



Ksantohumul i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne

Jadwiga Gołąbczak, Edyta Gendaszewska-Darmach
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Xanthohumul and other prenylated flavonoids of hop cones – biological and technological aspects

Summary

Hops, the female inflorescences of the hop plant (*Humulus lupulus*) are used in the brewing industry to add bitterness and aroma to beer. This raw material is a rich source of terpenoid essential oils and terpenophenolic resins (bitter acids, prenylated flavonoids). Xanthohumul is the most abundant (80-90%) of total amount of prenylated flavonoids in hop cones (up to 1% w/w). Xanthohumul has received much attention in recent years as a cancer chemopreventive agent because of its ability to inhibit initiation, promotion and progression stages of carcinogenesis. Its beneficial effects on health also include antibacterial, antioxidant, and antiinflammatory properties. Hydrophobic xanthohumul cannot be extracted with carbon dioxide under condition used for common hop extract destined for the application in the brew house (300 bar, 50°C). This flavonoid remains in the waste product of the hops (spent hops) processing industry. Diverse extraction methods of spent hops by ethanol and supercritical CO₂ at different pressures lead to the residues that contain more than 30% xanthohumul. The multistep process extraction and separation of xanthohumul from natural source (raw or waste hops) with organic solvent have been also conducted. Recently, a synthetic route to xanthohumul has also been described.

The purpose of this review is to provide an overview of the chemistry, biosynthesis, biological activities, and biotechnological aspects of xanthohumul.

Key words:

hop (*Humulus lupulus*), xanthohumul, biosynthesis, biological activities, isolation methods, chemical synthesis, review.

Adres do korespondencji

Jadwiga Gołąbczak,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź

1. Wstęp

Szyszki chmielu zawierają ważne dla piwowarstwa olejki eteryczne oraz gorzkie α - i β -kwasy, a także w mniejszych ilościach unikatowe prenylowane flawonoidy [1]. Te trzy grupy związków są ze sobą biosyntetycznie powiązane, ich wspólnym prekursorem jest difosforan dimetyloallilu (DMAPP) [2]. Chmielowe prenyloflawonoidy występują w szyszkach głównie w postaci ksantohumolu (2',4',4-trihydroksy-6'-metyloksy-3-(3-metylo-but-2-en-1-yl)chalkon) [3]. Ksantohumul charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej. Jest on silnym przeciwutleniaczem i zapobiega chorobie niedokrwiennej serca [4-7]. Wykazuje także działanie przeciwgrzybicze [8], przeciwbakteryjne [9], przeciwwirusowe [10] i przeciwmalaryczne [11]. Szczególnie interesujące są antynowotworowe właściwości ksantohumolu, opisane po raz pierwszy przez naukowców z Oregon State University (Corvallis, USA) i podsumowane takim stwierdzeniem: "Xanthohumol is one of the more significant compounds for cancer chemoprevention that we have studied" [12-14]. W najnowszych danych potwierdzono ochronną rolę ksantohumolu, a także innych chmielowych flawonoidów na etapie inicjacji, promocji i progresji guza, opisano także molekularne podstawy mechanizmów działania tych fitozwiązków [15].

Ksantohumul w procesie warzenia brzeczki ulega niemal całkowicie izomeryzacji do lepiej rozpuszczalnego, ale mniej aktywnego biologicznie izoksantohumolu [3]. Stężenie ksantohumolu w dostępnych na rynku piwach nie przekracza zazwyczaj 0,2 mg/l [16]. Stężenie to musi być zwiększone do 5 mg/l w celu zapewnienia piwom właściwości chemoprewencyjnych [3]. Rozpoczęto w związku z tym intensywne prace nad produkcją ekstraktów chmielowych i piw o zwiększonej zawartości ksantohumolu [17-22]. Przedstawiono metody izolowania, oczyszczania i oznaczania ksantohumolu. Opracowano także technologię produkcji piw („XAN” technology) wzbogaconych w ten prenylochalkon. Technologię tę wdrożono po raz pierwszy w Niemczech w 2004 r., uzyskując piwo, zawierające około 1 mg/l ksantohumolu. Umożliwia ona osiągnięcie stężenia ksantohumolu na poziomie 1-3 mg/l w niefiltrowanych piwach typu lager oraz > 10 mg/l w filtrowanych ciemnych piwach. Przykładami oferowanych przez niemiecki rynek piw wzbogaconych w ksantohumul (XN) są: Weihenstephaner „Xan-Hefeweißbier” (1,3 mg XN/l), Weihenstephaner „XAN-Wellness” (4,1 mg XN/l), w Czechach jest produkowane piwo „ŽATEC Xantho” (0,3 mg XN/l) [23,24].

Dane te zachęcają do opracowania rodzimej technologii odzyskiwania ksantohumolu z odpadowej masy, generowanej w dużych ilościach w procesie ekstrakcji olejków eterycznych i gorzkich kwasów z szyszek chmielu za pomocą nadkrytycznego CO₂.

2. Charakterystyka prenyloflawonoidów chmielu

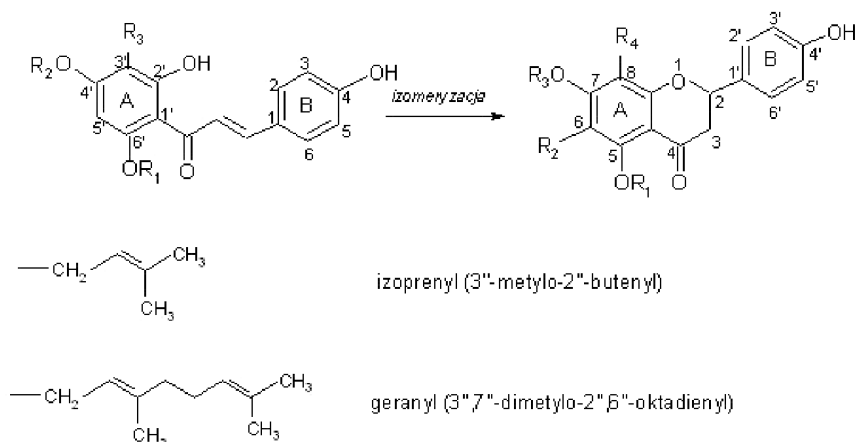
W szyszkach chmielu występują trzy ważne grupy wtórnych metabolitów: olejki eteryczne, gorzkie kwasy i prenyloflawonoidy (prenylochalkony i prenyloflawano-

ny). Zainteresowanie badaczy skupiało się do niedawna na dwóch pierwszych, ważnych dla piwowarstwa grupach tych metabolitów. Dopiero na podstawie wyników prac, wskazujących na potencjalne antynowotworowe właściwości chmielowych chalconów i ich izomerów, naukowcy zwrócili uwagę na te związki [25].

