

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY S.R.O.

RADANAL s.r.o.

**METODIKA STANOVENÍ HLAVNÍCH FENOLICKÝCH
SLOUČENIN V GENOTYPECH JABLONÍ S OHLEDEM NA
RŮZNÉ PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ**

Aneta Bílková a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2018



©VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY S.R.O.

Autorský kolektiv:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
RNDr. Aneta Bílková, Ing. Radek Vávra, Ph.D.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, Katedra analytické chemie
Mgr. Marcela Hollá, doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D., PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

RADANAL s.r.o

Bc. Radka Dvořáková, doc. Ing. Aleš Horna CSc., Bc. Eliška Eichlerová

Název: Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Hořice

Vydáno v roce 2018

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: Aneta.Bilkova@vsuo.cz

Foto: Ing. Radek Vávra Ph.D., RNDr. Aneta Bílková

Oponenti:

Odborný oponent z oboru: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.,

Oponent ze státní správy: Ing. Jitka Mašková, MZe ČR

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum a je výstupem řešení projektu QJ1510354 - „Tvorba a selekce odrůd jabloní s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a prodlouženou skladovatelností plodů“. Při zpracování metodiky byla rovněž využita infrastruktura projektu LO1608.

Ministerstvo zemědělství ČR schválilo publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučilo ji pro využití v zemědělské praxi.

©VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2018
ISBN 978-80-87030-68-4

ANOTACE

Metodika je určena pěstitelům jabloní, skladovatelům ovoce a obchodníkům. Zahrnuje podrobné informace o obsahu fenolických látek v jablkách, přípravě vzorků pro chemické analýzy a vlastní popis analýz. Popsány jsou podmínky skladování, ztráty v obsahu bioaktivních látek v průběhu skladování v rozdílných skladovacích podmínkách. Doporučeny jsou odrůdy s minimálními ztrátami obsahu fenolických látek po pěti měsících skladování a nejmenšími ztrátami v průběhu skladování. Metodika je doplněna o poznatky související s metodami analýz bioaktivních látek v jablkách a snížení ztrát při skladování ovoce vyplývající z literární rešerše a z poznatků získaných v průběhu řešení projektu NAZV QJ1510354.

ANNOTATION

The described methodology is intended for application of apple growers, fruit storers and traders. It includes detailed information about the phenolic content of selected substances in apples, preparation of samples for analysis, and description of analyzes including all steps. Storage conditions and losses in the content of bioactive compounds during storage under different storage conditions are described. Cultivars with minimal losses after five months of storage and with the lower loss during the whole storage are recommended. The methodology is supplemented with knowledge related to the methods of analysis of bioactive substances in apples and reduction of losses during fruit storage resulting from literature research and from the knowledge gained during the project NAZV - QJ1510354.

Obsah

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.	1
METODIKA STANOVENÍ HLAVNÍCH FENOLICKÝCH SLOUČENIN V GENOTYPECH JABLONÍ S OHLEDEM NA RŮZNÉ PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ.....	1
©VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.	1
ANOTACE.....	3
Annotation.....	3
1 Úvod.....	6
2 Cíl metodiky.....	7
3 Vlastní popis metodiky.....	8
3.1 Fenolické látky	8
3.1.1 Funkce fenolických látek.....	9
3.2 Fenolické látky v ovoci.....	9
3.2.1 Jednotlivé fenolické látky.....	10
3.3 Metody pro analýzu a identifikaci fenolických látek	15
3.3.1 Stanovení fenolických sloučenin.....	15
3.3.2 Koncentrace fenolických sloučenin.....	18
3.3.3 Analyzované vzorky.....	18
3.3.4 Chemikálie a činidla.....	19
3.3.5 Příprava vzorků	20
3.3.6 HPLC systém.....	20
3.3.7 Podmínky skladování	20
3.4 Komentář k získaným výsledkům	21
3.4.1 Analýza čerstvých plodů jabloní a stanovení obsahu polyfenolů	21
3.4.2 Stanovení fenolického profilu skladovaných plodů jabloní.....	23
3.4.3 Vliv doby skladování a podmínek na obsah fenolických látek	28

3.4.4	Celkový souhrn získaných výsledků	34
4	Závěr.....	34
5	Srovnání novosti postupů	36
6	Popis uplatnění metodiky	37
7	Ekonomické aspekty	38
8	Seznam použité literatury	39
9	Fotodokumentace	42

1 ÚVOD

Jablka jsou bohatá na vlákninu a jablečný pektin, které příznivě povzbuzují střevní peristaltiku, dále obsahují jednoduché cukry (především fruktózu a v menší míře glukózu a sacharózu), které napomáhají udržovat stabilní hladinu krevního cukru. Mezi další důležité látky patří bílkoviny a lipidy zastoupené zvláště ve slupce. Neméně důležité je zastoupení minerálních látek, zejména draslíku. Ve stopových množstvích se zde vyskytuje i vápník, fosfor, železo, měď, mangan, zinek a selen, které jsou důležité pro látkovou výměnu, funkci enzymatických systémů a ochranu buněk. V jablkách jsou přítomny také vitamíny skupiny B a látky s antioxidační aktivitou jako je vitamin C, skupina fenolických a karotenoidních látek, které se podílí na ochraně organismu před poškozením způsobeným účinkou oxidačního stresu [1-4].

Antioxidanty jsou definovány jako látky, které při působení v nízkých koncentracích chrání potraviny před oxidací (žluknutí tuků a oxidace aromatických látek) a zpomalují oxidaci ostatních látek (obsažených např. v tkáních). Antioxidanty můžeme nacházet prakticky ve všech rostlinných materiálech (plody, listy, kořeny rostlin). Pokud se daná část rostliny zpracuje na potravinu, antioxidanty přecházejí i do ní. Tak je můžeme nalézt v džusech, olejích, šťávách a dřeních. Zůstávají zachovány i v alkoholických nápojích, které prošly kvasným procesem. Některé antioxidanty mají schopnost ovlivňovat organoleptické vlastnosti potravin. Mají vliv na barvu, vůni nebo chuť, pozitivně ovlivňují trvanlivost potravin.

V poslední době se začíná obsahu antioxidantů v potravinách věnovat zvýšená pozornost. Jednak z důvodu prodloužení trvanlivosti potravin a hlavně z důvodu jejich prokazatelného pozitivního působení na lidský organismus. Trendem je tedy identifikovat antioxidanty v potravinách, a to i ve složitých maticích.

2 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je identifikace a stanovení jednotlivých skupin antioxidačních látek v genotypech jabloní zahrnující rozsáhlou kolekci perspektivních novošlechtění a dalších častých odrůd. Dále vyvinout jednoduché a rychlé separace umožňující analýzu velkého počtu vzorků s použitím rychlé HPLC metody a jednoduchého DAD detektoru. Následně provést stanovení vybraných sedmi fenolických sloučenin, vybrány jsou kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, kvercitrin, rutin, floridzin a floretin v jablečných extraktech pomocí HPLC s detekcí DAD. Fenolické sloučeniny byly vybrány podle předběžných výsledků HPLC stanovení získaných extraktů z jablečné slupky a dužniny za použití methanolu, acetonitrilu a vody, všechny s přidavkem 0,1% kyseliny octové pro stabilizaci fenolických sloučenin. Zároveň cílem metodiky je monitoring vlivu skladování a zpracování jablek na obsah a změny obsahu antioxidačních látek v čerstvých plodech a v produktech vyrobených z jablek. Byly porovnány podmínky skladování a zpracování ovoce z hlediska uchování vysokého obsahu antioxidantů.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Fenolické látky

Fenolické látky patří mezi organické sloučeniny. Termín "fenolický" může být definován chemicky jako látka, která má jeden nebo více aromatických kruhů nesoucích jeden nebo více hydroxylových substituentů, včetně jejich funkčních derivátů (estery, methyletery, glykosidy atd.). Většina rostlinných fenolických látek má dvě nebo více hydroxylových skupin a jsou řazeny mezi bioaktivní látky. Výskyt hydroxylových skupin má vliv na polaritu látek a rozpustnost ve vodě (jednosytné a vícesytné fenoly s krátkým postranním řetězcem jsou dobře rozpustné ve vodě). V porovnání s alkoholy jsou fenoly látky stabilnější a kyselější [5, 6].

Tyto sloučeniny hrají důležitou roli v růstu a reprodukci a poskytují ochranu proti patogenům. Fenolické sloučeniny vykazují širokou škálu fyziologických vlastností, mají antialergenní, anti-aterogenní, protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační, antitrombotické, kardioprotektivní, antimutagenní, antikarcinogenní a vazodilatační účinky. Prospěšné účinky odvozené z fenolických sloučenin byly přičítány jejich antioxidační aktivitě. Fenolické sloučeniny jsou molekuly biosyntetizované šikimátovou cestou, polyacetátovou (malonovou) dráhou nebo směsnou dráhou (šikimát-polyacetát). Tvoří tedy deriváty pentofosfátu, šikimátu, a fenylypropanoidních drah v rostlinách, jedná se proto o sekundární metabolity. Tyto sekundární metabolity rostlin jsou obecně zapojeny také do obrany proti ultrafialovému záření [7, 8, 9].

V přírodě se vyskytuje více než 8000 fenolických sloučenin. Fenolické sloučeniny jsou klasifikovány na základě obsahu různého počtu aromatických kruhů, s různým stupněm glykosylace, hydroxylace, methylace apod. [7, 9, 10]. Vzhledem k jejich široké a relativně vysoké koncentraci v rostlinách jsou společnou součástí lidské stravy. V současné době roste zájem o tyto přírodní látky, neboť jejich příjem jako potravin je spojen se snížením výskytu závažných onemocnění, jako je rakovina a kardiovaskulární onemocnění.

Tabulka 1 Dělení fenolických látek [9]

Fenolické látky						
Fenolické kyseliny	Flavonoidy			Lignany	Taniny	Stilbeny
Deriváty kyseliny skořicové a benzoové	Anthokyaniny	Flavonoly	Katechiny		Hydrolyzované a kondenzované	

3.1.1 Funkce fenolických látek

Jedná se o přírodní látky s antioxidační aktivitou, které zabraňují a omezují působení volných radikálů. Antioxidanty jsou látky, které umožňují zachycení volných kyslíkových radikálů, které vznikají během metabolismu, pomáhají zabránit oxidaci tuků, jejíž produkty mohou později poškodit buněčné membrány. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin závisí na struktuře, a to zejména na počtu a poloze hydroxylových skupin a také na druhu substituce. Při nedostatku antioxidačních látek a jejich účinků může docházet k poškození buněk. K některým druhům potravin jsou záměrně přidávány tyto fenolické látky, které prodlužují stabilitu.

Rostlinné fenolické látky obsažené v plodech i ovocných šťávách dodávají produktům charakteristické organoleptické vlastnosti (chuť, vůně, barva). Na chuti se podílejí nejčastěji flavanony, katechiny a taniny, jsou významné především svojí hořkou chutí. Anthokyaniny a anthoxanthiny dávají rostlinným produktům jejich charakteristickou barvu, čím více těchto látek obsahují, tím je jejich barva sytější. Anthokyaniny vytváří spíše červeno-modré zbarvení, zatímco anthoxanthiny žluté. Fenolické sloučeniny hrají důležitou roli v růstu a rozmnožování rostlin, poskytují jim ochranu proti patogenům a predátorům.

