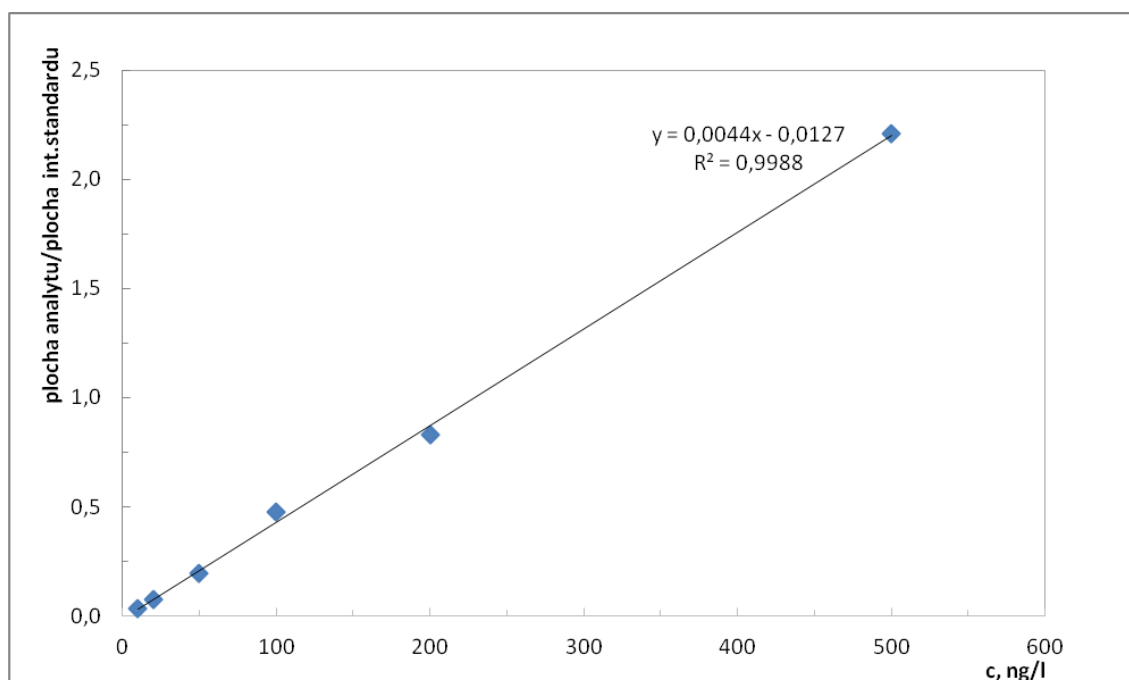
3.4 Modelový obrázek znázorňující jeden „frame“ (červený rámeček)

Cílem experimentu 2 bylo získat data pro strukturní elucidaci. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu „full scan“ s rozlišením 50 000 FWHM ve spojení se závislým sběrem MS/MS spekter na základě „inclusion listu“ vytvořeném v předešlém experimentu. MS/MS spektra byla získána fragmentací tří nejintenzivnějších iontů (Top 3) vybraných z „full-MS“ spektra. Tato získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru ExactFinder 2.5 proti databázi 450 polyfenolických látek s identifikací založenou na přesné hmotě, shodou s izotopickým profilem a v případě látek pro které byl k dispozici standard, také na základě shody retenčních časů.

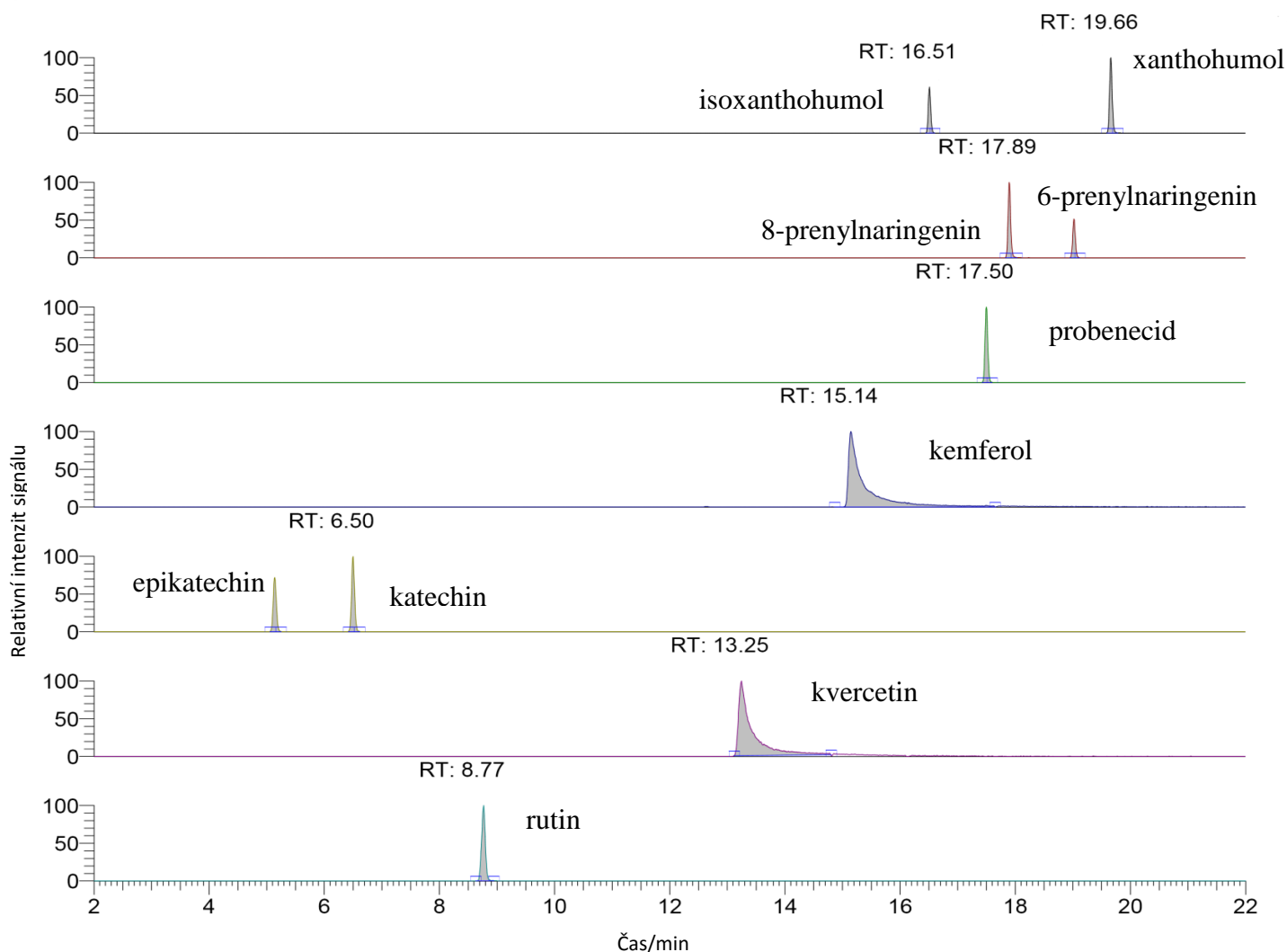
4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace extrakčního procesu polyfenolických látek z pevného agarového média

Během této práce byla vyvinuta a optimalizována metoda extrakce polyfenolických látek z pevného média. V rámci optimalizace bylo použito několik extrakčních postupů včetně různých rozpouštědel. Při stanovení účinnosti extrakce byl před samotnou extrakcí k čistému Mueller-Hintonovu agaru přidán standardní roztok obsahující modelovou směs polyfenolických látek – xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylnaringenin, 8-prenyl- naringenin, katechin, epikatechinu, kvercetin, kemferolu a rutin. Konečná koncentrace modelového vzorku byla 50 ng/l standardních látek. Účinnost extrakce byla stanovována na základě výtěžností jednotlivých látek ze směsného standardu. Proto byly změřeny připravené kalibrační roztoky a následně byla sestrojena kalibrační křivka. Kalibrační křivka katechinu je znázorněna na obrázku 4.1. Na obrázku 4.2 je chromatografický záznam jednotlivých standardů ze směsi.



Obr 4.1 Kalibrační křivka katechinu



Obr 4.2 Chromatografický záznam jednotlivých látek se směšného standardu o koncentraci 50 ng/l.