Olejki eteryczne stanowią 0,3-3%, zaś gorzkie kwasy (acylofloroglucynole) 5-20% suchej masy szyszek chmielu. Pierwsze kształtują aromat piwa i składają się w ponad 90% z terpenów (mircen, α -humulen, β -kariofilen, farnezen) oraz terpenoidów. Drugie nadają piwu charakterystyczną goryczkę i dzielą się na α -kwasy (humulon, kohumulon i adhumulon) oraz β -kwasy (lupulon, kolupulon i adlupulon) [1,2,26,27]. α -kwasy zawierają jedną, zaś β -kwasy dwie grupy prenylowe. α -Kwasy w czasie warzenia brzeczki ulegają izomeryzacji do bardziej gorzkich i lepiej rozpuszczalnych izo- α -kwasów, stąd mają decydujące znaczenie w kształtowaniu smaku piwa [28]. Flawonoidy chmielu, podobnie jak gorzkie kwasy, posiadają poliketydowy szkielet, do którego są przyłączone, jedna lub więcej, grupy prenylowe [2]. Składają się one głównie z chalconów, zawierających grupy izoprenylove (najczęściej 3,3-dimetyloallilowe) lub geranylove (rys. 1). Grupy te mogą ulegać utlenieniu lub dodatkowo cyklizacji [3,29]. Cyklizacja izoprenylowych grup przyczynia się do tworzenia piranowych lub furanowych systemów pierścieniowych o zróżnicowanych strukturach, w zależności od kierunku fuzji pierścienia, poziomu utlenienia i ilości tlenowych podstawników [30].

Prenylowane chalkony obejmują grupę kilkunastu pokrewnych związków i stanowią minimum 95% sumarycznej ilości chmielowych prenyloflawonoidów, szacowanej na 0,2-1,5% s.m. (rys. 1) [31]. Najważniejszym pod względem masowego udziału i aktywności biologicznej chalkonem jest ksantohumol (2',4,4'-trihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkon) (1). W strukturach utlenionych form ksantohumolu mogą występować niecykliczne grupy prenylowe lub podstawniki cykliczne, zawierające atom tlenu w pozycji C-4' bądź C-6' pierścienia A [3]. Innymi prenylochalkonami są: demetyloksantohumol (2',4,4',6'-tetrahydroksy-3'-prenylochalkon) (2), a także ksantogalenol (2',6',4'-trihydroksy-4'-metoksy-3'-prenylochalkon) (3), zidentyfikowany w niektórych odmianach chmielu, rosnących w Ameryce Północnej i Azji Wschodniej [32]. Przykładem geranylochalkonu jest 3'-geranylochalkonaryngenina (2',4,4',6'-tetrahydroksy-3'-geranylochalkon) (4).

W cząsteczkach większości chalconów jest obecna przynajmniej jedna wolna grupa 2'- lub 6'-hydroksylowa [31]. Z tego względu chalkony łatwo ulegają izomeryzacji do odpowiednich flawanonów w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji addycji Michaela. Szybkość tej reakcji zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury i pH środowiska. W grupie izomerów chalconów dominują flawanony, zawierające grupy prenylowe w jednej lub obydwu pozycjach 6 i 8 (rys. 1). Ksantohumol (1) dysponuje jedną, zaś demetyloksantohumol (2), 3'-geranylochalkonaryngenina (4), a także ksantogalenol (3) dwiema grupami hydroksylowymi, które mogą uczestniczyć w reakcji cyklizacji pierścienia. Z tego powodu w reakcji cyklizacji ksantohumolu powstaje jeden izomer (5), a w analogicznych reakcjach pozostałych prenylochalconów tworzą



Prenylowany chalkon				Prenylowany flawanon				
<i>L.p.</i>	R ₁	R ₂	R ₃	<i>L.p.</i>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1. ksantohumul	CH ₃	H	izoprenyl	5. izoksantohumul	CH ₃	H	H	izoprenyl
2. demetylo-ksantohumul	H	H	izoprenyl	6. 6-prenylonaryngenina	H	izoprenyl	H	H
3. ksantogaleolol	H	CH ₃	izoprenyl	7. 8-prenylonaryngenina	H	H	H	izoprenyl
				8. 7-O-metylo-6-prenylonaryngenina	H	izoprenyl	CH ₃	H
4. 3'-geranylo-chalkonaryngenina	H	H	geranyl	9. 7-O-metylo-8-prenylonaryngenina	H	H	CH ₃	izoprenyl
				10. 6-geranylonaryngenina	H	geranyl	H	H
				11. 8-geranylonaryngenina	H	H	H	geranyl

Rys. 1. Chemiczne struktury prenyloflawonoidów szyszek chmielu [3,41].

się dwie formy izomeryczne (odpowiednio 6 i 7, 8 i 9 oraz 10 i 11). Prenylochalkony, podobnie jak gorzkie kwasy, ulegają izomeryzacji na etapie warzenia brzeczki i występują w piwie niemal wyłącznie w postaci flawanonów. Piwo zawiera 0,2-2 mg/l flawanonów i jest uznawane za jedno z ważniejszych źródeł flawonoidów w ludzkiej diecie [3].