3.2 Fenolické látky v ovoci

Ovoce je bohaté na fenolické sloučeniny, jejichž struktura je velmi variabilní a pohybuje se od jednoduchých fenolických molekul až po vysoce polymerizované sloučeniny (kondenzované taniny – MW > 1000) [11].

Fenolické látky tvoří nedílnou součást skupiny antioxidantů, které mají velký vliv na lidské zdraví a které člověk přijímá potravou. Interakce mezi fenolickými sloučeninami

(zejména proanthokyanidiny) a glykoproteiny ve slinách přispívají k hořké a trpké chuti ovoce a ovocných šťáv [5, 8, 11].

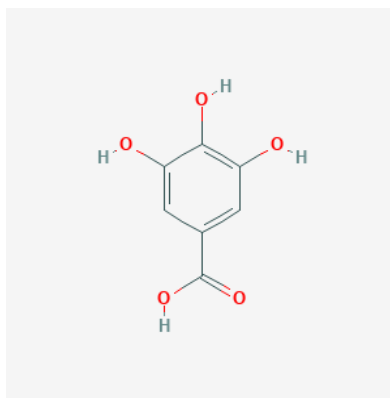
Mezi hlavní třídy fenolických sloučenin hojně se nacházejících v ovoci patří fenolické kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy a taniny nebo proanthokyanidiny. Nejčastěji se ve stravě z fenolických látek vyskytují fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové) a flavonoidy, které představují 30 - 60% z celkového obsahu fenolických sloučenin v potravinách. Tyto fenolické sloučeniny mohou být spojeny s různými sacharidy, organickými kyselinami a navzájem mezi sebou. V ovoci může docházet k enzymatickému hnědnutí, jedná se o nechtěnou reakci fenolických látek katalyzovanou polyfenoloxidázou, která způsobuje změnu barvy a chuti a ztrátu živin [5, 11, 12].

3.2.1 Jednotlivé fenolické látky

Kyselina gallová

Kyselina gallová je bezbarvá nebo světle žlutá, krystalická organická kyselina patřící mezi fenolické kyseliny, také známá jako kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová. Kyselina gallová se nachází v řadě rostlin např. ve víně, ořechách, dubové kůře a dalších. Nachází se jak volně, tak jako součást tříslovin. Obvykle se používá ve farmaceutickém průmyslu. Využívá se také k syntéze halucinogenního alkaloidu meskalinu, známého také jako 3,4,5-trimethoxyfenethylamin. Soli a estery kyseliny gallové jsou nazývány galáty [13, 14, 15].

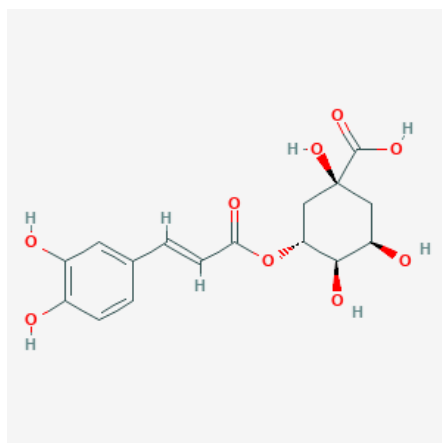
Kyselina gallová prokazuje antioxidační aktivitu tím, že odstraňuje 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl a volné radikály hydroxylů a inhibuje mikrosomální peroxidaci lipidů. Používá se často jako standard pro stanovení obsahu fenolu v různých vzorcích, např. zkouškou Folin-Ciocalteu (spektrofotometrické stanovení) [15].



Obrázek 1 *Strukturní vzorec kyseliny gallové* [13]

Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová patří mezi fenolické kyseliny, je tvořena esterifikací skořicových kyselin, jako jsou kyseliny kávová a kyselina chinová. Kyselina chlorogenová se ve velkém množství vyskytuje v kávě. Tato sloučenina, dlouho známá jako antioxidant, také zpomaluje uvolňování glukózy do krevního oběhu po jídle (zvyšuje aktivitu inzulínu). V souvislosti s její konzumací byla v posledních několika letech spojena řada zdravotních přínosů, jako je snížení rizika diabetes typu 2 a Alzheimerovy choroby [13, 16]. Několik studií prokázalo, že kyselina chlorogenová je hlavní fenolická sloučenina u jablek a její koncentrace rychle roste v prvotní fázi dozrávání tohoto druhu ovoce [13]. Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny chlorogenové souvisí s obsahem kyseliny askorbové v ovoci. Její pokles byl způsoben, podobně jako u askorbátu, postupnými negativními změnami u jablek spojených s dlouhodobým skladováním; může být postupně degradována nebo dokonce vyčerpána kvůli mobilizaci enzymatického antioxidantního systému.

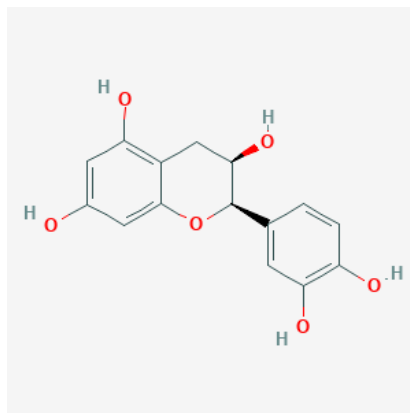


Obrázek 2 *Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [13]*

Epikatechin

Epikatechin patří do skupiny flavanolů, která je součástí chemické rodiny flavonoidů. Vyskytuje se zejména u dřevinných rostlin. V rostlinném světě je k dispozici několik tisíc typů. Na uhlících 2 a 3 se nacházejí centra chiralit. Proto existují čtyři diastereoizomery. Dva z izomerů jsou v konfiguraci trans a jsou nazývány katechiny a další dva jsou v konfiguraci cis a jsou nazývány epikatechiny. Katechin je silný, ve vodě rozpustný polyfenol a antioxidant, který se snadno oxiduje. Je to tanin charakteristický pro zelené a bílé čaje, u černých čajů bývá obsah katechinů snížený procesem oxidace. Zelený čaj je vyroben z čerstvých,

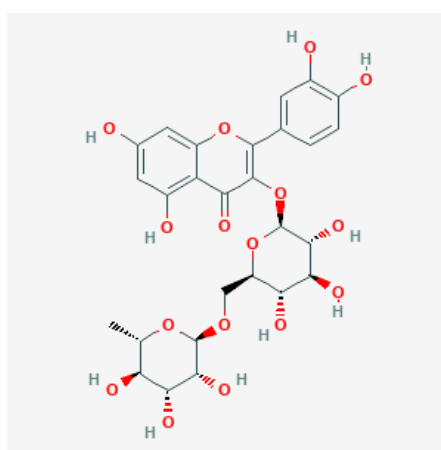
nefermentovaných čajových listů, oxidace katechinů je minimální, a proto jsou schopny sloužit jako antioxidanty. Vědci se domnívají, že katechin je účinný, protože snadno interaguje s bílkovinami, tím chrání buněčnou stěnu před jejím narušením bakteriemi, viry apod. [13].



Obrázek 3 *Strukturní vzorec (-)-epikatechinu [13]*

Rutin

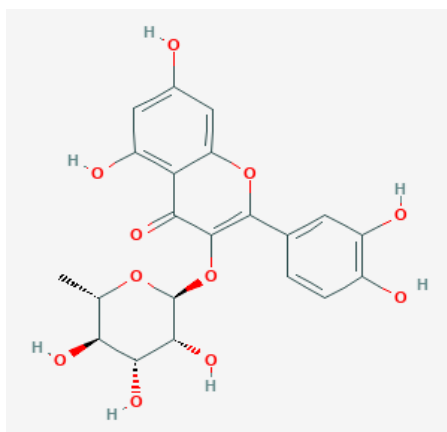
Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je bledě žlutý prášek, je řazen mezi bioaktivní flavonoidy. Je o něm známo, že má řadu biologických aktivit. Vyskytuje se v mnoha rostlinách, včetně pohanky a tabáku, je také složkou červeného vína. Rutin má velký význam jako potenciálně užitečné terapeutické léčivo sloužící k inhibici volných radikálů. Navíc rutin zlepšuje odolnost a propustnost kapilárních cév. Použití rutinu je relativně omezené, kvůli jeho nízké rozpustnosti ve vodě (0,125 g/l) [13, 17].



Obrázek 4 *Strukturní vzorec rutinu [13]*

Kvercitrin

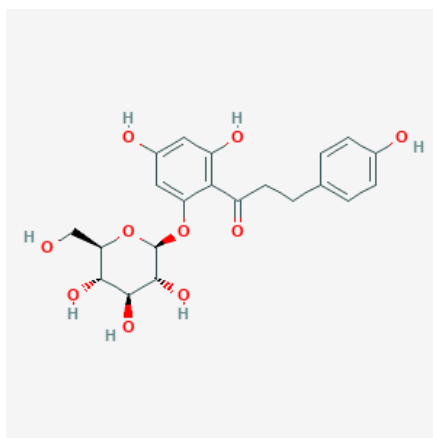
Kvercitrin (kvercetin-3-rhamnosid) je žlutá, pevná látka známá jako bio-flavonoidní antioxidant. Kvercitrin se nachází u řady rostlin jako jsou cibule, jahody, jablka, zelený čaj, červené víno, dub, třezalka atd. Používá se jako textilní barvivo a pro podporu léčby řady nemocí, například diabetu, šedého zákalu, pro léčbu kardiovaskulárních chorob srdce a krevních cév, schizofrenie, senné rýmy, pro prevenci rakoviny apod. Kvercitrin je O-glykosid kvercetinu, který je substituovaný alfa-L-rhamnosylovou skupinou v poloze 3 přes glykosidickou vazbu [15, 18].



Obrázek 5 Strukturní vzorec kvercitrinu [13]

Floridzin

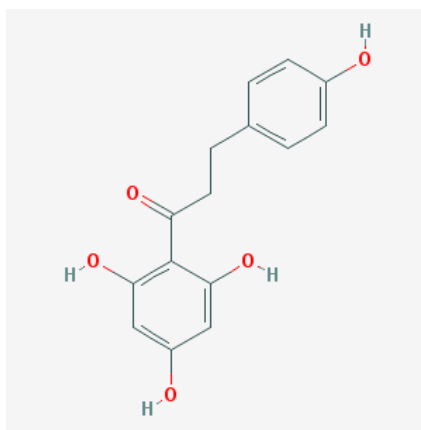
Floridzin je glykosid floretinu (floreitin-2'- β -D-glykosid), patří do podskupiny dihydrochalkonů. Je obsažen v některých rostlinách. Patří do skupiny flavonoidů. Cukernou složku zde zastupuje β -D-glukopyranosa. Je kompetitivním inhibítoem ledvinového transportu glukózy [13, 19].