Prvním testovaným procesem byla extrakce pomocí butylacetátu. Extrakce byla prováděná ve dvou krocích vždy po dobu 30 minut s 20 ml butylacetátu. Výsledný extrakt byl následně odpařen do sucha. Výtěžnost většiny spikovaných látek byla okolo 60 %.

Dalším zvoleným postupem byla metoda QuEChERS. 10 ml vzorku bylo extrahováno 10 ml acetonitrilu, poté byly látky vysoleny pomocí směsi síranu hořečnatého a chloridu sodného. Výtěžnost méně polárních látek jako je 6-

preynlaringenin a 8-preynlaringenin nebo xanthohumol byla téměř 100 %, ovšem výtěžnost látek s charakterem více polárním, například rutin nebo kvercetin, byla 20-30 %. Tato metoda je tedy vhodná pro látky méně polární.

Vzhledem k takto nízké výtěžnosti polárnějších látek byla k acetonitrilu v rámci postupu QuEChERS přidána 1% octová kyselina. Po analýze modelových vzorků byla výtěžnost rutinu více než 50 % a u kvercetinu to bylo 108 %. Katechin a epikatechin však nebyly ve vzorku identifikované vůbec. Výtěžnosti méně polárních standardů byly prakticky stejné jako při použití téže metody s neokyseleným rozpouštědlem.

Třetí testovanou metodou byla jednostupňová 30min extrakce 70% acetonem. Výtěžnosti preynlaringeninů byly 80 % a 95 %. Jiné více polární standardní látky jako je katechin nebo kvercetin nebyly identifikované vůbec. Avšak výtěžnost rutinu byla také kolem 80 %, stejně jako u standardů méně polárních.

Na základě výsledků z jednotlivých extrakčních experimentů byl navržen nový postup, který zahrnoval předextrakční proces pomocí acetonu s vodou v poměru 70/30 (v/v) a následnou extrakci podle principů QuEChERS. Tímto postupem byla nejvyšší výtěžnost získána z isoxanthohumolu, dále pak z kvercetinu, 8-preynlaringeninu, 6-preynlaringeninu a katechinu. Hodnoty výtěžností pro jednotlivé standardní látky ze směsného roztoku přidávaného k agaru jsou uvedené v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Hodnoty výtěžností po kombinované extrakci acetonem a QuEChERS

Standardní látka	Výtěžnost [%]
Xanthohumol	95
Isoxanthohumol	133
6-preynlaringenin	104
8-preynlaringenin	112
Kemferol	134
Kvercetin	116
Epikatechin	68
Katechin	90
Rutin	49

Po samotné extrakci následovalo vysušení vzorku do sucha. Byly vyzkoušeny dva postupy - odpařování ve vakuové odparce a vysušení/vyfoukání vzorku plynným dusíkem. Při aplikaci druhého postupu docházelo téměř vždy ke ztrátám analyzovaných látek.

Při konečném rozpouštění odpařeného vzorku bylo testováno několik variant rozpouštědel. Nejprve byla zvolena mobilní fáze, poté byl použit čistý acetonitril a methanol. Při rozpouštění vzorku v mobilní fázi nebo v čistém acetonitrilu došlo při analýze, v porovnání s metanolem, k poklesu odezvy a tedy ke snížení výtěžnosti jednotlivých látek. Tento efekt nastal u všech stanovovaných látek ve směsi. Pro další experimenty byl methanol zvolen jako konečné rozpouštědlo před samotnou analýzou vzorků.

4.2 Analýza dat pomocí softwaru SIEVE

Jako vzorek byla označována inhibiční zóna v okolí chmele aplikovaného do agaru. Růstové médium pod narostlým mikroorganismem bylo označované jako kontrola. Vzorek i kontrola byly nakrájené na kousky, extrahované pomocí kombinovaného extrakčního postupu a analyzované metodou kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Programem SIEVE byly identifikované látky přítomné pouze nebo především ve vzorku, tedy v inhibiční zóně. Proto byly framy porovnány pomocí rozlišovacích analýz. Poměr mezi vzorkem a kontrolou byly vyjádřené na základě intenzity signálu framu se stejným poměrem hodnot m/z .

Následně byla vybrána data do pracovních souborů. Do souborů kontrol byly vybrané výsledky měření po 3 opakováních a do souborů vzorků byla vložena data z měření vzorků po 6 opakováních, čtvrté opakování bylo použito jako referentní při normalizování retenčních časů ve skupině opakováních.

V první fázi zpracování dat bylo více než tři tisíce framů (3041) seskupeno do necelých dvou tisíc (1939) různých komponent (molecular feature). Celkem 1423 látek bylo následně vyřazeno/odfiltrováno na základě variačního koeficientu ($CV < 15 \%$) plochy píku ve skupině vzorků i kontrolních souborech. Zbylých více než pět set látek bylo nalezeno v inhibiční zóně v koncentraci dvakrát vyšší ve vzorku než v kontrolní

skupině (poměr mezi vzorkem a kontrolou byl větší než 2). Pro tyto látky bylo vypočítáno elementární složení, které se skládalo pouze z C, H a O. Chemické složení pouze z těchto prvků bylo zvoleno proto, že práce je zaměřená jen na polyfenolické látky. Výsledkem bylo vygenerování 325 možných chemických sumárních vzorců s chybou 5 ppm.

Software SIEVE v pěti krocích redukoval seznam identifikovaných látek a nakonec bylo vybráno něco málo přes tři sta sloučenin, ze kterých byl vytvořen seznam látek (inclusion listu) pro data dependentní MS/MS skeny (závislé skeny).

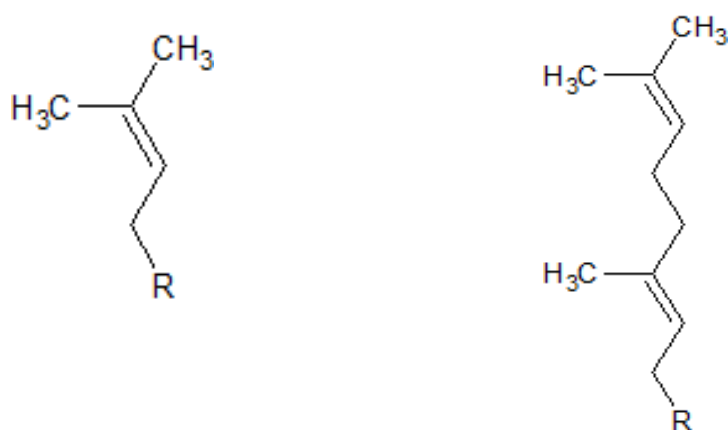
4.3 Identifikace a strukturní elucidace neznámých látek

V prvním kroku byla zvolena identifikace látek z MS dat pomocí programu ExactFinder, proti databázi polyfenolických látek na základě shody přesně hmoty (5 ppm), shody izotopového profilu a případně shody retenčních časů. Látky, jejichž přítomnost byla jednoznačně potvrzena, byl xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylnaringeni, a kolupulon.

Pro strukturní elucidaci byly molekulové vzorce vypočítány z experimentální monoizotopické hmoty každé látky. Potvrzení těchto vzorců bylo provedeno automatizovanou shodou daného složení s izotopickým klastrem stanovovaného signálu. Všechny identifikované píky byly vyhodnoceny na základě několika kritérií, včetně tvaru a intenzity píku, kvality MS/MS spektra a přítomnosti látky v kontrolním vzorku. Píky, které prošly prvním vyhodnocením, byly uspořádané podle retenčních časů. Následně byly označeny všechny píky odpovídající fragmentům vzniklým fragmentací výchozích sloučenin ve iontovém zdroji (píky se stejným retenčním časem). Výsledkem byl seznam 56 látek, které byly chromatograficky dobře rozlišené/rozdělené a měly kvalitní MS/MS spektra.