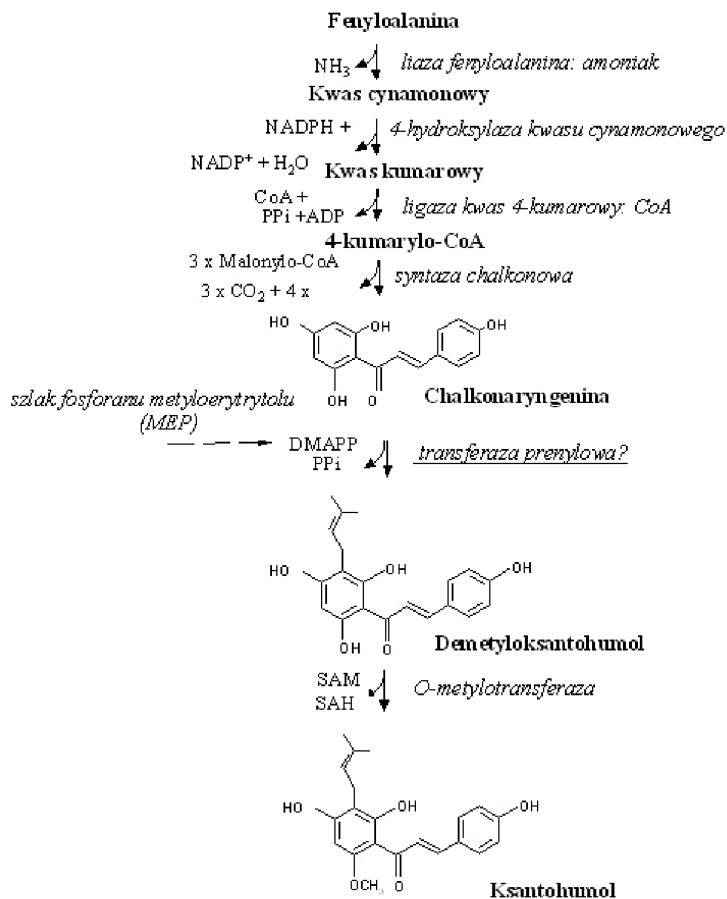
Ksantohumul stanowi 80-90% sumarycznej puli prenyloflawonoidów, jego ilość w suchej masie szyszek waha się w granicach 0,1-1%, w zależności od odmiany chmielu [3]. W nielicznych danych literaturowych, dotyczących polskich odmian chmielu wskazuje się, że zawierają one od 0,5 (*Izabela*, *Marynka*) do 0,8% s. m. (*Zula*) ksantohumolu i pod tym względem należą do produkujących w Europie [33].

Zawartość w chmielu kolejnego prenylochalkonu, demetyloksantohumolu, jest znacznie mniejsza aniżeli ksantohumolu i mieści się w granicach 0,05-0,3% [1,28]. Demetyloksantohumul uznawany jest za prekursora większości flawonoidów szyszek chmielu [34]. W wyniku jego chemicznej izomeryzacji powstaje mieszanina

złożona z ekwiwalentnych ilości racematów najważniejszych estrogenów chmielu: 6- i 8-prenyloaryngeniny (6 i 7) [35]. Izomeryzacja demetyloksantohumolu, tzw. konwersja Nastainczyka, może także zachodzić spontanicznie, podczas magazynowania szyszek chmielu.

3. Biosynteza ksantohumolu

Chmielowe prenyloflawonoidy, gorzkie kwasy oraz olejki eteryczne są ze sobą biosyntetycznie powiązane i nagromadzają się w lupulinie. Synteza mono- i seskwiterpenów wymaga obecności pirofosforanów allilu o dłuższych łańcuchach, utworzonych z difosforanu dimetyloallilu (DMAPP) oraz difosforanu izopentenyłu (IPP) (rys. 2) [1]. IPP jest syntetyzowany głównie w szlaku 2-C-metylo-4-fosforan D-erytritro-



Rys. 2. Biosynteza ksantohumolu [2,3,36]

lu (MEP, ang. *2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate*), funkcjonującym w plastydach oraz, w mniejszym stopniu, w cytozolowym szlaku kwasu miewalonowego [36]. Utworzony IPP jest przekształcany do allilowego izomeru DMAPP przez izomerazę IPP (EC 5.3.3.2) [37].

4. Biologiczna aktywność ksantohumolu

4.1. Aktywność antyoksydacyjna

Ksantohumol aktywnie neutralizuje wolne rodniki i zapobiega rozwojowi miażdżycy tętnic i chorób nowotworowych [4]. Ksantohumol okazał się dziewięć- i trzykrotnie silniejszym zmiataczem rodników hydroksylowych i nadtlenkowych niż wzorcowy Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy) [25]. Ksantohumol, w przeciwieństwie do izoksantohumolu i 8-prenylonaryngeniny, wykazywał także antyoksydacyjną aktywność względem anionorodników ponadtlenkowych, generowanych przez oksydazę ksantynową, nie hamując przy tym bezpośrednio aktywności tego enzymu. Ponadto związek ten ($IC_{50} = 2,6$ mM) hamował powstawanie anionorodników ponadtlenkowych w systemie różnicujących się do granulocytów białaczkowych komórek HL-60, po ich stymulacji przez PMA (12-O-tetradekanoilforbulo-13-octan, 12-mirystyniano-13-octan forbolu) [5].

W badaniach *in vitro*, prowadzonych przez Mirandę i wsp. [6] oraz Rodrigueza i wsp. [7] udowodniono ochronne, antyoksydacyjne działanie prenylowanych chalkonów chmielu, zwłaszcza ksantohumolu i demetyloksantohumolu, względem lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Ksantohumol zmniejszał peroksydację lipidów o ponad 70% po 5 godzinach inkubacji, w porównaniu z układem kontrolnym. Chalkony o większej liczbie grup prenylowych oraz prenyloflawanony wykazywały pod tym względem wyraźnie mniejszą aktywność, zaś nieprenylowane flawonoidy stymulowały utlenienie LDL.

4.2. Aktywność antydrobnoustrojowa i przeciwwirusowa

W badaniach Mizobuchi i Sato wykazano, że ksantohumol oraz prenyloflawanony: 6- i 8-prenylonaryngenina w stężeniu 3-12,5 $\mu\text{g/ml}$ hamowały rozwój pleśni *Trichophyton mentagrophytes* oraz *T. rubrum* [8]. Związki te, a także izoksantohumol wykazywały umiarkowane inhibujące działanie względem pleśni *Mucor rouxianus* oraz były nieaktywne względem drożdży *Candida albicans*, pleśni *Fusarium oxysporum* oraz bakterii *Escherichia coli*. Kontrolna naryngenina wykazywała natomiast minimalną aktywność antydrobnoustrojową. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników sugerują, że obecność hydrofobowej grupy prenylowej sprzyja transportowi flawo-

noidów przez membranę cytoplazmatyczną lub też ułatwia wiązanie się tych związków z aktywnymi centrami enzymów.

Ksantohumol w stężeniach minimalnych (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*), wynoszących 1-3 $\mu\text{g/ml}$, hamował wzrost bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes* oraz *Staphylococcus epidermidis*, powodujących zakażenia ropne skóry oraz zakażenia układowe o etiologii gronkowcowej (zapalenie płuc, posocznica) [9]. Wykazywał on także silne bakteriobójcze działanie względem dwóch innych, Gram-dodatnich patogenów skóry: *Propionibacterium acnes* oraz *Kocura rhizophila*. Jego minimalne stężenia bójcze (MBC, ang. *Minimum Bactericidal Concentration*) wynosiły odpowiednio 3 oraz 10 $\mu\text{g/ml}$. Ksantohumol hamował ponadto rozwój komórek *Streptococcus mutans* (MIC 12,5 $\mu\text{g/ml}$), powodujących próchnicę zębów, a także wykazywał działanie przeciwmalaryczne [11].