Obrázek 6 Strukturní vzorec floridzinu [13]

Floretin

Floretin je dihydrochalkon, typ přírodních fenolů. Jedná se o krystalickou, pevnou, bílou látku, o které se uvádí, že podporuje účinnou antioxidační aktivitu při zachytávání peroxynitritu a inhibici peroxidace lipidů. Bylo zjištěno, že floretin, který je přítomen v jablkách, hruškách a rajčatech, inhibuje růst několika typů rakovinných buněk a indukuje apoptózu buněk lidské leukemie a melanomu. Floretin je biomarker pro konzumaci jablek. Inhibuje transport glukózy (antidiabetický účinek). Také inhibuje proteinkinázu C a bylo prokázáno, že inhibuje vstup obalených virů do lidských fibroblastů [13, 15, 20].



Obrázek 7 *Strukturní vzorec floretinu* [13]

Tabulka 2 *Přehled parametrů jednotlivých fenolických látek*

	Sumární vzorec	MW (g/mol)	Log P	pKa	Zdroj
Kys. gallová	$C_7H_6O_5$	170,120	0,72	3,94	[13]
Kys. chlorogenová	$C_{16}H_{18}O_9$	354,311	0,17	3,33	[16, 21]
Epikatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290,271	1,02	9,00	[20]
Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610,521	0,15	6,43	[22]
Kvercitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	466,395	1,31	6,43	[22]
Floridzin	$C_{21}H_{24}O_{10}$	472,443	0,44	7,89	[22]
Floretin	$C_{15}H_{14}O_5$	274,269	2,23	8,00	[21]

3.3 Metody pro analýzu a identifikaci fenolických látek

Fenolické látky vykazují redukční vlastnosti, proto jsou metody pro celkové stanovení těchto látek postaveny na oxidačně-redukčních vlastnostech. V případě stanovení jednotlivých fenolických látek se v dnešní době nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s detekcí různých typů, jako UV-VIS detekce, detekce s diodovým polem (DAD) a hmotnostní detekce (MS). Mezi starší metody se řadí papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC), které se dají využít jako orientační. V menší míře jsou pro stanovení fenolických látek využívány kapilární plynová chromatografie (CGC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE). V posledních letech se do popředí stále více dostává hmotnostní spektrometrie (MS), která je jako detekční technika vhodná pro identifikaci a objasnění struktury těchto látek [8, 9].

3.3.1 Stanovení fenolických sloučenin

Řadu studií popisujících obsah a výskyt fenolických látek v jablkách, hruškách, meruňkách a rajčatech lze nalézt v literatuře. Stacionární fáze používané v těchto separacích jsou nejčastěji C18 a trend v použití kratších kolon s menším průměrem částic je také možno zaznamenat. Bývá využita gradientová eluce k oddělení vybraných analytů ve formě aglykonů nebo glykosidů, které se liší různou lipofilitou. Gradientová eluce typicky začíná vysokým procentem vodné složky vždy okyselené na pH 2,5–2,8 za použití kyseliny mravenčí, octové nebo kyseliny fosforečné. Jako organická složka mobilní fáze je v některých případech použit acetonitril a/nebo methanol. Čas analýzy odpovídá počtům oddělených analytů a délka analýzy se pohybuje od 20 do 85 minut. Detektory používané pro tyto analýzy jsou diodové spektrofotometry (detekce diodového pole [DAD]) a MS.

Tabulka 3 Využití kapalinové chromatografie s DAD a MS detekcí a přehled podmínek separace fenolických látek v ovoci a zelenině v předešlých studiích

Stanovované látky	Typ vzorku	Použitá kolona	Mobilní fáze	Délka analýzy (min)	Detektor	Citace
katechin, kyselina chlorogenová, procyanidin B ₂ , kyselina p - kumaroylchinová, epikatechin, feruloylglukoza, p- kumaroylglukoza, hyperin, isokvercitrin, rutin, avicularin, floridzin, kvercitrin	jablka	Nova-Pac C18 (30 x 3,9 mm)	H ₂ O + CH ₃ COOH, H ₂ O + ACN + CH ₃ COOH	80	DAD	[23]
kyselina chlorogenová, kyselina ferulová, kyselina p- kumarová, kyselina kávová, kyselina skořicová, kvercetin, rutin, floridzin, floretin	jablka	Luna-C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	H ₂ O + CH ₃ COOH, methanol	40	DAD	[24]
kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina p - kumarová, kyselina ferulová, kyselina benzoová, katechin, rutin, naringin, hesperidin, myricetin, kvercetin, luteolin, naringenin, genistein, kaemferol	rajčata	Kinetex XB-C18 (150 x 4,6 mm x 2,6 μm)	0,1% HCOOH + H ₂ O, 0,1% HCOOH + methanol ACN	20	DAD	[25]
kyselina gallová, katechin, kyselina 4 - hydroxybenzoová, kyselina kávová, kyselina syringová, vanilin, kyselina ferulová, floroglucinol, kyselina benzoová, kyselina salicylová, floridzin, kvercetin, floretin, kyselina skořicová	jablka	Acclaim 120, C18 (150 x 3,0 mm x 3 μm)	ACN, H ₂ O + CH ₃ COOH pH 2,6	30	DAD	[26]
procyanidin B ₁ , procyanidin B ₂ , katechin, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, epikatechin, rutin, glykosidy kvercetinu, xyloglukosid floretinu, floridzin	jablka, hrušky	Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	0,01 M kyselina fosforečná, ACN	25	DAD	[27]

arbutin, kyselina gallová, 5 - hydroxymethylfurfural, procyanidin B ₁ , kyselina 4 - hydroxybenzoová, katechin, kyselina chlorogenová, procyanidin B ₂ , kyselina kávová, kyselina syringová, epikatechin, kyselina p - kumarová, kyselina ferulová, kyselina sinapová, floridzin, floretin, kvercetin, kyselina skořicová	jablka, hrušky	Aqua C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm) + předkolona C18 ODS (4 x 3,0 mm)	H ₂ O + 2% CH ₃ COOH, H ₂ O + 0,5% CH ₃ COOH + ACN	60	MS	[28]
--	-------------------	---	--	----	----	------

3.3.2 Koncentrace fenolických sloučenin

Dříve publikované studie ukázaly, že koncentrace fenolických sloučenin během dozrávání klesají a zůstávají relativně konstantní během skladování v chladu. Při dlouhodobém skladování v chladu a během dalších 7 dnů skladování ovoce při 16 °C se celková antioxidační aktivita (TAA) výrazně zvyšuje bez ohledu na podmínky skladování [12]. Skladování v řízené atmosféře snižuje ztrátu chlorofylu, karotenoidů, antokyanů a fenolických sloučenin. Udržuje kvalitu ovoce a poskytuje spotřebitelům čerstvé ovoce a tím udržuje vysokou úroveň přínosů pro lidské zdraví.

Výskyt bioaktivních fenolických látek v rostlinách, ovoci a zelenině byl dlouhodobě studován. V současné době jsou fenolické látky jako potenciální antioxidanty spojeny se snížením výskytu civilizačních onemocnění. Proto je jejich konzumace doporučována, aby se předešlo nežádoucím zdravotním problémům.

3.3.3 Analyzované vzorky

Obsah jednotlivých fenolických látek byl testován u 9 vybraných odrůd jablek - 'Rucla', UEB 32 642, 'Lady Silvia', 'Golden Delicious', 'Meteor', 'Fragrance', 'Angold', 'Gala' a 'Rubín'. Plody těchto vybraných odrůd pocházely z experimentální výsadby Holovousy s.r.o. a byly sklizeny v termínu optimální zralosti. Hladiny fenolických látek byly testovány v původním rostlinném materiálu a dále po 3, 5 a 7 měsících skladování při různých podmínkách (v chladu a za nízkého přístupu kyslíku – ULO skladování).

Tabulka 4 Testované odrůdy jablek

Odrůda	Popis
Angold	Zrání - druhá polovina září nebo začátkem října Skladování – sklep (od listopadu do března), v chladírně (do června i déle) Plody - velké (190 - 260 g) Dužnina - krémová, chruplavá a velmi šťavnatá Chuť - harmonická, navinule sladká až sladká
Fragrance	Zrání - ve stejnou dobu jako odrůda 'Golden Delicious' Skladování – v chladu až do jarních měsíců Plody - střední až nadprůměrné velikosti Dužnina - krémová, jemná, pevná, středně šťavnatá, příjemně aromatická Chuť – sladká, výborná
Gala	Zrání - sklizňová zralost koncem září nebo začátkem října Plody - souměrné, kuželovité až soudkovité, slupka slabě mastná, hladká nebo slabě síťovitě rzivá, základní barva zpočátku nažloutlá, později sytější žlutá, krycí barva je žíhaná, jasně červená Dužnina – žlutavá, pevná, chruplavá a přiměřeně šťavnatá Chuť - sladší, mírně aromatická, velmi dobrá
Golden Delicious	Zrání - v teplých oblastech koncem září, střední polohy až v druhé polovině října Skladování - vydrží do března až dubna Plody - středně velké (od 115 do 195 g) Dužnina - žlutavá, pevná, velmi jemná, šťavnatá Chuť - navinule sladká, příjemně aromatická, při dobrém vyzrání plodů výborná

Lady Silvia	Zrání - sklizeň na konci září Skladování - do března, v chladničce déle Plody - střední až velké (140 – 175 g), vejčité až kuželovité, základní barva zelenavě žlutá, krycí barva červená (až 90 % povrchu) Dužnina - krémová, jemná, velice pevná a šťavnatá Chut' - navinule sladká, příjemně aromatická, výborná
Meteor	Zrání - přelom září a říjen Plody - velké (200 - 250 g), atraktivní s vysokým obsahem cukru a kyselin Dužnina - krémově žlutá, jemná, středně pevná, chruplavá a šťavnatá Chut' - navinule sladká, výborná
UEB 32 642	Zrání - sklízí se v září, dozrává v listopadu (zimní odrůda) Skladování - do dubna Plody - kulovité až podlouhlý, střední, slupka hladká, žlutozelené zbarvení je překryté červenou barvou s žíháním Dužnina - nažloutlá Chut' - sladce navinulá až sladká, velmi dobrá
Rubín	Zrání - koncem října, sklízí se v září Plody – kulaté, relativně velké, s červeným žíháním na žlutém základě Dužnina – aromatická, šťavnatá
Rucla	Zrání - 1 týden před odrůdou 'Golden Delicious' Skladování – chladárna (do května) Plody - středně velké, zelenavě žluté, s purpurovou až hnědo purpurovou krycí barvou Dužnina - krémová, jemná, chruplavá, dostatečně pevná a šťavnatá Chut' - harmonická, navinule sladká, příjemně aromatická, výborná

3.3.4 Chemikálie a činidla

Standardy fenolových sloučenin: katechin hydrát (> 96%, Fluka), epikatechin (> 90%, BioChemika), floretin (> 99%), dihydrát floridzinu (> 99%), kvercetin hydrát (> 99%), kyselina ferulová (99%), kyselina gallová (99%), kyselina chlorogenová (> 95%), kyselina kávová (97%), kyselina kumarová (> 98%), myricetin (> 95%, BioChemika), prokyanidin B2 (> 90%) a rutin hydrát (95%) byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich, Praha. Kyselina octová (99%), acetonitril (gradient HPLC), methanol (gradient HPLC) byly také dodány společností Sigma Aldrich.