4.3.1 Strukturní elucidace

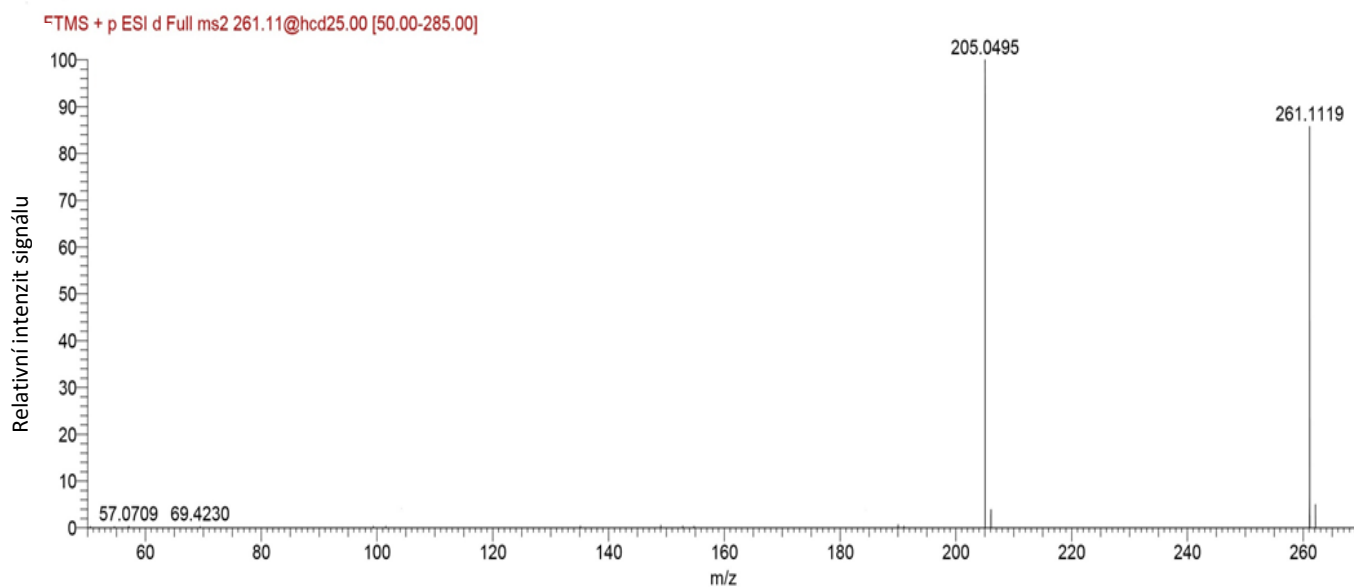
Počáteční krok v elucidaci neznámých látek je hledání charakteristických fragmentačních cest nebo neutrálních ztrát zaznamenaných ve vysokorozlišovacím fragmentačním spektru látek. Tyto látky jsou uvedeny v tabulce 4.2. Iontová hmotnostní spektra produktů ukazují odštěpení prenylové nebo geranylové skupiny a na základě toho většinou vzniká jeden z nejčastěji se vyskytujících fragmentových iontů v těchto hmotnostních spektrech. Struktury obou skupin jsou na obrázku 4.3. Tyto nejvíce informativní fragmentové ionty odpovídají ztrátě 56 Da - C₄H₈ a 124 Da - C₉H₁₅.



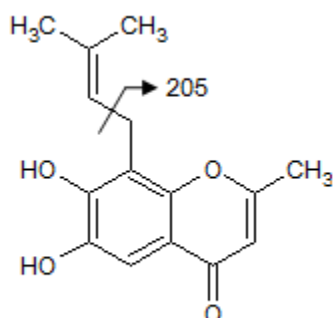
Obr 4.3 Prenylová funkční skupina (a); geranylová funkční skupina (b)

Obrázek 4.4 zobrazuje fragmentační spektrum látek 10, jež ztratila prenylovou skupinu. Sloučenina 10 eluuje v retenčním čase 15,7 minut, produkuje protonovanou molekulu s hodnotou m/z rovné 261,1124 a tato od b idá elementárnímu složení C₁₅H₁₇O₄ (1,15 ppm). Produktové iontové hmotnostní spektrum této látky ukazuje, že štěpení prenylové funkční skupiny probíhá na uhlíku vedle dvojné vazby, což dokazuje často se vyskytující iont o hodnotě m/z 205,0496 a sumárním vzorcí C₁₁H₉O₄ (-0,7 ppm). Vzhledem k nedostatku či nepřítomnosti jiných takto početných fragmentů, tento fragment vznikl vytvořením vysoce stabilní aromatické molekuly s protonovanou methylenovou skupinou jako štěpného artefaktu po odtržení prenylové skupiny. Na

základě této úvahy bylo odvozeno elementární složení jaderné části molekuly jako $C_{10}H_8O_4$ a tato molekula byla předběžně identifikovaná jako 1,4-benzopyron (chromon) s jednou methylovou a dvěma hydroxylovými funkčními skupinami, které jsou připojené k základní kostře. Pravděpodobný proces štěpení je navržen na obrázku 4.5.

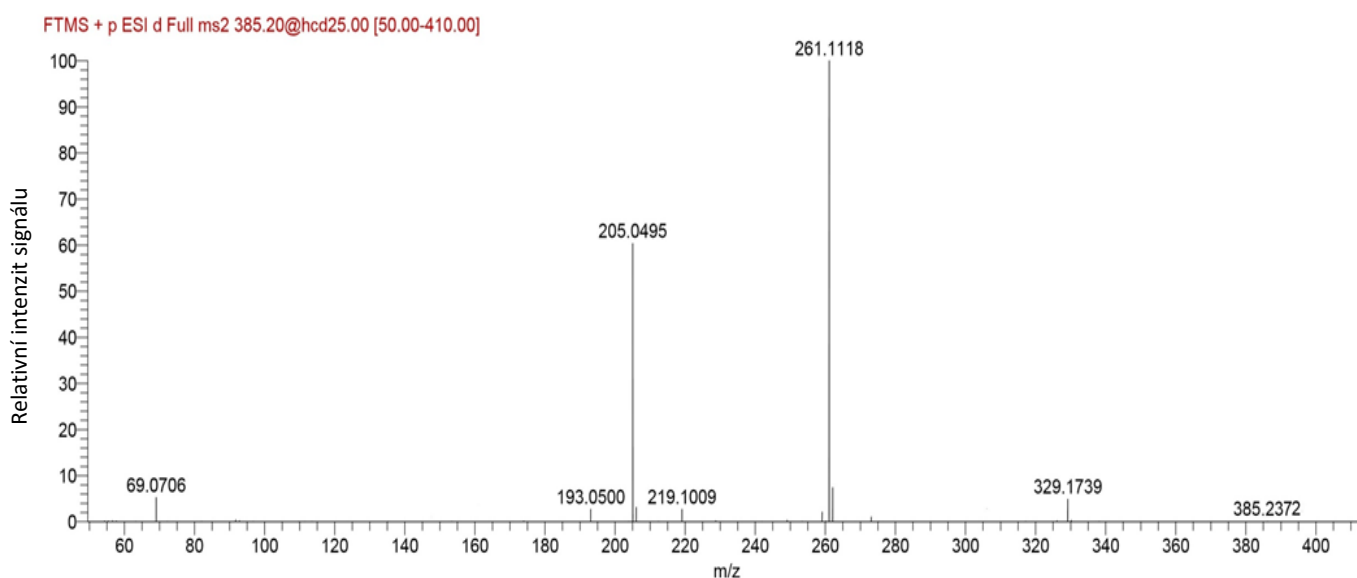


Obr 4.4 MS/MS fragmentační spektrum látky 10 ($[M+H]^+ = 261,11$).

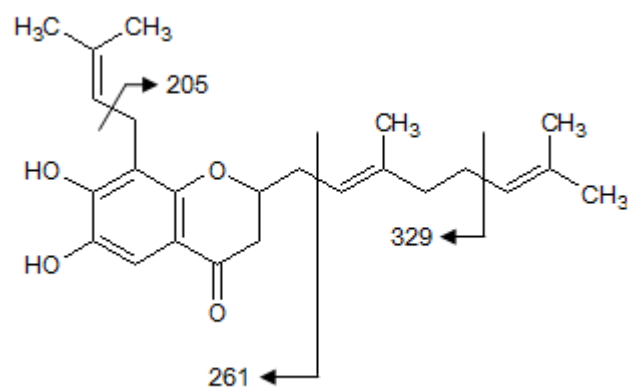


Obr 4.5 Znáznornění štěpení prenylové skupiny v molekule látky 10 (viz tabulka 4.2)