Ksantohumol w dawkach odpowiadających IC_{50} : 0,82, 1,28 oraz 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hamował procesy indukowane przez wirus HIV-1: efekt cytopatyczny (tworzenie wielojądrowych komórek-syncytium), produkcję wirusowego antygeny p24 oraz odwrotnej transkryptazy w limfocytach C8166 [10]. Ten prenylochalkon (EC_{50} 20,74 $\mu\text{g/ml}$) przeciwdziałał także replikacji HIV-1 w peryferyjnych jednojądrzastych komórkach krwi, natomiast nie hamował wnikania wirusa do komórek.

4.3. Aktywność antynowotworowa

4.3.1. Faza inicjacji nowotworzenia

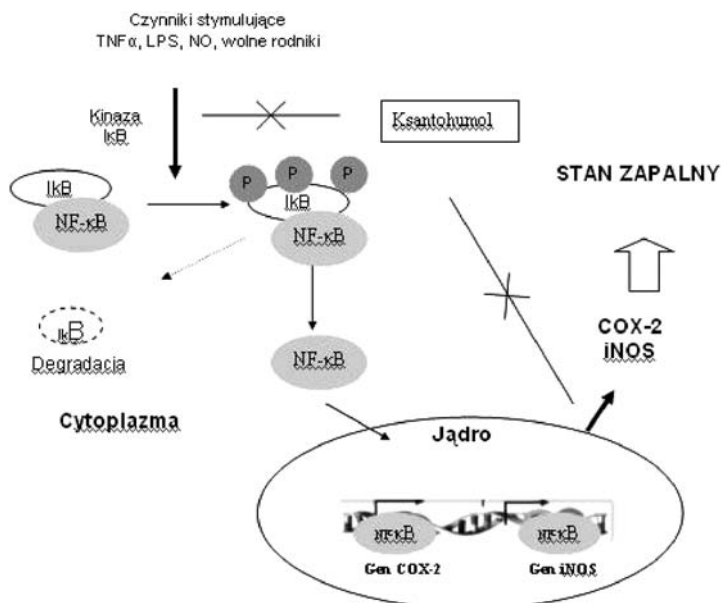
Działanie ochronne ksantohumolu przed indukcją procesu nowotworzenia przejawia się nie tylko jego właściwościami antyoksydacyjnymi, ale także zdolnością do modulacji aktywności i/lub ekspresji enzymów detoksyfikujących ksenobiotyki. Stwierdzono, że ksantohumol hamuje aktywności enzymów I fazy odtruwania: monooksygenaz cytochromu P-450 (CYP). Henderson i wsp. stwierdzili, że ksantohumol w stężeniu 10 μM niemal całkowicie hamował aktywność O-deetylazy -7-etoksy-rezorufiny (EROD) związanej z CYP1A1 oraz CYP1B1 [12]. Gerhäuser i wsp. ustalili natomiast, że ksantohumol i izokksantohumol hamowały aktywność CYP1A w stężeniach IC_{50} odpowiednio 0,022 i 0,3 μM [5]. Wykazano także, że ksantohumol i sześć innych prenyloflawonoidów zwiększały ekspresję enzymu fazy II – reduktazy chinonowej (dehydrogenazy NAD(P)H (chinon); EC 1.6.5.2) w hodowli komórek wątrobiaka myszy Hepa 1c1c7 [38,39]. Ksantohumol hamował metaboliczną aktywację 2-amino-3-metyloimidazo[4,5-f]chinoliny, co oznacza, że jest on potencjalnym czynnikiem chemoprewencyjnym względem rakotwórczych, heterocyklicznych amin aktywowanych przez CYP1A2 [40].

4.3.2. Faza promocji nowotworzenia

Zwiększona synteza prostaglandyn przez cyklooksygenazy i nadmierna produkcja tlenu azotu przez indukowaną syntazę tlenu azotu (iNOS) przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego, a także onkogenezy [41].

Ksantohumol, a także mieszanina prenylowanych flawonoidów (m. in. ksantohumol i dihydroksantohumol) zawarta w ekstrakcie szyszek chmielu wykazywała działanie przeciwzapalne hamując aktywność konstytutywnej cyklooksygenazy 1 (COX-1) i indukowanej cyklooksygenazy 2 (COX-2), a także obniżając ekspresję iNOS (rys. 3) [42]. Inhibujące COX-1 i COX-2 dawki ksantohumolu równoważne IC_{50} wynosiły odpowiednio 16,6 oraz 41,5 μ M.

Wyniki te potwierdzono badaniami, dotyczącymi wpływu ksantohumolu na indukcję mediatorów rozwoju stanu zapalnego w komórkach mysich makrofagów RAW264.7, po ich stymulacji LPS (lipopolisacharyd patogennych bakterii G-) [43]. Ksantohumol redukował ekspresję receptorów LPS i w efekcie ograniczał aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co z kolei przyczyniało się do zahamowania produkcji prozapalnych cytokin oraz tlenu azotu przez makrofagi RAW264.7. Jest to zrozumiałe, zważywszy fakt, że NF- κ B w jądrze aktywuje ekspresję całego spektrum genów odpowiedzialnych za rozwój stanu zapalnego (w tym produkcja wielu cytokin, syntazy tlenu azotu i cyklooksygenazy 2).



Rys. 3. Przeciwzapalne działanie ksantohumolu na różnych etapach aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B; TNF α – czynnik martwicy nowotworu typu α ; I κ B – białka inhibitorowe czynnika jądrowego κ B.

4.3.3. Faza progresji nowotworzenia

Mechanizm protekcyjnego działania ksantohumolu na etapie progresji procesu nowotworzenia jest wielokierunkowy. Obejmuje on m. in. inhibicję syntezy DNA, blokowanie cyklu komórkowego, różnicowanie komórkowe i aktywację apoptozy.