Použité standardní roztoky pro optimalizaci separace byly připraveny rozpuštěním sloučenin v methanolu při konečné koncentraci 0,1 mg/ml. Pracovní standardní roztoky se pak ředily methanolem na koncentraci 1,0 mg/ml. Standardní směsi roztoků obsahujících vybrané analyty byly připraveny stejným způsobem a na stejné koncentrační úrovni. Všechny standardní zásobní roztoky a extrakty vzorků byly uloženy při T= 4°C.

Validace metody byla prováděna pro separaci standardů vybraných analytů a koncentrace testovaných látek byly upraveny tak, aby odpovídaly reálnému profilu fenolických sloučenin ve vybraných odrůdách jablek. Následující chemikálie byly použity pro přípravu extrakčních rozpouštědel: acetonitril HPLC (99%), kyselina mravenčí (98%), kyselina fosforečná (85%) a ultračistá voda získaná z MilliPore MilliQ systému.

3.3.5 Příprava vzorků

Vzorek pro chemickou analýzu fenolických látek byl složen z 10-15 jablek a byl odebrán z různých míst 5 označených stromů. Celé plody byly homogenizovány pomocí ručního mixéru. Část homogenátu byla přenesena do 50 ml centrifugační zkumavky. Takto připravené vzorky byly uchovávány v mrazáku při $T = -20^{\circ}\text{C}$ pro následnou analýzu. Na analytických váhách bylo naváženo potřebné množství homogenátu (3 g), následně bylo ke vzorku přidáno 15 ml extrakčního roztoku - 100% methanol s 0,1% kyselinou octovou (kyselina octová pro stabilizaci) a vzorek byl umístěn do ultrazvukové lázně po dobu 10 minut. Po centrifugaci po dobu 10 minut při 4400 G byl supernatant přefiltrován přes 0,45 μm PTFE filtr a uložen při teplotě $T = 4^{\circ}\text{C}$ až do analýzy.

3.3.6 HPLC systém

Pro stanovení analytů byl použit systém HPLC Shimadzu LC-10 obsahující LC-10AD, termostat CTO-10A, autosampler SIL-HT a detektor DAD SPD-M10A ovládaný LC, vyhodnocovací software LabSolutions byl použit v průběhu celé studie (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Na základě rešerše obsahu látek v jablcích byly vybrány standardy pro identifikaci hlavních obsahových látek. Po analýze reálných vzorků bylo vybráno celkem pět hlavních obsahových látek. Pro separaci byla využita na základě výsledků optimalizace separace v systému HPLC pro toto stanovení kolona Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) od firmy Phenomenex (Torrance, USA). Kolona a předkolona Ascentis Express C18 (50 mm x 4,6 mm, 5 μm) byly temperovány při 30°C , průtoková rychlost byla udržována na konstantní rychlosti 1 ml/min a objem vzorku byl 10 μl . Mobilní fáze A sestávala z vodné složky s pH 2,8 - upraveno kyselinou octovou, a mobilní fází B byl 100% acetonitril. Pro separaci byla využita gradientová eluce při těchto podmínkách: 0-2,5 min - 95% A: 5% B; 2,5-12 min - 85% A: 15% B; 12-15 min - 50% A: 50% B; 15-18 min - 95% A: 5% B. Detekce a kvantifikace byla provedena při 255 nm (rutin), 280 nm (kyselina gallová, epikatechin, floridzin), 320 nm (kyselina chlorogenová) a 365 nm (kvercitrin). Optimalizace separačních podmínek byla podrobně popsána v publikaci [28]. Identifikace sloučenin byla provedena srovnáním hodnot jejich retenčního času a UV spektra s hodnotami standardů. Čistota píku byla vyhodnocena v ovládacím softwaru. Koncentrace fenolických sloučenin byly vypočteny z integrovaných ploch píků odpovídajících jednotlivým vybraným standardům.

3.3.7 Podmínky skladování

Pro testování a monitoring změn obsahu fenolických látek v plodech jabloní byly použity dvě technologie skladování – chlazený sklad a sklad s řízenou atmosférou (ULO).

Jablka byla odebrána z vybraných stromů v období optimální zralosti a množství bylo rozděleno na 2 části pro vybrané typy skladování. Zároveň byl odebrán vzorek čerstvého ovoce pro analýzu profilu fenolických látek a srovnání obsahu polyfenolů v čerstvém a skladovaném ovoci různých kultivarů. V chlazeném skladu byly vzorky ovoce uchovávány v přepravech o hmotnosti 15 kg. Teplota ochlazeného prostoru se pohybovala od 1,2 do 1,6 °C. Jablka skladovaná v podmínkách ULO byla skladována též v přepravech o objemu 15 kg a umístěna do boxů ULO s koncentrací plynů (O₂ + CO₂, 2% + 1%) a teplotou 1,5 - 2 °C, vlhkostí 99%.

Pro sledování změn fenolického profilu látek ve skladovaných plodech docházelo k vyskladnění plodů v pravidelných termínech po 3, 5 a 7 měsících. Některé odrůdy vykazovaly známky hniloby a ztráty vody po pěti měsících ('Rucla', 'Golden Delicious', 'Fragrance'), plody, skladované v chlazeném skladu některých odrůd byly svaštělé ('Gala', 'Lady Silvia', UEB 32 642). Plody postižené hnilobou nebyly použity k další analýze. Na počátku odběru vzorků bylo proto uloženo větší množství ovoce vybrané odrůdy. Plody skladované v podmínkách ULO nevykazovaly žádné známky poškození v průběhu skladování.

3.4 Komentář k získaným výsledkům

3.4.1 Analýza čerstvých plodů jabloní a stanovení obsahu polyfenolů

Obsah fenolických látek v jablkách je charakteristický pro daný kultivar a závisí na typu skladování a dalším zpracování. Úrovně fenolických látek byly monitorovány v původním rostlinném materiálu a po třech, pěti a sedmi měsících skladování.

Fenolický profil, který zahrnoval kyselinu chlorogenovou, epikatechin, rutin, floridzin a kvercitrin byl stanoven u těchto odrůd jablek 'Rucla', UEB 32 642, 'Lady Silvia', 'Golden Delicious', 'Meteor', 'Fragrance', 'Gala' a 'Rubín' ve vzorcích čerstvého ovoce. U většiny testovaných odrůd byla nalezena hlavní fenolická sloučenina kyselina chlorogenová na nejvyšší úrovni, po níž následoval kvercitrin a epikatechin. Jiné fenolické sloučeniny se objevovaly v nižších množstvích nebo dominovaly pouze v jednom z kultivarů. Kyselina gallová se nevyskytovala u žádného z testovaných kultivarů. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 Obsah fenolických látek v čerstvých plodech ve vybraných odrůdách jablek.

Odrůda	Obsah fenolických látek, µg/g				
	Kyselina chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin
UEB 32 642	4,6	5,2	16,8	11,3	1,9
Gala	52,5	6,8	0,8	6,3	3,1
Angold	99,6	5,7	1,9	6,1	13,6

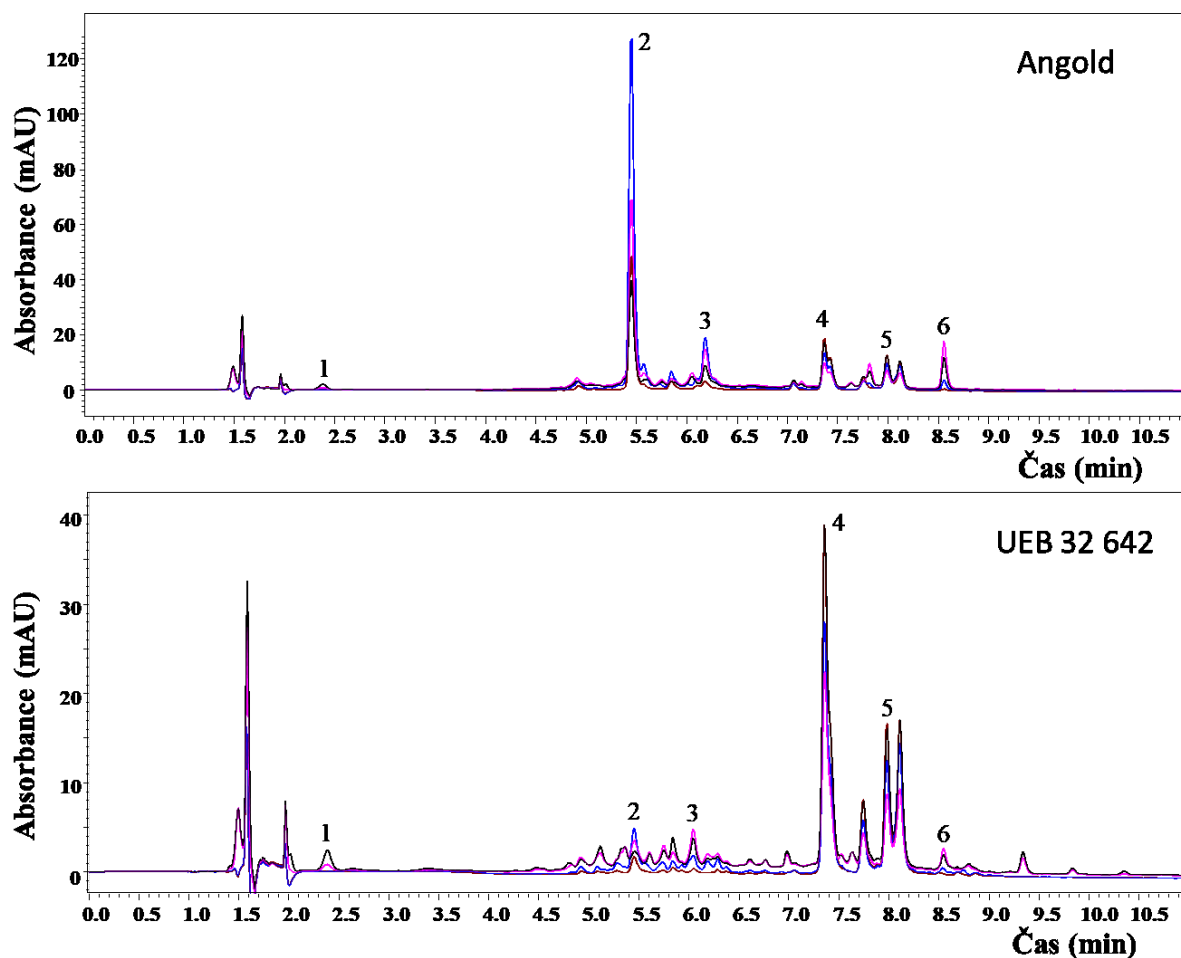
Rucla	14,9	21,3	2,5	6,2	4,7
Lady Silvia	33,0	3,5	0,6	7,9	2,5
Meteor	11,4	5,3	1,6	6,4	5,3
Rubín	4,0	1,5	0,7	2,2	0,7
Golden Delicious	15,7	2,9	0,5	6,1	3,3
Fragrance	1,4	0,8	1,5	24	2,3

Kyselina chlorogenová se tedy objevila ve všech odrůdách, pouze v případě 'Fragrance' byl její obsah velmi nízký a celkově se pohyboval v rozmezí od 99,6 µg/g pro 'Angold' do 1,4 µg/g pro odrůdu 'Fragrance'. Epikatechin nebyl zjištěn u odrůdy 'Fragrance', jinak byla zjištěna široká variabilita obsahu, který se pohyboval od 1,5 µg/g pro 'Rubín' až 21,3 µg/g u UEB 32 642. Nejvyšší obsah rutinu byl nalezen u odrůdy 'Golden Delicious' - 6,8 µg/g. Kvercitrinu obsahovala nejvíce odrůda UEB 32 642, floridzinu bylo nejvíce nalezeno 13,6 µg/g u odrůdy 'Angold'.