Další příklad, jenž je na obrázku 4.6, demonstruje ztrátu prenylové a geranylové funkční skupiny na sloučenině 41. Retenční čas eluce této látky byl 19,6 min. Přesným měřením hmoty bylo zjištěno, že fragmentací této sloučeniny vzniká protonovaná molekula s poměrem hodnot m/z rovným 385,2372, která odpovídá zastoupení uhlíku, vodíku a kyslíku v poměru 24:33:4 (-0,26 ppm). Hmotnostní spektrum protonované molekuly, produktu sloučeniny 41, obsahuje dva dominantní ionty, jeden o poměru m/z 261,1121 a elementární složením $C_{15}H_{17}O_4$ (2 ppm) a druhý s hodnotou m/z rovnou 205,0495 a zastoupením prvků $C_{11}H_6O_4$ (2 ppm). Tyto produktové ionty představují ztrátu prenylu s rozdílem hmoty 56 Da a ztrátu geranylu, pro kterou je charakteristický rozdíl hmot 124 Da. Dále toto spektrum obsahuje iont, který není zastoupen v takové míře, s poměrem hodnot m/z 329,1738 a o elementárním složení $C_{20}H_{25}O_4$ (2 ppm). Tento iont pochází s největší pravděpodobností ze štěpení geranylové skupiny. Na obrázku 4.7 je navržené fragmentační schéma pro sloučeninu 41. Tato sloučenina byla předběžně identifikovaná jako dihydroxy-2,5-dihydro-4H-chromen-4-on, která je substituovaná jednou prenylovou a jednou geranylovou funkční skupinou. Tato charakteristická fragmentační struktura (pattern) zahrnuje předběžně navržený sumární vzorec základní strukturní kostry, tedy jádro molekuly bez methylenového artefaktu po odštěpení prenylové a geranylové funkčních skupiny, které vznikly fragmentací z několika sloučenin a ty jsou také uvedené v tabulce 4.2.



Obr 4.6 MS/MS fragmentační spektrum látky 41, $([M+H]^+ = 385,23 \text{ Da})$



Obr 4.7 Znázornění štěpení prenylové a geranylové skupiny v molekule látky **41** (viz tabulka 4.2)

Tabulka 4.2 Charakterizace látek ze chmele s potenciálními antimikrobiálními účinky

č.	Retenční čas (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Přesnost hmoty (ppm)	Sumární vzorec	Fragmentační ionty (m/z) odpovídající štěpení prenylové (Pr) nebo geranylové (Gr) funkční skupině	Fragmentační ionty (m/z), vzorec, přesnost hmoty (ppm); zastoupení prvků odpovídající struktuře jádra	Identifikace
1	17.5	209.0448	1.8	C ₁₀ H ₈ O ₅			
2	21.0	211.0601	-0.2	C ₁₀ H ₁₀ O ₅			
3	16.5	223.1332	1.3	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	Pr (223.1/167.1)	167.0703 C ₉ H ₁₀ O ₃ (0.14 ppm); C ₈ H ₉ O ₃	
4	15.7	231.1745	1.0	C ₁₆ H ₂₂ O			
5	17.5	237.1488	1.3	C ₁₄ H ₂₀ O ₃	Pr (237.1/181.1)	181.0859 C ₉ H ₁₃ O ₃ (0.16 ppm); C ₈ H ₁₂ O ₃	
6	16.4	249.1124	1.2	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	Pr (249.1/193.0)	193.0496 C ₁₀ H ₉ O ₄ (0.01 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
7	15.5	249.1125	1.6	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	Pr (249.1/193.0)	193.0495 C ₁₀ H ₉ O ₄ (-0.19 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
8	14.8	249.1123	0.8	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	Pr (249.1/193.0)	193.0495 C ₁₀ H ₉ O ₄ (-0.19 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
9	22.4	249.1119	-0.7	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	Pr (249.1/193.0)	193.0497 C ₁₀ H ₉ O ₄ (0.68 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
10	15.7	261.1124	1.2	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	Pr (261.1/205.0)	205.0494 C ₁₁ H ₉ O ₄ (0.19 ppm); C ₁₀ H ₈ O ₄	
11	14.4	265.1072	0.4	C ₁₄ H ₁₆ O ₅	Pr (265.1/209.0)		
12	15.7	267.1594	1.1	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	Pr (267.2/211.1)		
13	18.6	277.1436	0.8	C ₁₆ H ₂₀ O ₄	Pr (277.1/221.1)	221.0808 C ₁₂ H ₁₃ O ₄ (0.03 ppm); C ₁₁ H ₁₂ O ₄	
14	19.6	277.2161	-0.3	C ₁₈ H ₂₈ O ₂			
15	18.5	281.2113	0.7	C ₁₇ H ₂₈ O ₃			
16	20.0	289.1434	0.01	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	Pr (289.1/233.1)	233.0809 C ₁₃ H ₁₃ O ₄ (0.22 ppm); C ₁₂ H ₁₂ O ₄	
17	18.7	297.1335	0.7	C ₁₅ H ₂₀ O ₆			
18	17.6	305.1385	0.3	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	Pr (305.1/249.1)	249.0757 C ₁₃ H ₁₃ O ₅ (-0.14 ppm); C ₁₂ H ₁₂ O ₅	
19	15.1	307.1542	0.8	C ₁₇ H ₂₂ O ₅			
20	18.7	307.1543	1.0	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	Pr (307.2/251.1)		
21	19.4	311.1491	0.7	C ₁₆ H ₂₂ O ₆			
22	19.6	317.1747	0	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	Pr (317.2/261.1) Pr (261.1/205.0)	261.1120 C ₁₅ H ₁₇ O ₄ (-0.52 ppm); C ₁₄ H ₁₆ O ₄ 205.0494 C ₁₁ H ₉ O ₄ (-0.32 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
23	15.0	317.1752	1.5	C ₁₉ H ₂₄ O ₄			
24	18.4	319.1544	1.3	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	Pr (319.2/263.1)	263.0912 C ₁₄ H ₁₅ O ₅ (-0.81 ppm); C ₁₃ H ₁₄ O ₅	
25	23.8	333.2057	-0.9	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Pr (333.2/277.1) Pr (277.1/221.1)	277.1435 C ₁₆ H ₂₁ O ₄ (0.38 ppm); C ₁₅ H ₂₀ O ₄ 221.0809 C ₁₂ H ₁₃ O ₄ (0.19 ppm); C ₁₀ H ₁₂ O ₄	
26	21.0	335.1854	0.3	C ₁₉ H ₂₆ O ₅			
27	15.3	337.2011	0.3	C ₁₉ H ₂₈ O ₅			
28	19.0	341.1388	1.2	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	Pr (341.1/285.1)		6-Prenylnaringenin
29	18.4	345.2065	1.3	C ₂₁ H ₂₈ O ₄			
30	21.9	349.2006	-1.3	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	Pr (349.2/293.1) Pr (293.1/225.1)		Kohumulon
31	19.0	351.2168	0.5	C ₂₀ H ₃₀ O ₅			
32	17.3	353.1387	1.0	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	Pr (353.2/297.1)	297.0757 C ₁₇ H ₁₃ O ₅ (-0.16 ppm); C ₁₆ H ₁₂ O ₅	
33	14.8	353.1385	0.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₅			