Miranda i wsp. stwierdzili, że prenylowane flawonoidy chmielu hamują proliferację komórek raka piersi MCF-7, komórek raka okrężnicy HT-29 oraz komórek raka jajnika A-2780, nie wpływając na wzrost prawidłowych hepatocytów [13]. W badaniach tych najsilniejsze właściwości antyproliferacyjne wykazywał ksantohumol, zwłaszcza względem komórek A-2780 ($EC_{50} = 0,52 \mu\text{M}$). Antyproliferacyjny mechanizm działania ksantohumolu polegał zarówno na hamowaniu syntezy DNA (inhibicji aktywności polimerazy DNA α *in vitro* oraz inkorporacji tymidyny w cząsteczkę nowo syntetyzowanego DNA), jak również na zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie S.

Antyproliferacyjne i proapoptotyczne działanie ksantohumolu, a także, w mniejszym stopniu, izoksantohumolu i 8-prenylnaryngeny wazględem komórek raka piersi linii Sk-Br-3 potwierdzono w badaniach Monteiro i wsp. [44]. Na podstawie wyników tych badań wykazano ponadto hamujący wpływ chmielowych prenyloflawonoidów na aktywność aromatazy P450 (niespecyficzna monooksygenaza; EC 1.14.14.1), odpowiedzialnej za konwersję androgenów w estrogeny. Co więcej, obecny w środowisku reakcyjnym estrogen, 17- β -estradiol, znosił hamującą aktywność flawonoidów. Te obserwacje sugerują możliwość uruchamiania przez flawonoidy innego, przeciwdziałającego rozwojowi raka piersi mechanizmu, jakim jest blokowanie syntezy estrogenu.

Ksantohumol powodował również zahamowanie proliferacji komórek raka okrężnicy linii HCT-116 poprzez wywoływanie procesu apoptozy [45]. Właściwości proapoptotyczne tego związku stwierdzono również w badaniach nad limfocytami pobranymi od pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytarną [46], a także nad komórkami raka prostaty linii BPH-1 [47], DU 145 [17] i PC3 [44,16]. Ustalono dla ksantohumolu stężenia IC_{50} , hamujące rozwój komórek DU 145 oraz PC3 wynosiły odpowiednio 12,3 i 13,2 μM [48].

Innym mechanizmem, za pośrednictwem którego ksantohumol, a także 8-prenylnaryngena hamują proliferację komórek nowotworowych jest indukowanie końcowego zróżnicowania komórek poprzez zahamowanie cyklu podziału komórki w fazie G1 [5,40]. Efekt ten został potwierdzony *in vivo* poprzez udokumentowane zahamowanie naciekania komórek nowotworowych u myszy ($IC_{50} = 0,02 \mu\text{M}$) [22].

Jedną ze strategii terapii chorób nowotworowych jest hamowanie procesu angiogenezy. Ostatnio coraz częściej poszukuje się antyangiogennych fitozwiązków, przydatnych nie tylko w leczeniu, ale i w prewencji nowotworzenia (angioprewencja). Do takich związków należą bez wątpienia ksantohumol i inne prenyloflawonoidy chmielu [49]. Stwierdzono, że ksantohumol ogranicza produkcję endogennych prostaglandyn, które inicjują ważny dla wzrostu guza proces tworzenia się nowych

naczyń krwionośnych (angiogenezy). Limituje on także powstawanie tlenku azotu (p. 3.2). Wiadomo, że nadmierne i wydłużone w czasie generowanie NO aktywuje produkcję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), który jest znanym induktorem angiogenezy [50]. Ze względu na fakt, że warunkiem zarówno fizjologicznej jak i patologicznej angiogenezy jest proliferacja oraz migracja komórek śródbłonna naczyń, stały się one jednym z celów terapii przeciwnowotworowej. Stwierdzono *in vitro*, że ksantohumol w stężeniu $< 10 \mu\text{M}$ wykazywał właściwości antyangiogenne powodując zahamowanie proliferacji i migracji tych komórek, jak również zdolności do tworzenia struktur kapilarnych [50,51]. Co więcej, w warunkach *in vivo* powodował on zahamowanie wzrostu guza (mięsak Kaposiego) u myszy [52].

5. Izolowanie i chemiczna synteza ksantohumolu

Ksantohumol jest składnikiem twardych żywic i nie rozpuszcza się w heksanie, a także w nadkrytycznym CO_2 (20-30 MPa, 40-60°C), w przeciwieństwie do miękkich żywic, zawierających m.in. gorzkie α - i β -kwasy [17]. Ksantohumol, podobnie jak inne prenylowane chalkony, nie rozpuszcza się w wodzie, w przeciwieństwie do prenylowanych flawanonów. Jest on rozpuszczalny w alkoholach (metanol, etanol) i alkoholowo-wodnych mieszaninach, estrach kwasów karboksylowych (octan etylu), eterach (eter dietylowy), ketonach (aceton) lub chalogenkach alkilu (chloroform).

Stosowany w piwowarstwie klasyczny etanolowy ekstrakt chmielowych żywic zawierał około 90% wyjściowej sumarycznej ilości ksantohumolu. Straty obecnych w etanolowym ekstrakcie prenylochalkonów wynikały z niepełnej ekstrakcji tych związków z chmielu do brzeczki (13-25%), ich adsorpcji na nierozpuszczalnych białkach siodu (18-26%), a także adsorpcji na komórkach drożdży (11-32%) w czasie fermentacji. W piwie, po okresie leżakowania, pozostawało 22-30% wyjściowej ilości ksantohumolu, głównie w postaci izoksantohumolu oraz 10% demetyloksantohumolu, całkowicie przekształconego do prenylonaryngeny [29].

Zastosowanie z kolei do produkcji piwa ekstraktu żywic, otrzymanego za pomocą nadkrytycznego CO_2 , powodowało niemal całkowite wyeliminowanie prenyloflawonoidów ze składu piwa. Ekstrakt ten bowiem zawierał poniżej 5% ilości ksantohumolu, obecnego w wyjściowym surowcu [29]. Nierozpuszczalne w nadkrytycznym ekstrakcie prenyloflawonoidy pozostawały w odpadowej poekstrakcyjnej masie chmielu.

Krajowa produkcja ekstraktów chmielowych metodą z nadkrytycznym CO_2 (30 MPa, 50°C) realizowana jest w Instytucie Nawozów Sztucznych w Puławach. Ekstrakty te zawierają 96,9% żywic, w tym 96,6% żywic miękkich i zaledwie 0,3% żywic twardych [18]. Ich produkcja generuje rocznie około 1000 ton odpadowej masy chmielu, zawierającej, oprócz leczniczych prenyloflawonoidów, cenne składniki pokarmowe (białko, sole mineralne, witaminy).