Většina flavonoidů byla přítomna v přírodní formě jako O- nebo C-glykosidy. Přítomnost glykosidů připojených k flavonoidním aglykonům, jako je flavonol nebo antokyanidin, snižuje antioxidační aktivitu samotného flavonoidu. Tato studie prokázala přítomnost glykosidických sloučenin kvercitrinu a floridzinu.

Podle fenolického profilu a stanovení vybraných fenolických sloučenin byla odrůda 'Rubín' vyhodnocena jako odrůda s nejnižší úrovní fenolických látek a zároveň s nejnižší antioxidační aktivitou. Naproti tomu nejvyšší obsah příslušných látek byl nalezen v odrůdách 'Angold' (kyselina chlorogenová a floridzin), 'Rucla' (epikatechin) a UEB 32 642 (rutin a kvercitrin).

Obrázek 8 Chromatogramy separace jednotlivých fenolických látek v odrůdách 'Angold' a UEB 32 642" pomocí HPLC. Kyselina gallová 1, kyselina chlorogenová 2, epikatechin 3, kvercitrin 4, rutin 5, floridzin 6; černá linie – 270 nm, růžová linie – 280 nm, modrá linie – 327 nm, and hnědá linie – 353



nm

3.4.2 Stanovení fenolického profilu skladovaných plodů jabloní

Jablka byla skladována dvěma způsoby, v chlazeném skladu a v boxu s řízenou atmosférou s nízkým obsahem kyslíku (podmínky ULO). Byly pozorovány rozdíly v úrovních fenolických sloučenin mezi odrůdami jablek, jakož i v čase a za různých podmínek skladování.

3.4.2.1 Obsah fenolických látek po 3 měsících skladování

Tabulka 6 ukazuje změny obsahu fenolických sloučenin během skladování za podmínek chlazeného skladu a ULO po 3 měsících skladování. Došlo k rapidnímu vzestupu obsahu kyseliny chlorogenové u většiny testovaných odrůd. Hodnoty obsahu byly většinou zvýšeny při skladování jablek v podmínkách chlazeného skladu od 2 do 7-násobku původní hodnoty obsahu. U čtyř odrůd došlo ke snížení obsahu. V podmínkách ULO se obsah kyseliny

chlorogenové též zvyšoval. U odrůdy 'Fragrance' byla zjištěna více než 6-krát vyšší hladina, na rozdíl od poklesu pozorovaného v podmínkách chlazeného skladu. Pouze u tří odrůd se hodnota snížila na 22,8 a 66,3% původního obsahu. Zvýšení obsahu kyseliny chlorogenové bylo patrně způsobeno uvolněním z glykosidických forem. Kromě odrůdy 'Fragrance' byl stejný trend nalezen u všech kultivarů v podmínkách skladování chlazeného a ULO skladu.

V případě epikatechinu se jeho obsah zvýšil ve všech odrůdách při skladování v podmínkách chlazeného skladu v rozmezí od 2 do 20-násobku původních hodnot u 'Meteoru'. Podobně byl zaznamenán nárůst u jablek skladovaných v podmínkách ULO. V porovnání s podmínkami chladírny byly nalezeny ještě vyšší hladiny, týkalo se to odrůdy 'Fragrance', kde bylo pozorováno 42-násobné zvýšení obsahu epikatechinu.

Ve všech testovaných odrůdách, s výjimkou 'Rucla', kde nebyl zjištěn rutin, se jeho obsah zvýšil 2-4-krát v podmínkách chladírny, u ULO podmínek 2 až 7-krát. Ve dvou případech byl podstatný pokles oproti původnímu obsahu, a to u UEB 32 642 v podmínkách chladírny a ULO, pouze 6,0 a 2,4%.

Rozdíly obsahu kvercitrinu u plodů jabloní skladovaných v podmínkách chladírny byly zjištěny v rozmezí od 37,6% do 334,9%. Výrazný nárůst byl nalezen u odrůdy 'Meteor', kde obsah vzrostl více než sedmkrát. V podmínkách ULO byly v příslušných kultivarech pozorovány podobné změny jako u chlazeného skladu. Při stanovení floridzinu v podmínkách chlazeného skladu se obsah zvýšil v rozmezí od 112,8% do 657,8%. Ve dvou odrůdách se obsah snížil na polovinu. Zatímco ULO podmínky byly mírnější, velké rozdíly v úrovních nebyly viditelné.

Tabulka 6 Srovnání obsahu fenolických látek vyjádřeno jako procento původní koncentrace v čerstvých plodech ve vybraných odrůdách během skladování v podmínkách chlazeného skladu (CW) a podmínkách řízené atmosféry (ULO) po 3 měsících

Odrůda	Změny obsahu fenolických sloučenin po 3 měsících skladování, %									
	Kyselina chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Kvercitrin		Floridzin	
	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO
UEB 32 642	29,3	22,8	114,4	233,7	6,0	2,4	37,6	58,0	21,5	0,0
Gala	45,5	51,7	116,3	135,6	320,0	160,0	110,3	97,6	75,8	100,0
Angold	222,3	240,2	347,4	346,5	434,2	692,1	107,4	143,0	46,7	54,8
Rucla	61,6	66,3	95,3	91,3	0,0	0,0	59,4	76,4	112,8	120,2
Lady Silvia	215,0	456,7	544,3	1292,9	150,0	100,0	86,1	199,4	198,0	316,3
Meteor	717,5	552,6	2159,4	1250,0	374,2	661,3	774,0	569,3	627,4	345,3
Rubín	146,8	350,6	390,0	700,0	138,5	115,4	334,9	114,0	584,6	277,0
Golden Delicious	578,3	422,0	1217,5	900,0	388,9	244,4	187,6	149,6	347,7	321,5
Fragrance	33,3	688,9	1493,3	4273,3	193,1	69,0	228,1	40,0	657,8	48,9

3.4.2.2 Obsah fenolických látek po 5 měsících skladování

V následující Tabulce 7 jsou vidět změny obsahu vybraných fenolických sloučenin během 5 měsíců skladování plodů jabloní. Ve většině odrůd nebyl obsah kyseliny chlorogenové během této doby skladování výrazně změněn. U odrůd 'Gala' a 'Rucla' se obsah snížil u obou typů skladování. Významný 7-násobný nárůst byl zaznamenán u odrůdy 'Fragrance'. Co se týče epikatechinu, byly zjištěny zvýšené hladiny při skladování v podmínkách chlazeného skladu i ULO. Nejvíce znatelné změny byly zjištěny v podmínkách ULO u odrůdy UEB 32 642 (9-krát), 'Rubín' (12-krát) a 'Fragrance' (42-krát vyšší úroveň, podobná hodnotě při skladování po dobu 3 měsíců). V podmínkách chlazeného skladu bylo pozorováno desetinásobné zvýšení obsahu epikatechinu u odrůdy 'Fragrance'.

Obsah rutinu se během skladování za podmínek chlazeného skladu zvýšil 2 až 3-krát ve srovnání s původním obsahem u většiny odrůd. Tendence snižování obsahu byla pozorována v podmínkách ULO u odrůd UEB 32 642 a 'Rucla', kde byl rutin prakticky rozložen. Podobné výsledky byly získány při skladování za podmínek chlazeného skladu. Značný nárůst obsahu byl pozorován u odrůd 'Meteor' při ULO skladování a u odrůdy 'Angold' v podmínkách

chlazeného skladu (6-násobný nárůst). Nejvyšší obsah byl nalezen u odrůd 'Gala' a 'Angold' v podmínkách ULO (8-násobný nárůst).

Jak je patrné z naměřených hodnot kvercitrinu a floridzinu, že skladování plodů jableň v chlazeném skladu odhalilo podobný trend změn obsahu. Zvýšené hladiny těchto látek se pohybovaly v rozmezí 104,0% až 670,1% u kvercitrinu, od 124,2% do 597,8% u floridzinu. Vyšší hladiny byly zjištěny pro podmínky skladování v podmínkách ULO, 9-násobné zvýšení bylo pozorováno u odrůdy UEB 32 642 a 'Rubín'.

Tabulka 7 Srovnání obsahu fenolických látek vyjádřeno jako procento původní koncentrace v čerstvých plodech ve vybraných odrůdách během skladování v podmínkách chlazeného skladu (CW) a podmínkách řízené atmosféry (ULO) po 5 měsících

Odrůda	Změny obsahu fenolických sloučenin po 5 měsících skladování, %									
	Kyselina chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Kvercitrin		Floridzin	
	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO
UEB 32 642	55,4	117,4	361,5	95,0	7,2	0,9	112,8	123,9	354,1	870,3
Gala	54,3	88,1	113,3	126,7	233,3	813,3	104,0	222,2	124,2	154,8
Angold	235,8	265,1	172,8	121,9	684,2	789,5	263,6	199,2	72,4	94,5
Rucla	37,4	61,3	136,9	269,7	12,2	0,0	61,0	65,9	66,0	164,9
Lady Silvia	206,8	169,7	387,1	435,7	50,0	50,0	165,8	201,9	230,6	234,7
Meteor	394,7	311,8	795,3	409,4	361,3	658,1	670,1	449,6	581,1	260,4
Rubín	353,2	532,9	790,0	1233,3	346,2	246,2	500,0	474,4	592,3	969,2
Golden	191,7	286,6	275,4	291,2	233,3	233,3	121,5	137,2	183,1	321,5
Delicious										
Fragrance	140,7	777,8	1133,3	4213,3	306,9	3,5	237,5	151,9	597,8	433,3

3.4.2.3 Obsah fenolických látek po 7 měsících skladování

Tabulka 8 dokumentuje změny v posledním období skladování. Obecně byl obsah kyseliny chlorogenové v testovaných odrůdách v obou typech skladování mírně zvýšený oproti původnímu obsahu. Znatelný nárůst byl zaznamenán u odrůdy 'Rubín' (6-krát) v podmínkách chlazeného skladu. Polovina a třetina původního obsahu byla pozorována u odrůdy 'Rucla' u obou typů skladování.