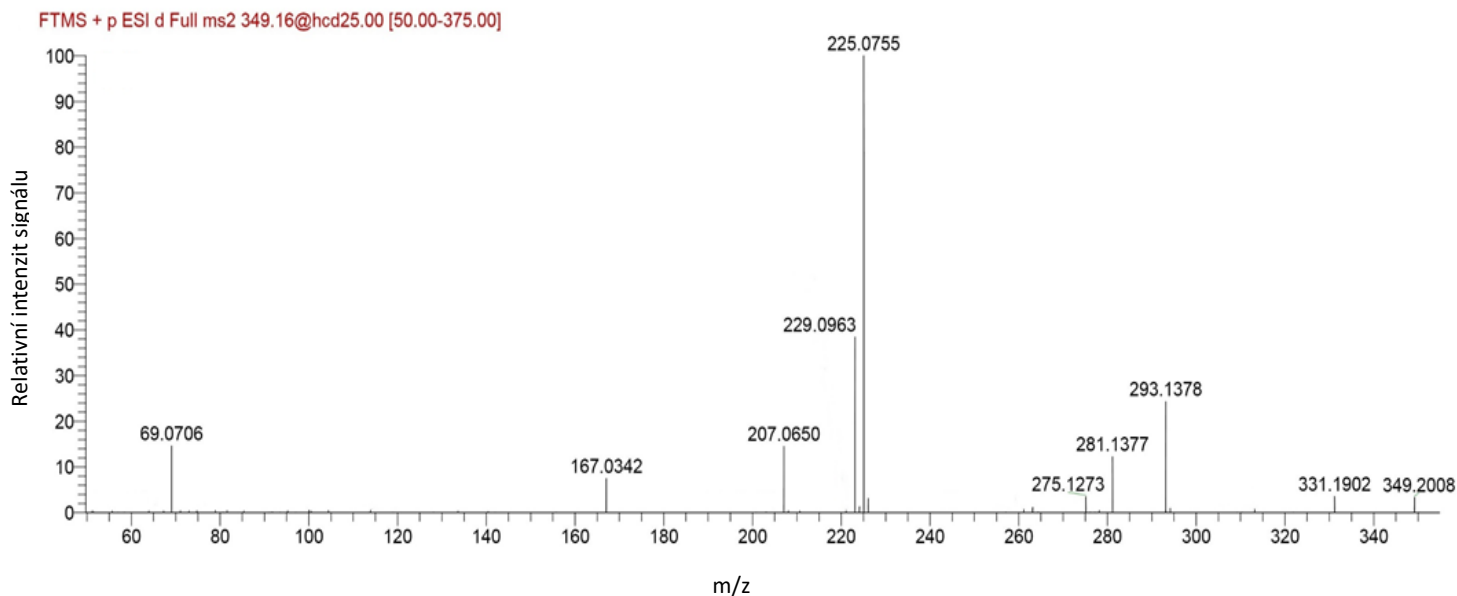
34	18.6	353.1384	0	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	Pr (353.1/297.1)			297.0757 C ₁₇ H ₁₃ O ₅ (0.12 ppm); C ₁₆ H ₁₂ O ₅	
35	16.5	355.1540	0	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	Pr (355.2/299.1)				Isoxanthohumol
36	19.7	355.1541	0.3	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	Pr (355.2/299.1)				Xanthohumol
37	22.4	363.2164	-0.6	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	Pr (363.2/307.2)	Pr (295.2/239.1)			Humulon
38	15.6	371.1494	1.2	C ₂₁ H ₂₂ O ₆					
39	21.4	375.2168	0.5	C ₂₂ H ₃₀ O ₅					
40	19.3	381.1899	-2.3	C ₂₀ H ₂₈ O ₇					
41	19.6	385.2372	-0.7	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	Ger (385.3/261.1)	Pr (261.1/205.1)		261.1122 C ₁₅ H ₁₇ O ₄ (0.26 ppm); C ₁₄ H ₁₆ O ₄ 205.0495 C ₁₁ H ₉ O ₄ (-0.39 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
42	22.3	385.2374	0.3	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	Ger (385.3/261.1)	Pr (261.1/205.1)		261.1121 C ₁₅ H ₁₇ O ₄ (-0.15 ppm); C ₁₄ H ₁₆ O ₄ 205.0497 C ₁₁ H ₉ O ₄ (0.97 ppm); C ₉ H ₈ O ₄	
43	23.2	387.2529	-0.2	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	Ger (387.3/263.1)	Pr (263.1/207.1)		263.1278 C ₁₅ H ₁₉ O ₄ (0.01 ppm); C ₁₄ H ₁₈ O ₄ 207.0652 C ₁₁ H ₁₁ O ₄ (0.06 ppm); C ₉ H ₁₀ O ₄	
44	13.5	397.1856	-0.3	C ₂₀ H ₂₈ O ₈					
45	15.3	397.1860	0.8	C ₂₀ H ₂₈ O ₈					
46	22.8	399.2534	1.1	C ₂₅ H ₃₄ O ₄					
47	23.8	401.2685	-0.3	C ₂₅ H ₃₆ O ₄	Pr (401.3/345.2)	Pr (277.1/221.1)	Pr (259.1/203.1)		Kolupulon
48	22.4	403.2324	-0.5	C ₂₀ H ₃₄ O ₈					
49	17.2	411.2378	0.3	C ₂₂ H ₃₄ O ₇	Pr (411.2/355.2)	Pr (355.2/299.2)			
50	24.2	415.2843	0	C ₂₆ H ₃₈ O ₄	Pr (415.3/359.2)	Pr (291.2/235.1)	Pr (275.2/219.1)		Lupulon
51	21.8	417.2634	-0.6	C ₂₅ H ₃₆ O ₅	Ger (417.3/293.2)			293.1381 C ₁₆ H ₂₁ O ₅ (-0.77 ppm); C ₁₅ H ₂₀ O ₅	
52	22.7	445.2950	0.3	C ₂₇ H ₄₀ O ₅	Pr (303.2/247.1)	Pr (275.2/219.1)			
53	23.3	467.3161	1.1	C ₃₀ H ₄₂ O ₄	Ger (467.3/343.2)				
54	25.3	537.3578	0.7	C ₃₄ H ₄₈ O ₅					
55	17.5	209.0448	1.8	C ₁₀ H ₈ O ₅					
56	21.0	211.0601	-0.1	C ₁₀ H ₁₀ O ₅					

4.3.2 MSⁿ – strukturní elucidace založena na fragmentaci ve zdroji

Během vyhodnocení konečného seznamu hmotnostně chromatografických píků po zpracování dat pomocí softwaru SIEVE se ukázalo, že seznam obsahuje několik skupin píků s rozdílnými hodnotami m/z , ale se stejnými retenčními časy. Kromě toho, MS/MS fragmentační spektra píku s největší hodnotou m/z obsahují také ionty odpovídající „mateřským“ iontům ze stejné skupiny. Tyto hodnoty m/z pravděpodobně náleží fragmentům, které vznikly na rozhraní ionizace elektrosprejem a v iontové optice. Všechny tyto fragmenty byly vyřazeny ze seznamu látek z důvodu možnosti nesprávné identifikace fragmentačních produktů, které vznikly ve zdroji. Šlo tedy o produkty MSⁿ fragmentací, převážně však MS/MS/MS fragmentace. Tento, v tomto případě nechtěný, jev lze však využít pro detailní popis fragmentační cesty, pokud bereme v úvahu dvoukrokovou fragmentaci v pseudo-MS³ experimentu. Tento alternativní přístup k MSⁿ fragmentování je demonstrován fragmentačními cestami látky, jejíž retenční čas je 21,9 min. Z této sloučeniny vzniká protonovaná molekula o poměru m/z rovnému hodnotě 349,2006, která odpovídá elementárnímu složení C₂₀H₂₉O₅ (-1,3 ppm). Tato látka byla identifikována jako kohumulon a fragmentační MS/MS spektrum látky je uvedeno na obrázku 4.8. Hodnoty m/z hlavních píků v MS/MS spektru kohumulonu, včetně jejich odpovídajících sumárních vzorců, jsou uvedeny v tabulce 4.3.