Wyniki te zainspirowały badaczy do opracowania technologii otrzymywania preparatów ksantohumolu w celu wzbogacenia piwa, a także innych napojów i żywności w ten cenny prenylochalkon [40,50].

Procedury izolowania ksantohumolu z szyszek chmielu bazują na zmiennej rozpuszczalności tego związku w rozpuszczalnikach o zróżnicowanej polarności. Zawartość ksantohumolu w uzyskanych preparatach zmienia się od 8 do 99%, w zależności od zastosowanych metod ekstrakcji i oczyszczania [52].

Ekstrakcja szyszek chmielu za pomocą np. acetonu lub chloroformu umożliwia wyodrębnienie z tego surowca składników żywic [3]. Ekstrakty zawierają gorzkie kwasy i prenyloflawonoidy, ale pozbawione są większości tkankowych składników chmielu. W celu otrzymania surowego ekstraktu ksantohumolu z ekstraktu żywic, można ten ostatni poddać rozdzielowi chromatograficznemu. Rozdział ten prowadzi się metodą chromatografii kolumnowej na żelu Sephadex LH-20 (usieciowana forma), stosując metanol jako eluent. Dalsze oczyszczanie otrzymanego ekstraktu można prowadzić półpreparatywną techniką HPLC stosując kolumnę C₁₈ (żel oktadecylowy) z odwróconą fazą.

Surowcem preferowanym do otrzymywania ksantohumolu jest masa, pozostająca po pierwotnej, nadkrytycznej ekstrakcji szyszek chmielu [17]. Zastosowanie pozbawionej olejków eterycznych i gorzkich kwasów poekstrakcyjnej masy chmielowej ułatwia procedurę izolowania ksantohumolu.

Jedną z metod wyodrębniania ksantohumolu z odpadowej masy chmielowej jest wtórna nadkrytyczna ekstrakcja za pomocą CO₂. Stosowane w ekstrakcji wtórnej wartości ciśnienia i temperatury są wyższe aniżeli w ekstrakcji pierwotnej i wynoszą: 60-100 MPa i 70-90°C [18,47]. W tych warunkach ksantohumol rozpuszcza się w nadkrytycznym ekstrakcie. Uzyskany ekstrakt zawiera 10-30% ksantohumolu. Ilość ta wzrastała do 40%, gdy pierwotną ekstrakcję szyszek chmielu prowadzono przy ciśnieniu 80 MPa, w temperaturze 80°C, zaś oddzielenie rozpuszczonych w tych warunkach składników żywic chmielu zachodziło przy ciśnieniu 20 MPa, w temperaturze 60°C [48]. Wykorzystanie etanolu jako moderatora wtórnej ekstrakcji szyszek chmielu umożliwia prowadzenie tego procesu w mniej drastycznych warunkach ciśnienia i temperatury [17]. Wydajność procesu ekstrakcji ksantohumolu, zachodzącego przy ciśnieniu 25 MPa, w temperaturze 50°C, przy masowym stosunku etanolu do surowca (poekstrakcyjnej masy chmielowej) 50% i stężeniu etanolu 80%, kształtowała się na poziomie 7,8 mg/g.

Inną, prostą metodą jest ekstrakcja etanolowego wyciągu żywic chmielu z dodatkiem np. diatomitu (ziemia krzemkowa) lub żelu krzemkowego za pomocą nadkrytycznego CO₂ (30 MPa, 50°C) [18,52]. Sucha pozostałość po ekstrakcji w warunkach nadkrytycznych zawiera 80% wypełniacza i 2% ksantohumolu, a także towarzyszące ksantohumolowi żywice twarde oraz chlorofil. Taki produkt można dodawać do gorącej brzeczki piwnej.

Wyodrębnianie ksantohumolu z poekstrakcyjnej masy chmielu jest procesem kilkuetapowym i wymaga stosowania przynajmniej dwóch ekstrahentów: wody

i rozpuszczalnika organicznego. Najczęściej są to mieszaniny wodno-alkoholowe (metanol, etanol) o malejącej polarności, umożliwiające oddzielenie związków rozpuszczalnych w wodzie (soli mineralnych, częściowo polifenoli i cukrów) od niepolarniej frakcji twardych żywic [22]. Dodatkowy etap ekstrakcji za pomocą heksanu eliminuje z tej frakcji resztkowe ilości żywic miękkich. Zawartość ksantohumolu w otrzymanych ekstraktach wynosi 5-20% s.m. Zwiększenie tej zawartości wymaga przeprowadzenia chromatograficznego rozdzielania składników ekstraktów.

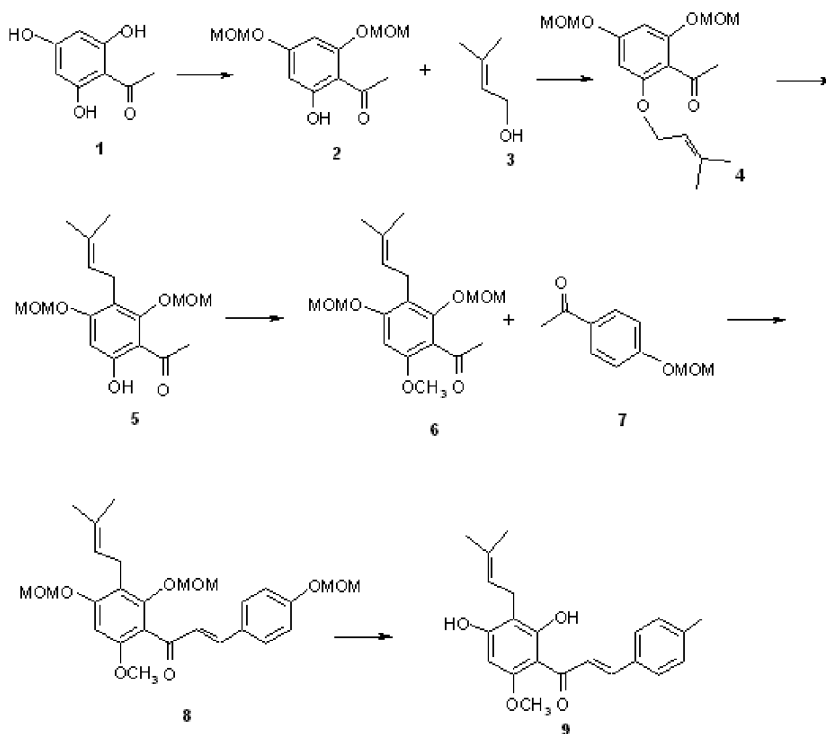
Warunki oczyszczania ekstraktu twardych żywic chmielu metodą HPLC opisała Delmulle [53]. Ekstrakt ten zawierał 12% ksantohumolu i 1,2% demetyloksantohumolu. Rozdział chromatograficzny składników ekstraktu prowadzono dwuetapowo na kolumnach C₁₈. W pierwszym etapie oczyszczania stosowano elucję gradientową za pomocą 95% roztworu metanolu, zawierającego 0,05% kwasu mrówkowego, w drugim elucję izokratyczną za pomocą analogicznego 60% eluentu dla ksantohumolu i 55% dla demetyloksantohumolu. Wykrywanie analitów prowadzono za pomocą detektora UV, przy $\lambda = 370$ nm. Uzyskany preparat ksantohumolu charakteryzował się niemal stuprocentową czystością, co potwierdziły obrazy jego chromatograficznego rozdzielania.