Na druhé straně byly pozorovány různé hladiny obsahu epikatechinu pro podmínky chlazeného skladu i ULO, zatímco významnější změny byly nalezeny při podmínkách skladování ve skladu chlazeném. Nejvýznamnější rozdíl byl pozorován u odrůdy 'Rubín' (14-

krát vyšší úroveň) v podmínkách CW. U stejné odrůdy uskladněné v podmínkách ULO se jeho obsah zvýšil 6-krát.

Nejnižší obsah rutinu byl naměřen v podmínkách CW a ULO u UEB 32 642 (25-krát nižší obsah než původní koncentrace). Stejně jako u odrůdy 'Rucla' byl obsah snížen v rozmezí 2,5 až 4-krát. V jiných odrůdách bylo zjištěno zvýšení obsahu rutinu. Nejvyšší hladiny rutinu byly zjištěny u odrůd 'Angold' 7-krát vyšší hladina při podmínkách chlazeného skladu a 'Gala' odrůdy 10-krát vyšší obsah v podmínkách ULO.

Hladina kvercitrinu se zvyšovala při obou typech skladování, ale změny nebyly tak významné. Zvýšený obsah od 2 do 4-násobného nárůstu původního obsahu byl zjištěn u odrůdy 'Meteor'. Obsah kvercitrinu u odrůdy 'Rucla' byl pro oba typy podmínek skladování snížen na polovinu původní úrovně.

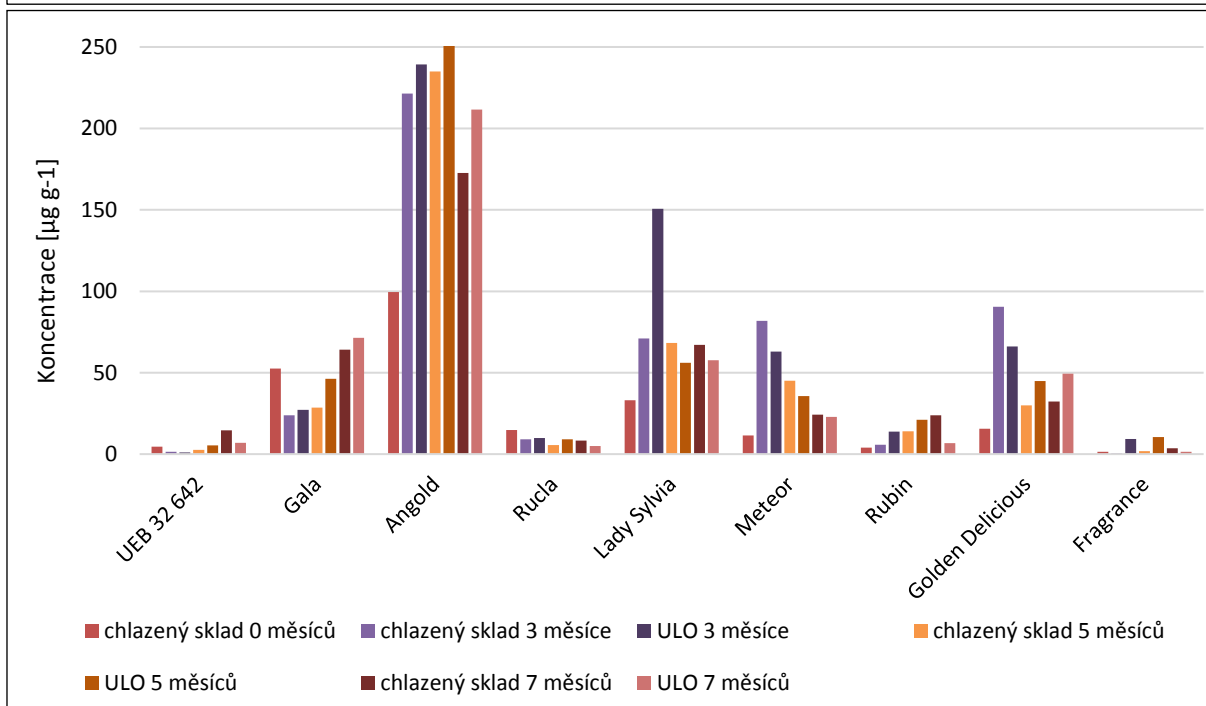
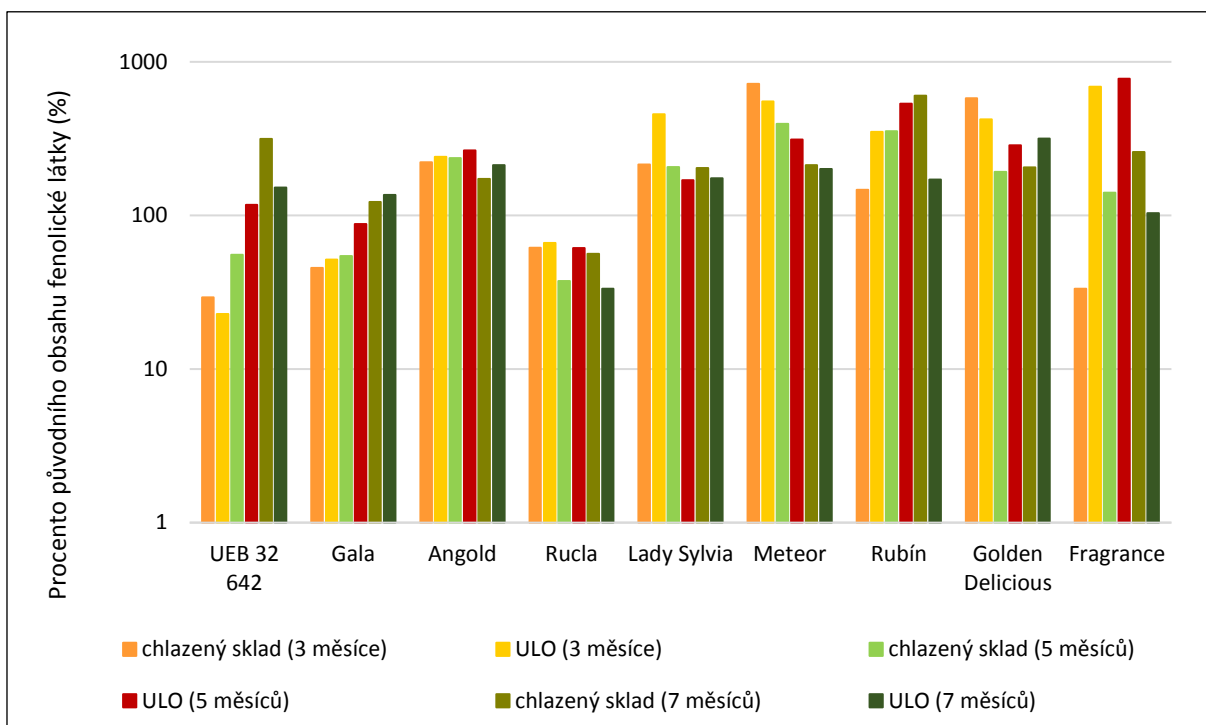
Zvýšené hladiny byly pozorovány u floridzinu při obou typech skladování. Hladina floridzinu při skladování v chlazeném skladu byla v průměru 3-krát vyšší než původní obsah. Nejvyšší obsah byl pozorován u odrůdy UEB 32 642, odpovídal desetkrát vyššímu obsahu oproti původní hodnotě. Co se týká skladování v podmínkách ULO, byl pozorován vzrůstající trend obsahu této fenolické sloučeniny, změny obsahu byly v rozmezí 2–6-násobném. Nejvyšší obsah byl naměřen u odrůdy 'Rubín', hodnota byla téměř 7-krát vyšší. Jediný pokles obsahu byl nalezen u odrůdy 'Angold', přibližně 50% při obou typech skladování.

Tabulka 8 Srovnání obsahu fenolických látek vyjádřeno jako procento původní koncentrace v čerstvých plodech ve vybraných odrůdách během skladování v podmínkách chlazeného skladu (CW) a podmínkách řízené atmosféry (ULO) po 7 měsících

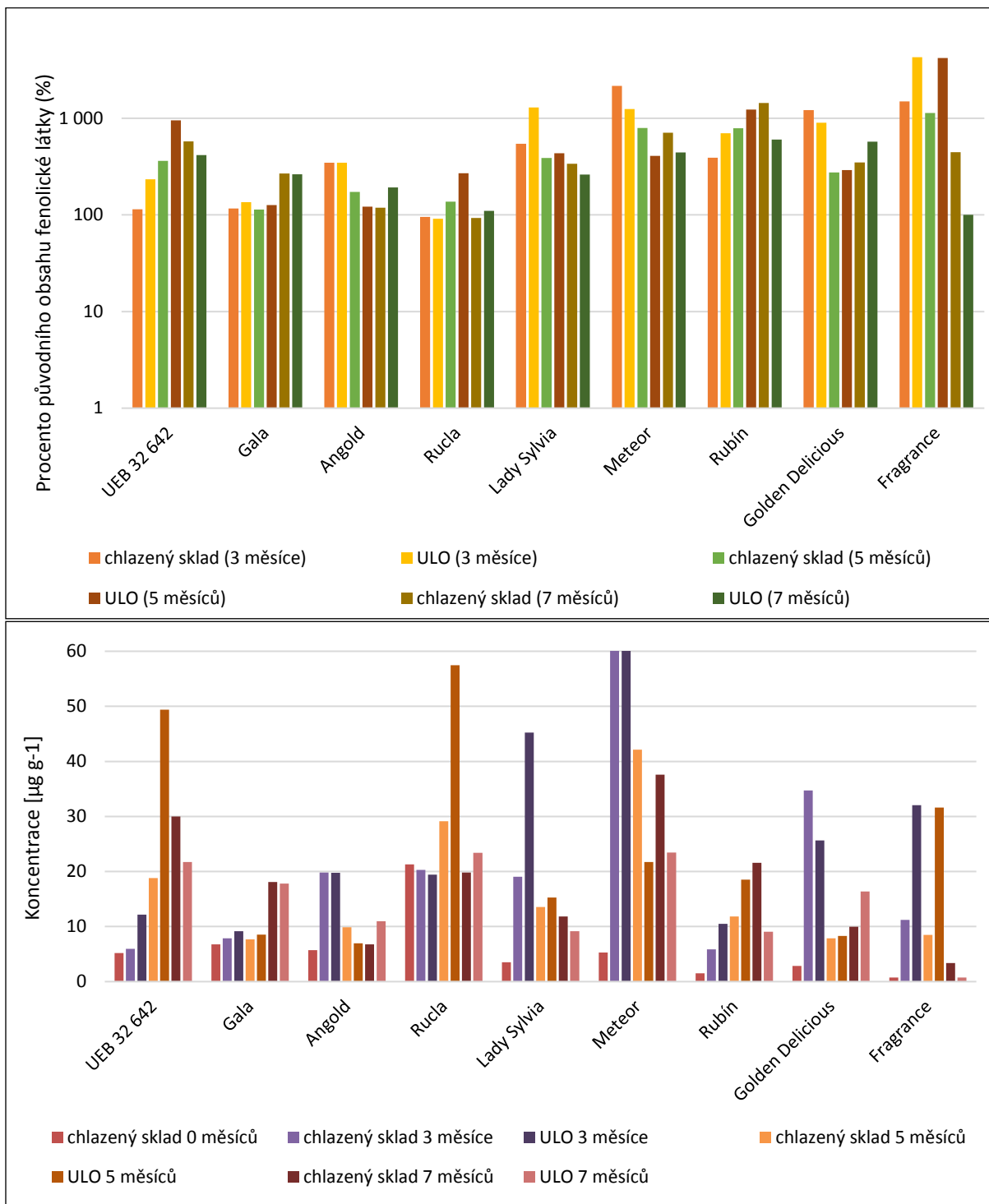
Odrůda	Změny obsahu fenolických sloučenin po 7 měsících skladování, %									
	Kyselina chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Kvercitrin		Floridzin	
	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO	CW	ULO
UEB 32 642	315,2	152,2	579,9	417,3	4,8	3,3	128,3	73,0	1124,3	635,1
Gala	122,3	136,1	268,2	263,7	260,0	1093,3	135,7	158,7	259,7	230,7
Angold	173,3	212,5	118,4	192,1	736,8	402,6	103,3	129,8	52,6	65,1
Rucla	56,2	33,3	93,0	109,9	42,9	26,5	61,0	59,4	106,4	137,2
Lady Silvia	203,3	174,4	338,6	261,4	200,0	125,0	117,1	114,6	249,0	326,5
Meteor	212,3	200,9	709,4	442,5	519,4	290,3	458,3	227,6	301,9	197,2
Rubín	601,3	170,9	1440,0	603,3	276,9	246,2	244,2	334,9	330,8	684,6
Golden	205,8	316,0	349,1	573,7	211,1	233,3	96,7	164,5	209,2	318,5
Delicious										
Fragrance	259,3	103,7	446,7	100,0	551,7	231,1	302,5	231,5	422,2	664,4