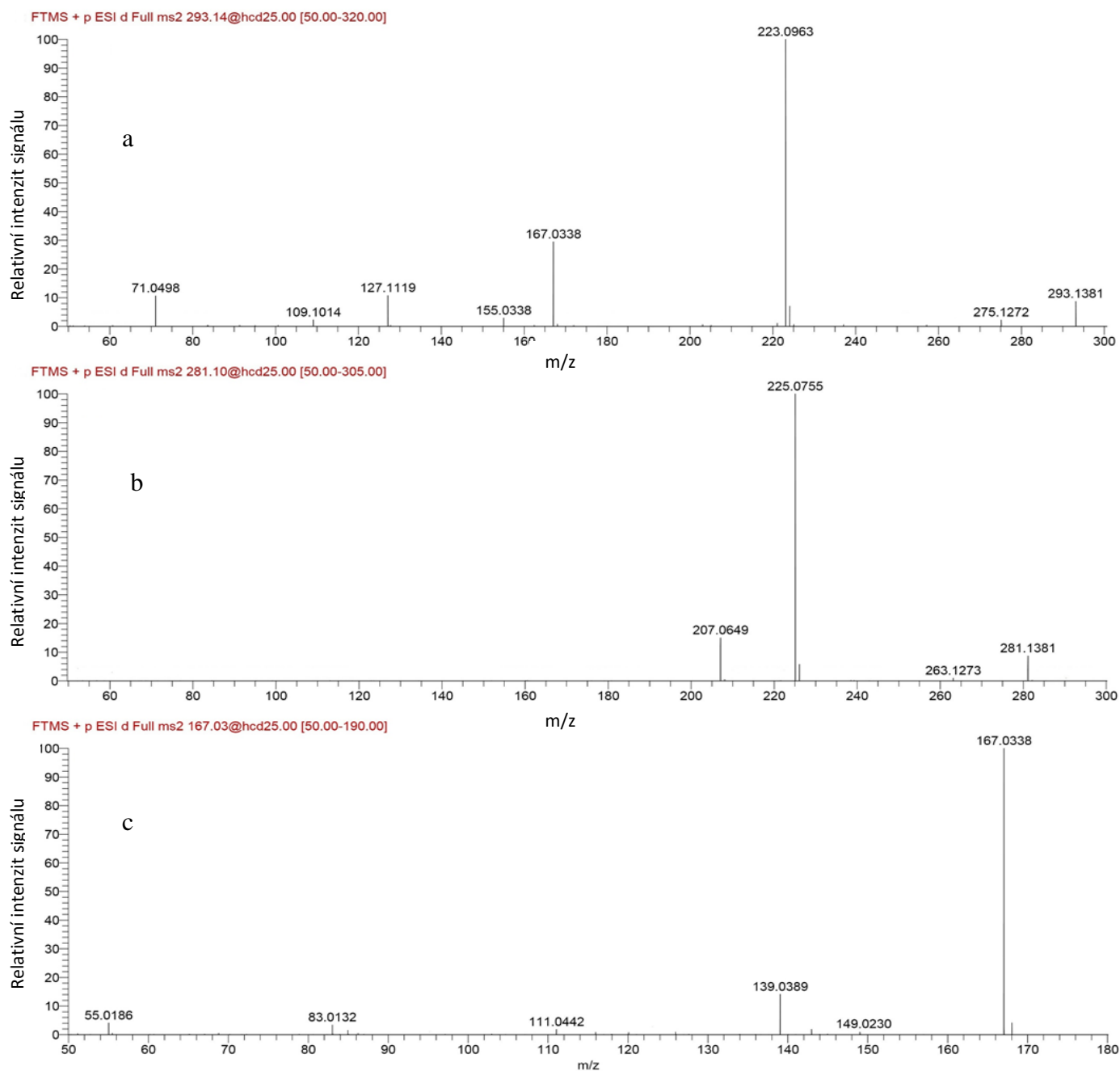
Tabulka 4.3 Hodnoty m/z a odpovídající sumární vzorce hlavních iontů ve spektru kohumulonu

m/z	Sumární vzorec	Chyba [ppm]
331, 1915	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	-1,3
293, 1385	C ₁₆ H ₂₁ O ₅	-0,5
281, 1386	C ₁₅ H ₂₁ O ₅	-0,6
225, 0757	C ₁₁ H ₁₃ O ₅	-0,2
223, 0965	C ₁₂ H ₁₅ O ₄	-0,2
207, 0647	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	-0,2
167, 0341	C ₈ H ₇ O ₄	0,4



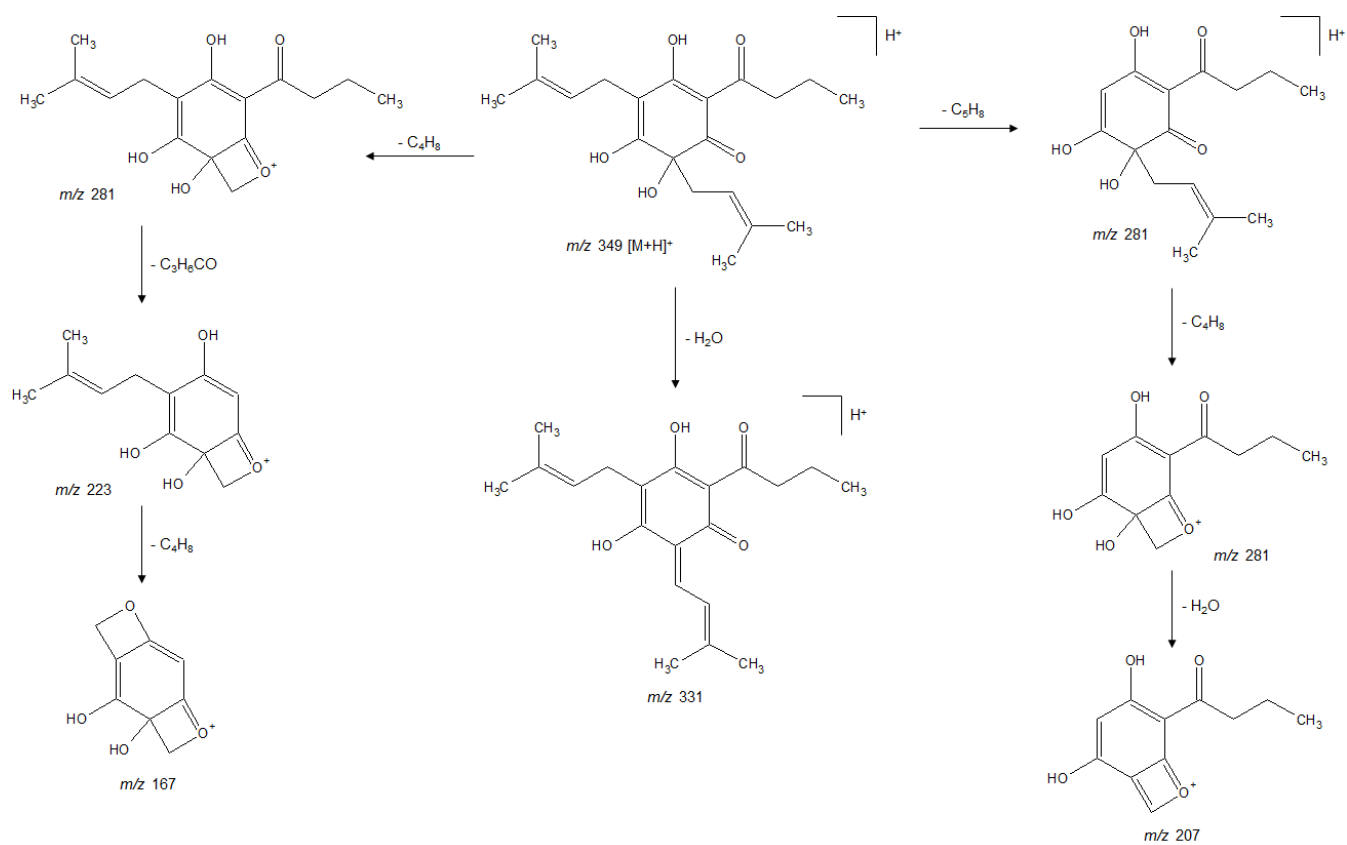
Obr 4.8 MS/MS fragmentační spektrum kohumulonu ($[M+H]^+ = 349,2$ Da).

Za podmínek pseudo MS³ byla získána fragmentační spektra dvou iontů, které vznikly další fragmentací produktů z výchozích látek štěpených ve zdroji, a to o hodnotě m/z 293 $[M-56]^+$, která odpovídá odštěpení prenylu a dále iont s poměrem hodnot m/z rovným 281 $[M-68]^+$, jež odpovídá odštěpení celé prenylové skupiny. Tato fragmentační spektra jsou na obrázku 4.9a. Vysokoenergetická kolizní fragmentace protonového iontu o m/z 293 vytváří ve spektru dva hlavní píky o m/z 223 a 167, které odpovídají $[M+H-C_4H_8-C_3H_6CO]^+$ respektive $[M+H-C_4H_8-C_3H_6CO-C_4H_8]^+$. Fragmentační spektrum iontu o m/z 281, které je na obrázku 4.9b, představuje charakteristické produktový iont s hodnotou m/z 225 odpovídající $[M+H-C_5H_8-C_4H_8]^+$ a méně, dále pak iont o poměru m/z 207, což odpovídá $[M+H-C_5H_8-C_4H_8-H_2O]^+$. Vedle toho byl fragmentován iont o m/z 167 za podmínek pseudo MS⁴, jehož spektrum je na obrázku 4.9c. Významné fragmentační ionty v tomto hmotnostním spektru mají poměry m/z 149,0230, 139,0390 a 111,0444 odpovídající složení $C_8H_5O_3$ (-2,4 ppm), $C_7H_7O_3$ (-0,5 ppm) a $C_6H_7O_2$ (0,9 ppm). Iont s m/z 149 odpovídá ztrátě molekuly vody, ionty o hodnotách m/z 139 a 111 odpovídají eliminaci jedné a dvou molekul oxidu uhelnatého.