Mała zawartość ksantohumolu w szyszkach chmielu oraz opisane wieloetapowe, kosztowne procedury otrzymywania czystych preparatów ksantohumolu uniemożliwiają ich produkcję w większej skali. Problem ten można rozwiązać zastępując metodę izolowania tego związku z naturalnego surowca metodą syntezy chemicznej.

Khupse i wsp. przedstawili sześćoetapową syntezę ksantohumolu z 2,4',6'-trihydroksyaceto-fenonu (floroaceto-fenonu) (rys. 4) [54]. W pierwszym etapie prowadzono metoksymetylowanie tego związku w celu osłony grup hydroksylowych w pozycjach 4' oraz 6'. Otrzymany w tym etapie 2'-hydroksy-4',6'-dimetoksymetyloaceto-fenon poddawano reakcji Mitsunobu, w której donorem grupy prenylowej był 3-metylo-2-buten-1-ol, zaś produktem prenylowany eter – podstawowy związek pośredni w syntezie ksantohumolu.

Inni autorzy do uzyskania tego produktu wykorzystywali reakcję alkilowania za pomocą bromku 3,3-dimetyloallilowego [55]. Prenylowany eter poddawano w trzecim etapie [3,3] sigmatropowemu przegrupowaniu Claisena w celu przyłączenia grupy prenylowej do pierścienia aryłowego, a następnie metylowaniu wolnej grupy hydroksylowej. W kolejnym etapie uzyskany prenylowany keton poddano reakcji Claisena-Schmidta, polegającej na aldolowej kondensacji z aldehydem 4-hydroksylo-benzoowym, zawierającym zablokowaną grupę hydroksylową, umożliwiającą utworzenie szkieletu chalkonu. W ostatnim etapie usuwano z prenylowanego chalkonu ochronne grupy metoksymetylowe, uzyskując oczekiwany ksantohumul. Sumaryczna wydajność przedstawionego procesu syntezy ksantohumolu, zaproponowanego przez Khupse i wsp., wynosiła 10%. Może to sprawić, że metoda ta będzie bardziej opłacalna od metod „zielonej technologii”.

Vogel i wsp. prowadzili analizę porównawczą antyutleniających i cytotoksycznych aktywności uzyskanych, syntetycznych chalkonów [55,56]. Syntetyczny ksanto-



Rys. 4. Synteza chemiczna ksantohumolu [54-56].

1) 2',4',6'-trihydroksyacetocefenon, 2) 2'-hydroksy-4',6'-dimetoksymetyloacetocefenon, 3) 3-metylo-2-buten-1-ol, 4) 4',6'-dimetoksymetylo-2'-(3-metylo-2-butenyloksy)acetocefenon, 5) 2',4'-dimetoksymetylo-6'-hydroksylo-3'-(3-metylo-2-butenyloksy)acetocefenon, 6) 2',4'-dimetoksymetylo-6'-metoksy-3'-(3-metylo-2-butenyloksy) acetocefenon, 7) aldehyd 4-metoksymetylobenzoesyowy, 8) 2',4',4'-trimetoksymetylo-6'-metoksy-3'-(3-metylo-2-butenyloksy)chalkon, 9) ksantohumul.

humol w stężeniu $IC_{50} = 9,4 \mu M$ hamował proliferację nowotworowych komórek Hela, a w zakresie stężeń 0,1-1 μM wykazywał on aktywność przeciwutleniającą, odpowiadającą 2,3 jednostkom równoważnika Troloxu (TE). Stwierdzono, że przyłączenie dodatkowych grup hydroksylowych do aromatycznego pierścienia ksantohumolu zwiększało jego działanie cytotoksyczne. Wartości IC_{50} , ustalone dla 3-hydroksy-ksantohumolu oraz 2',3,4',5-tetrahydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkonu (nieobecny w przyrodzie) wynosiły odpowiednio 2,5 oraz 3,2 μM . Usunięcie z cząsteczki ksantohumolu grupy prenylowej polepszało jego aktywność cytotoksyczną ($IC_{50} = 5,2 \mu M$). Analogiczny zabieg w przypadku pochodnej ksantohumolu, zawierającej dodatkową grupę hydroksylową (3-hydroksyksantohumul), powodował drastyczny spadek jej cytotoksyczności ($IC_{50} = 14,8 \mu M$). W grupie chemicznie syntetyzowanych chalkonów największymi aktywnościami przeciwutleniającymi charakteryzowały się: 2'-O-metylo-3'-prenyloaryngeninochalkon (5,2 TE; nieobecny w naturze), ksantohumul H (4,8 TE), 4'-metyloksantohumul (4,4 TE) oraz demetyloksantohumul (3,8 TE).

Metody syntezy chemicznej są, jak się wydaje, perspektywiczne. Stwarzają one możliwości otrzymywania z dużą wydajnością modyfikowanych form chalkonów nie tylko o zróżnicowanych aktywnościach biologicznych, ale także o polepszonej rozpuszczalności w środowiskach wodnych, warunkującej większą dostępność tych związków dla konsumentów.