Obr. 4.9 Pseudo MS³ spektrum prekursorového iontu o m/z 293,14 (a); Pseudo MS³ spektrum iontu o m/z 281,10 (b); pseudo MS⁴ spektrum iontu 167,03 (c)

Při analýze byly pozorovány dvě dominantní fragmentační MS³ cesty. Obě jsou zobrazené na obrázku 4.10. První zahrnuje ztrátu 2-methylpropenu (C₄H₈) z prenylu a ztrátu acylové skupiny: 349 – 293 – 223 – 167. Při druhé fragmentační cestě vznikají ionty 349 – 281 – 225 – 207 odpovídající hlavní fragmentaci nebo štěpení prenylové skupiny.



Obr 4.10 Navrhované fragmentační cesty protonované molekuly kohumulonu

5 DISKUZE

Cílem práce bylo stanovit látky s antimikrobiálními účinky ve chmelu pomocí LC/HR-MS. Protože je chmel velmi komplexní matrice, obsahuje velké množství rozmanitých sloučenin, bylo nutné tyto látky selektovat. K tomu účelu byla zvolena mikrobiologická agarová metoda, která byla použita jako variace gelové permeační chromatografie s detekcí pomocí růstu mikroorganismů. Možný by mohl být i obrácený postup, tedy nejprve provést extrakci chmele a následně zjišťovat antimikrobiální účinky. Ovšem i u tohoto postupu by bylo nutné extrahovat látky z agaru. Kromě toho, vnesení dalšího extrakčního kroku do celého procesu by mohlo způsobit ztráty látek s potenciálně antimikrobiální aktivitou.

Extrakce antimikrobiálních látek z růstového média byl jeden z nejobtížnějších kroků celé práce. Jedním z použitých rozpouštědel byl aceton, který byl úspěšně použit v několika studiích. Alothman a kol. (2009)⁶⁵ použili aceton pro extrakci širokého rozsahu polyfenolických látek z vybraného tropického ovoce. Kratchanova a kol. (2010)⁶⁶ pomocí tohoto rozpouštědla extrahovali polyfenolické látky z rostlin, které se využívají pro medicínální nebo farmakologické účely. Dále se směs acetonu a vody v poměru 70/30 (v/v) využívá při přípravách chmelových extraktů před analýzou širokého spektra látek, jako jsou prenylflavonoidy, proanthokyanidiny alfa- i beta-hořké kyseliny nebo i silice.

V literatuře lze najít i metody frakcionace hlavních látek z chmelových hlávek založené na extrakci kombinací několika organických rozpouštědel nebo pomocí superkritické extrakce oxidem uhličitým^{67,68}.

Po kombinované extrakci acetonem a metodou QuEChERS byla výtěžnost rutinu menší než 50 %, ostatní standardní látky byly stanoveny s výtěžností okolo 90 a 100 %. Takto nízká výtěžnost rutinu je důsledkem strukturních vlastností sloučeniny. Sacharidová část rutinu je příčinou toho, že celá molekula má polární charakter. Z toho lze vydedukovat, že zvolený extrakční postup má vyšší účinnost při extrahování méně polárních analytů. Kombinovaný extrakční postup byl primárně navržen pro simultánní analýzy polyfenolických látek s velkým rozsahem polarit. Jde tedy o proces, který je na rozhraní balancuje mezi univerzálností metody a výtěžností jednotlivých látek.

Strukturní elucidací polyfenolických látek s antimikrobiálními účinky se ve své studii zabývali i Arima a Danno⁶⁹. Extrakt polyfenolů z guavy separovali pomocí HPLC na frakce, u kterých byla následně zjišťována antimikrobiální aktivita. Tento proces přípravy by mohl být alternativou zpracování vzorku v této práci. Struktura sloučenin byla objasňována pomocí

hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku, nukleární magnetické rezonance a infračervené a UV spektroskopie. Stanovili a identifikovali čtyři látky, mezi nimiž byl kvercetin a dvě sloučeniny do té doby neznámé.

Výše popsaným procesem bylo nalezeno velké množství látek, které do inhibiční zóny difundovalo z chmele. Práce byla zaměřena pouze na polyfenolické látky, které jsou složeny pouze z uhlíku, vodíku a kyslíku. Většina z těchto látek je prenylovaná a zvolený postup přípravy vzorku před analýzou vychází z předpokladu, že právě prenylová funkční skupina je nositelem antimikrobiálních vlastností. Díky tomu, že se sloučeniny skládají ze stejných prvků a často obsahují prenylovou nebo geranylovou skupinu, tak tyto sloučeniny poměrně podobně a charakteristicky fragmentují, jako je tomu ve spektru látky 10 a 41 (viz obrázky 4.5 a 4.7). Sloučeniny uvedené v tabulce 4.2 nejčastěji fragmentovaly i několik prenylových a geranylových skupin a jádro látky se dále neštípalo. Proto při strukturní elucidaci byla snaha jádro dopočítat. Strukturní jádro látek může být dále substituováno kromě prenylových a geranylových skupin i skupinami hydroxylovými nebo methylovými. Jednotlivé látky se odlišují pouze v počtu a/nebo umístění těchto funkčních skupin.

Ve výše zmíněné tabulce 4.2 nejsou uvedeny všechny sloučeniny, které byly při optimalizaci extrakce použity jako standardní látky, konkrétně 8-prenylnaringenin, katechin a epikatechin, kvercetin, kemferol a rutin. Přitom se tyto látky v sušeném chmelu vyskytují. To, že nebyly identifikovány z inhibiční zóny, svědčí o tom, že v našem experimentu nemigrovaly a tedy nepřispívaly k celkovému antimikrobiologickému účinku.

6 ZÁVĚR

V rámci této práce byla použita mikrobiologická metoda pro selekci chmelových látek s potenciálními antibakteriálními účinky, kdy látky z chmele difundovaly do růstového média a vytvořily tak inhibiční zónu bez narostlých mikroorganismů. Byla vyvinuta a optimalizována nová metoda extrakce potenciálně biologicky aktivních látek polyfenolických sloučenin z pevného růstového média, která kombinuje extrakci acetonem a vysolovací metodu QuEChERS. Za použití hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením a softwarových nástrojů bylo vybráno 56 polyfenolických sloučenin se sumárním vzorcem a přesnou hmotou pro identifikaci a strukturní elucidaci. Z toho bylo identifikováno 7 již známých sloučenin a 2 byly identifikované předběžně, ovšem u většiny dalších látek byla zjištěna strukturní podobnost s těmito látkami.

Při další studii by bylo možné tyto látky analyzovat v negativním módu, což by poskytlo další informace o fragmentaci látek. Dále potom využití i jiných analytických technik jako nukleární magnetická rezonance nebo infračervená spektrometrie by pomohlo zjistit detailnější strukturní vlastnosti.

Zdroje

1. Nováková L., Dauša M. a kolektiv; *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Europrint, Praha (2013)
2. Griffiths, J.; A Brief History of Mass Spectrometry. 80, 2008, *Analytical Chemistry*, **80**, 5678-5683 (2008)
3. Friedecký D., Lemr K.; Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**(41), 152-157 (2012)
4. Nobel Prize. Dostupné na WWW: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates> [cit. 22. 4. 2016]
5. Nobel Prize. Dostupné na WWW: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/> [cit. 22. 4. 2016]
6. Norková R., Jaklová Dyrtrtová J., Kašička V.; Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické Listy* **107**, 949-955 (2013)
7. Xian F., Hudrickson Ch. L., Marshall A. G.; High resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **84**, 708-719 (2012)
8. Stafford G.; Ion trap mass spectroscopy: a personal perspective. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13**(6), 589-596 (2002)
9. Verner, P.; *Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze*, *Chemické listy* **99**, 937-942 (2005)
10. Marshall A. G., Hendrickson Ch. L., Jackson G. S.; Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrometry Review* **17**, 1-35 (1998)
11. Boháč M., Ingehdoh A., Fuchser J., Witt M.; Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostní spektrometrické metody v proteomice. *Chemické Listy* **99**, 943-951 (2005)
12. Volný, M.; Hmotnostní spektrometrie: přehled oblastí aktuálního vývoje. *Chemické listy*. **105**, 230-236 (2011)
13. Zubarev R. A., Makarov A.; Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **85**(11), 5288-5296 (2013)
14. Hu Q, Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks R. G.; The orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, **40**, 430-443 (2005)
15. Makarov A., Denisov E., Kholomeer A., Balschun W., Lange O., Strupat H., Horning S.; Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **78**, 2113-2120 (2006)
16. Ekoos K., Chernushevich I. V., Simons K., Shevchenko A.; Quantitative Profiling of Phospholipids by Multiple Precursor Ion Scanning on a Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **74**, 941-949 (2002)
17. Holčápek M., Jandera P.; Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*, **92**, 278-286 (1998)
18. Stevens J. F., Ivancic M., Hsu V. L., Deinzer M. L.; Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **44**(8), 1575-1585 (1997)

19. Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. Vydavatelství VŠCHT, Praha (2010)
20. Ashurst P. R.; The chemistry of hop resins. *Progress in the chemistry of organic natural products* 25, 63-89 (1967)
21. Stevens J. F., Page J. E.; Xanthohumol and related prenylfavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65, 1317-1330 (2004)
22. Karabin M, Hudcova T, Jelinek L, Dostalek P. Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 106, 1095-1103 (2012)
23. Olšovská J., Boštíková V., Dušek M., Jandovská V., Bogdanová K., Čermák P., Boštík P., Mikyška A., Kolář M.; Humulus lupulus L. (Hops) - a valuable source of compounds with bioactive effects for therapies. *Military Medical Science Letters* 85(1), 19-30 (2016)
24. Sharpe F. R., Law D. R. J.; The essential oil of hops - A review. *Journal of the Institute of Brewing* 87, 96-107 (1981)
25. Jirovetz L., Bail S., Buchbauer G., Denkova Z., Slavchev A., Stoyanova A., Schmidt E., Geissler M.; Antimicrobial testing, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (Humulus lupulus L.) from Bavaria and some of its main compounds. *Scientia Pharmaceutica* 74, 189-201 (2006)
26. Dimpfel W, Suter A. Sleep improving effects of a single dose administration of a valerian/hops fluid extract - A double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study on a parallel design using electrohypnograms. *European Journal of Medical Research* 3, 200-204 (2008)
27. Zanolini P, Zavatti M.; Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L., Review. *Journal of Ethnopharmacol* 116, 383-396 (2008)
28. Krofta K., Mikyška A.; Beta kyseliny chmele, význam a využití. *Kvasný Průmysl* 60, 96-105 (2014)
29. Van Cleemput M., Heyerick A., Libert C., Swert K., Philippé J., De Keukeleire D., Haegeman G., De Bosscher K.; Hop bitter acids efficiently block inflammation independent of GRalpha, PPARalpha or PPARgamma. *Molecular Nutrition & Food Research* 53(9), 1143-1155 (2009)
30. Biendl M.; Hops and Health. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*. 46(2), 1-7 (2009)
31. Čermák P., Palečková V., Houska M., Strohalm J., Novotná P., Mikyška A., Jurková M., Sikorova M.; Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33(4), 302-307 (2015)
32. Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E. K., Becker T.; Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. *Journal of Institute of Brewing* 120, 289-314 (2014)
33. Martin J., Martinová D.; Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem. *Praktické lékařství* 10(6), 226-228 (2014)
34. Butterweck V., Brattstoem A., Grundmann O., Koetter U.; Hypnotic effect of hops and antagonized with the competitive melatonin receptor antagonist luzidole in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59(4), 549-552 (2007)

35. Hofta P., Dostálek P., Basařová G.; Xanthohumol - chmelová pryskyřice nebo polyfenol? *Chemické listy* **98**, 825-830, (2004)
36. Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eideen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H. R., Frank N., Bartsch H., Becker H.; Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics* **11**, 959-969 (2002)
37. Nikolic D., Li Y., Chadwick I. R., van Breemen R. B.; Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenyled flavanoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *Journal of Mass Spectrometry* **40**(3), 289-299 (2005)
38. Gerhäuser C.; Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer* **41**, 1941-1954 (2005)
39. Tobe H., Kubota M., Yamaguchi M., Kocha T., Aoyagi T.; Apoptosis to HL-60 by humulone. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**, 1027-1029 (1997)
40. Nowakowska, Z.; A Review of Antiinfective and Antiinflammatory Chelcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**(2), 125-137 (2007)
41. Kammhuber, K.; Quercetin & Kaempferol. *Hopfenrundschau International* 52-55, (2006/2007).
42. Slanina J., Táborská E.; Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* **98**, 239-245 (2004)
43. Olšovská J., Kameník Z., Čejka P., Jurková M., Mikyška A.; Ultra-high-performance liquid chromatography profiling method for chemical screening of proanthocyanidins in Czech hops. *Talanta* **116**, 919-926 (2013)
44. Fidler M., Kolářová L.; Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy* **103**, 232-235 (2009)
45. Moir M.; Hops - A Millenium Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58(4), 131-146 (2000)
46. Jurková M., Čejka P., Houška M., Mikyška A.; Simultánní stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů ve chmelu a pivu metodou HPLC-DAD: Studie aplikace homogenátů zeleného chmele v pivovarském procesu. *Kvasný průmysl* **59**(2), 41-49 (2013).
47. Possemiers S., Bolca S., Grootaert C., Heyerick A., Decroos K., Dhooge W., De Keukeleire D., Rabor S., Verstraele W., Van de Wiele T.; The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phyfoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *Journal of Nutrition* **136**(7), 1862-1867 (2006).
48. Segawa S., Yasui K., Takata Y., Kurihara T., Kaneda H., Watari J.; Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus lupulus* L.) as Inhibitors of Chemical Mediator Release from Human Basophilic KU812 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**(12), 2990-2997 (2006)
49. Graefe E., Witte J., Mueller S., Riethling A. K., Uehleke B., Drewlow B., Pforte H., Jacobash G., Derendorf H., Viet M. Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *Journal of Clinical Pharmacology* **41**, 492-499 (2001)
50. Veeresham C., Rao A. R., Asres K.; Aldose Eaductase Inhibitors of Plant Origin. *Phytotherapy Research* **28**(3), 317-333 (2014)

51. Guardia T., Rotelli A. E., Juarez A. O., Pelzer L. E.; Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin quercetin and hespedin on adjuvant in rat. *Farmaco* **56**(9), 683-687 (2001)
52. Webster R. P., Gawde M. D., Bhattacharya R. K.; Protective effect of rutin glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer letters* **109**(1-2), 185-191 (1996)
53. Griffith J. Q. Jr, Couch J. F., Lindauer M. A.; Effect of rutin on increased capillary fragility in man. *Experimental Biology and Medicine* **53**(3), 228-229 (1944)
54. Shanno, R. L.; Rutin; a new drug for the treatment of increased capillary fragility. *The American Journal of the Medical Sciences* **211**, 539-543 (1946)
55. De la Iglesia R., Milago F., Campion J., Boqué N.; Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors* **36**, 159-168 (2010)
56. Prior R. L., Lazarus S. A., Cao G., Muecители H., Hammerstone J. F.; Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(3), 1270-1276 (2001)
57. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N. R., Nogueira J. M. F, Saraiva J.A., Nunes N. L.; Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* **43**, 587-595 (2013)
58. Carson C. F., Riley T. V.; Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 264-269 (1995)
59. Proestos C., Chorianopoulos N, Nychas G.-J. E., Komaitis M.; RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1190-1195 (2005)
60. Nachnani S., Scuteri A., Newman M. G., Avanesian A. B., Lomeli S. L.; E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology* **63**(7), 576-583 (1992)
61. Callemien D., Jerdovic V., Rozenberg R., Collin S.; Hop as an Interesting Source of Resveratrol for Brewers: Optimization of the Extraction and Quantitative Study by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(2), 424-429 (2005)
62. Farag M. A., Porzel A., Schmidt J., Wessjohann L. A.; Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics* **8**, 492-507 (2012)
63. Zhang X., Liang X., Xiao H., Xu Q.; Direct Characterization of Bitter Acids in a Crude Hop Extract by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**, 180-187 (2004)
64. Dušek M, Olšovská J, Křofra K, Jurková M, Mikyška A.; Quantitative determination of β -acid and their transformation products in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 7690-7697 (2014)
65. Alothman M., Bhat R., Karim A. A.; Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits. *Food Chemistry* **115**, 785-788 (2009)

66. Kratchanova M., Denv P., Ciz M., Lojek A., Mihalov A.; Evaluation of antioxidant activity of medical plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica* **57**, 229-234 (2010)
67. He G., Xiong H., Chen Q., Ruan H., Wang Z., Traoré L.; Optimalization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Zhejiang University Science B* **6**, 999-1004 (2005)
68. del Valle J. M., Rivera O., Teuber O., Palma M. T.; Supercritical CO₂ extraction for Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1349-1356 (2003)
69. Arima H., Danno G.; Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66**(8), 1727-1730, 2002