Literatura

1. Zanolì P. Z., Avatti M., (2008), *J. Ethnopharmacol.*, 116, 383-396.
2. Wang G., Tian L., Aziz N., Broun P., Dai X., He J., King A., Zhao P. X., Dixon R. A., (2008), *Plant Physiol.*, 148, 1254-12662.
3. Stevens J. F., Page J. E., (2004), *Phytochemistry*, 65, 1317-1330.
4. Evans P., Halliwell B., (1999), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 884, 19-40.
5. Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H. R., Frank N., Bartsch H., Becker H., (2002), *Mol. Cancer Ther.*, 1, 959-969.
6. Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3876-3884.
7. Rodriguez R. J., Miranda C. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R., (2001), *Food Chem. Toxicol.*, 39, 437-445.
8. Mizobuchi S., Sato Y., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2771-2775.
9. Yamaguchi N., Satoh-Yamaguchi K., Ono M., (2009), *Phytomedicine*, 16, 369-376.
10. Wang Q., Ding Z. H., Liu J. K., Zheng Y. T., (2004), *Antiviral Res.*, 64, 189-194.
11. Gerhäuser C., (2005), *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 827-831.
12. Henderson M. C., Miranda C. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R., (2000), *Xenobiotica*, 30, 235-251.
13. Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y. H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Buhler D. R., (1999), *Food Chem. Toxicol.*, 37, 271-285.
14. <http://oregonstate.edu/dept/ncs/newsarch/2005/Oct05/beerandcancer.htm>
15. Albinì A., Noonan D. M., Ferran N., (2007), *Clin. Cancer Res.*, 13 (15), 4320-4324.
16. Wunderlich S., Zürcher A., Back W., (2005), *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 874-881.
17. Forster A., Köberlein A., (1998), *BRAUWELT*, No. 37, 1677-1681.
18. <http://www.ins.pulawy.pl/PL/index.php/content/view/140/150/>
19. Megalhães P. J., Dostalek P., Gruz J. M., Guido L. F., Barros A. A., (2008), *J. Inst. Bew.*, 114(3), 246-256.
20. Back W., Zürcher A., Wunderlich S., (2008), Patent US20080008776.
21. Forster A., Schulmeyr J., Schmidt R., Simon K., Ketterer M., Forchhammer B., Geyer S., Gehrig M., (2004), Patent US20040121040.
22. Forster A., Ketterer M., Gahr A., (2003/2004), *Hopfenrundschau International*, 65-71.
23. http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Biendl_ChairDeClerck.pdf
24. <http://www.functionalfoodnet.eu/images/site/assets/Wunderlich.pdf>
25. Gerhäuser C., (2005), *Eur. J. Cancer*, 41, 1941-1954.
26. Eri S., Khoo B. K., Lech J., Hartman T. G., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1140-1149.
27. de Keukeleire J., Ooms G., Heyerick A., Roldan-Ruiz I., van Bockstaele E., de Keukeleire D., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4436-4441.
28. Verzele M., de Keukeleire D., (1991), *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*, Elsevier, Amsterdam, 88-126.
29. Stevens J. F., Taylor A. W., Deinzer M. L., (1999), *J. Chromatogr. A*, 832, 97-107.
30. Harborne J. B. (Ed.), *The flavonoids. Advances in research since 1986*, Chapman & Hall/CRC, London, New York, 1994, 120-121.

31. Stevens J. F., Taylor A. W., Clawson J. E., Deinzer M. L., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2421-2428.
32. Stevens J. F., Taylor A. W., Nickerson G. B., Ivancic M., Henning J., Haunold A., Deinzer M. L., (2000), *Phytochemistry*, 53, 759-775.
33. Krofta K., (2005), Soderzaniye ksantohumola w czeskich sortach hmiela, <http://www.propivo.ru/sens/01/40.html>
34. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R., (2006), *Phytomedicine*, 13, 119-131.
35. Hänsel R., Schulz J., (1988), *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 321, 37-40.
36. Nagel J., Culley L. K., Lu Y., Liu E., Matthews P. D., Stevens J. F., Page J. E., (2008), *Plant Cell*, 20, 186-200.
37. Lichtenthaler H. K., (1999), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 47-65.
38. Miranda C. L., Aponso G. L., Stevens J. F., Deinzer M. L., Buhler D. R., (2000), *Cancer Lett.*, 149, 21-29.
39. Dietz B. M., Kang Y. H., Liu G. W., Eggle A. L., Yao P., Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R., Mesecar A. D., van Breemen R. B., Bolton J. L., (2005), *Chem. Res. Toxicol.*, 18, 1296-1305.
40. Tokalov S., Henker Y., Schwab P., Metz P., Gutzeit H. O., (2004), *Pharmacology*, 71, 46-56.
41. Li X. N., Sha N., Yan H. X., Pang X. Y., Guan S. H., Yang M., Hua H. M., Wu L. J., Guo D. A., (2008), *Phytochem. Lett.*, 1(3), 163-167.
42. Zhao F., Watanabe Y., Nozawa H., Daikonnya A., Kondo K., Kitanaka S., (2005), *J. Nat. Prod.*, 68, 43-49.
43. Cho Y. Ch., Kim H. J., Lee K. Y., Choi H. J., Lee I. S., Kang B. Y., (2008), *Int. Immunopharmacol.*, 8, 567-573.
44. Monteiro R., Faria A., Azevedo I., Calhau C., (2007), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 124-130.
45. Pan L., Becker H., Gerhäuser C., (2005), *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 837-843.
46. Lust S., Vanhoecke B., Janssens A., Philippe J., Offner F., (2005), *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 844-850.
47. Colgare E., Miranda C. L., Stevens J. F., Bray T. M., Ho E., (2007), *Cancer Lett.*, 246, 201-209.
48. Delmulle L., Bellahcenè A., Dhooge W., Comhaire F., Roelens F., Huvaere K., Heyerick A., Castromano V., de Keukeleire D., (2006), *Phytomedicine*, 13, 732-734.
49. Kuhrts E. H., (2006), Patent No. US7144590.
50. Zhao F., Nozawa H., Daikonnya A., Kitanaka S., (2003), *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 61-65.
51. Bertl E., Becker H., Eicher T., Herhaus C., Kapadia G., Bartsch H., Gerhäuser C., (2004), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 287-295.
52. Albinì A., Dell'Eva R., Vené R., Ferran N., Buhler D. R., Noonan D. M., Fassina G., (2006), *FASEB J.*, 20(3), 527-529.
53. Delmulle L., (2007), Bioactivities of hop-derived prenylflavonoids in relation to prostate cancer. Dissertation, pp 59-60. [<http://hdl.handle.net/1854/11652>]
54. Khupse R. S., Erhardt P., (2007), *J. Nat. Prod.*, 70, 1507-1509.
55. Vogel S., Ohmayer S., Brunner G., Heilmann J., (2008), *J. Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4286-4293.
56. Vogel S., Heilmann J., (2008), *J. Nat. Prod.*, 71 (7), 1237-1240.