3.4.3 Vliv doby skladování a podmínek na obsah fenolických látek

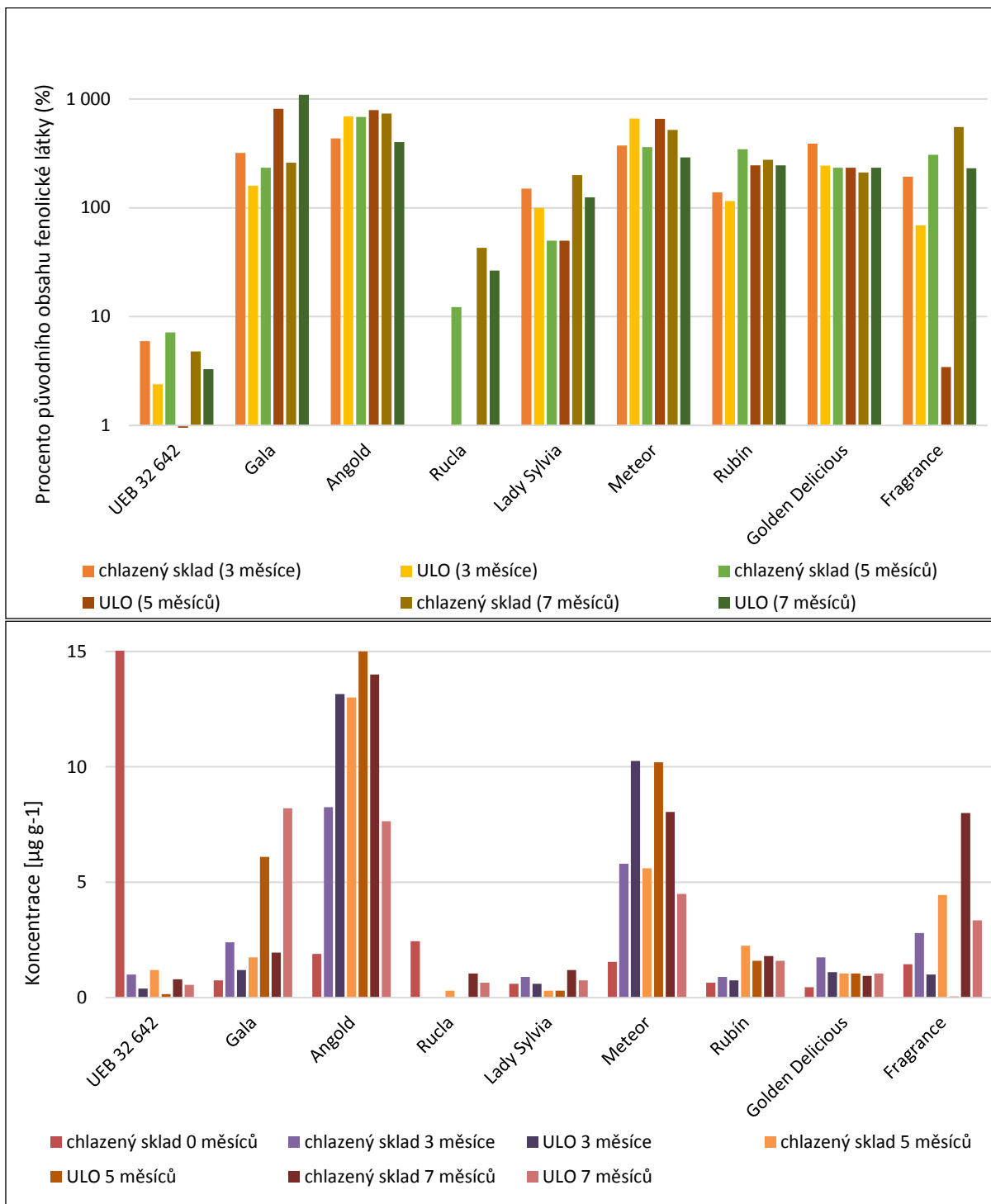
Na základě výsledků získaných během skladování po dobu 7 měsíců lze konstatovat, že fenolické sloučeniny se chovají odlišně po dlouhou dobu skladování s ohledem na podmínky skladování. Pokud jde o kyselinu chlorogenovou, obsah kolísal více za podmínek skladování plodů v chlazeném skladu. Procentní změny obsahu kyseliny chlorogenové v průběhu doby skladování jsou zdokumentovány na Obrázku 9. U odrůd UEB 32 642, 'Gala', 'Rubín' a 'Fragrance' byl pozorován nárůst obsahu kyseliny chlorogenové během skladování v chlazených podmínkách. U ostatních testovaných odrůd došlo k poklesu obsahu během 5 měsíců skladování a následně ke zvýšení obsahu nebo k žádné změně během 7 měsíců skladování. Pokud jde o podmínky ULO, byl pozorován podobný trend jako u podmínek chlazeného skladu u většiny odrůd. Docházelo ke zvýšení hladiny kyseliny chlorogenové po 5 měsících skladování. Po 7 měsících skladování u některých odrůd došlo ke zvýšení obsahu, u některých naopak ke snížení. Porovnání hodnot obsahu kyseliny chlorogenové v odrůdách jablek skladovaných v podmínkách chlazeného skladu a ULO je znázorněno na Obrázku 9. Na dalších obrázcích jsou znázorněny hodnoty a jejich změny dalších fenolických sloučenin v daných odrůdách při obou typech skladování.



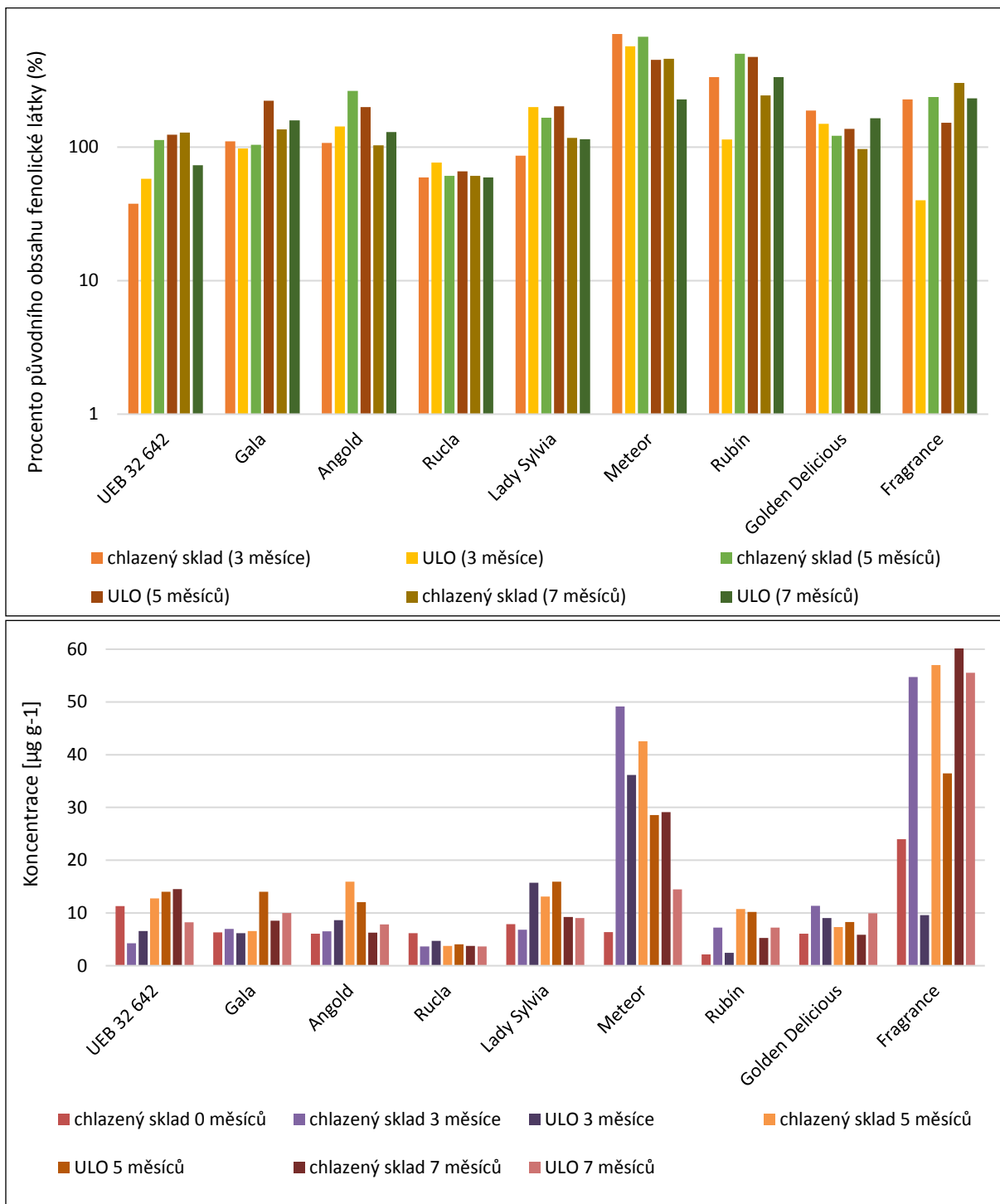
Obrázek 9 Obsah kyseliny chlorogenové a procentní změny během skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO



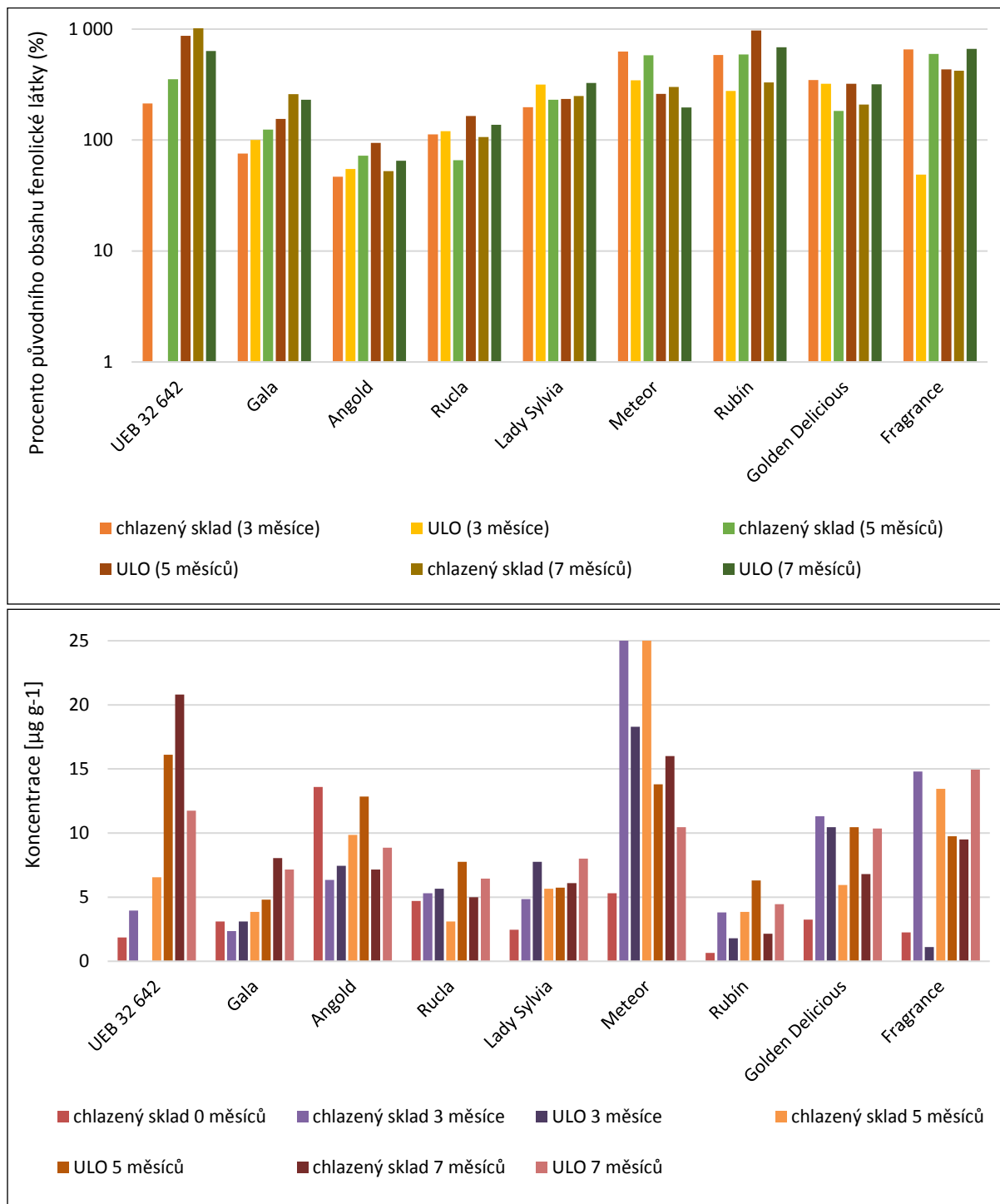
Obrázek 10 Obsah epikatechinu a procentní změny během skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO



Obrázek 11 Obsah rutinu a procentní změny během skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO



Obrázek 12 Obsah kvercitrinu a procentní změny během skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO



Obrázek 13 Obsah floridzinu a procentní změny během skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO

3.4.4 Celkový souhrn získaných výsledků

Obsah fenolických látek v jablkách se odvíjí od odrůdy jablka a jeho způsobu skladování a zpracování. Rozdíly v obsahu fenolických látek byly nalezeny jak při porovnání jednotlivých odrůd, tak při porovnání doby a způsobu skladování u stejné odrůdy. Podle koncentrace daných fenolických látek u příslušných odrůd, můžeme tyto odrůdy jablek rozdělit podle jejich kvality a obsahu antioxidantů.

K poklesům koncentrací fenolických látek začalo docházet ve většině případů po pěti měsících skladování, ať už při skladování ULO nebo při skladování za nízké teploty. Při skladování v chladném prostředí byl pokles obsahu fenolických látek výraznější (po výraznějším nárůstu koncentrací fenolických látek způsobeným uvolňováním z glykosidických forem a enzymatickou aktivitou, docházelo k výraznějším poklesům obsahu fenolických látek).

Na podmínky skladování byly nejvíce citlivé kyselina chlorogenová a epikatechin, u těchto látek docházelo k nejvýraznějším nárůstům a poklesům koncentrací vlivem doby a způsobu skladování. Fenolické látky kvercitrin a rutin vykazovaly vyšší stabilitu.

Odrůdy, u kterých se vyskytoval poměrně vysoký obsah fenolických látek a které nejlépe zachovaly jejich obsah a tím i vysokou hladinu antioxidantů i po delší době skladování, byly odrůdy 'Angold', 'Gala', 'Lady Silvia' a 'Meteor' (avšak u této odrůdy je s narůstající dobou skladování nejvíce patrné kolísání koncentrací fenolických látek). Naproti tomu u odrůd 'Fragrance', 'Rubín' a 'Rucla' jsou měřené fenolické látky zastoupeny v menším množství, proto je můžeme označit jako méně kvalitní z hlediska obsahu antioxidantů.

4 ZÁVĚR

Pomocí HPLC metody byly stanovovány a hodnoceny hladiny zvolených fenolických látek v homogenizovaných extraktech 9 vybraných odrůd jablek. Hladiny fenolických látek byly stanoveny v čerstvém rostlinném materiálu a po 3, 5 a 7 měsících skladování v chladném prostředí a za ultra-nízkého přístupu kyslíku. HPLC metoda je vhodnou metodou pro stanovení těchto látek.

Ze získaných výsledků měření vyplývá, že obsah fenolických látek v jablkách závisí na jejich odrůdě, skladování a zpracování. Rozdíly mezi odrůdami byly významné jak v původním, čerstvém rostlinném materiálu, tak s odstupem času skladování. Koncentrační úrovně příslušných fenolických sloučenin lze použít k rozlišení kvality jednotlivých odrůd. Vyšší množství fenolických látek obsahovaly odrůdy Angold, Meteor a Lady Silvia. Na podmínky skladování byly, co se týče fenolických látek, nejvíce citlivé kyselina chlorogenová

a epikatechin. Naproti tomu kvercitrin a rutin vykazovali vyšší stabilitu. Skladování za ultra-nízkého přístupu kyslíku se jeví jako účinnější pro udržení stability fenolických látek.

5 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika komplexně zpracovává problematiku detekce významných obsahových látek v plodech jabloní metodou kapalinové chromatografie s využitím DAD detektoru s ohledem na různé podmínky skladování. Publikace v takovém rozsahu nebyla dosud pěstitelům v ČR poskytnuta. Záměr metodiky je cílen nejen na vlastní chemickou analýzu vybraných antioxidantů, ale uvádí do souvislostí mnoho aspektů, které jsou klíčové pro řešení komplexnosti dané problematiky a uplatnění výsledků v praxi. Velmi důležitou součástí metodiky je i publikace, zahrnující podrobnou optimalizaci metody pro detekci významných obsahových látek v plodech jabloní. Výsledky jsou využitelné zejména organizacemi zabývajícími se skladováním ovoce a následným prodejem jablek. Znalosti o průběhu změn v obsahu fenolických sloučenin v jablkách mohou být využity pro marketing ovoce, kdy je možnost nabídnout zákazníkovi jablka v optimální fázi skladování s vysokými obsahy zdraví prospěšných sloučenin s antioxidační aktivitou.

6 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena pěstitelům, skladovatelům a distributorům jablek. Metodika je vítaným zdrojem informací pro pěstitele, skladovatele a obchodníky. Uchování vysokého obsahu bioaktivních látek v jablkách je v současné době požadavkem spotřebitelů. Počet konzumentů jablek, kteří se zajímají o obsah nejen škodlivých látek v ovoci (rezidua pesticidů, mykotoxiny apod.), ale i o obsahy zdraví prospěšných látek v poslední době narůstá. Spotřebitelé začínají sledovat obsah zdraví prospěšných látek v jablkách k udržení dobrého zdravotního stavu současné populace dětí, dospělých i starších osob. Na základě získaných výsledků a popisu v dané metodice lze říci, že vysoký obsah fenolických látek a zároveň vysokou hladinu antioxidantů i po dlouhodobém skladování si uchovávají odrůdy 'Angold', 'Gala', 'Lady Silvia' a 'Meteor'. Proto je skutečností, že tyto odrůdy mohou být doporučeny pro dlouhodobé skladování po dobu 5 měsíců se zachováním vysoké hladiny antioxidantů. Na druhou stranu odrůdy 'Fragrance', 'Rubín' a 'Rucla' jsou odrůdy s nižším obsahem vybraných fenolických sloučenin, tyto odrůdy nejsou doporučovány k dlouhodobému skladování.

7 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Podle vývoje trhu s jablky a situace v okolních, zejména západoevropských zemích lze očekávat, že podíl produkce jablek mírně vzroste. Celková výměra plodných produkčních výsadeb jabloní činí v ČR přibližně 9000 ha, s průměrných výnosem 9,18-16,6t/ha (v pětiletém období, MZe ČR). To vytváří ročně produkci 110-130 tis. t jablek při realizační ceně kolem 10 Kč/kg v hodnotě 1,1-1,3 mld. Kč ročně. Lze předpokládat, že u 10 % produkce bude zvýšená realizační cena o 20 % vlivem nabídky optimálně skladovaných jablek bez ztrát cenných zdraví prospěšných látek s antioxidační kapacitou.

Na základě výsledků projektu a této metodiky lze pěstitelům, skladovatelům a obchodníkům doporučit odrůdy jablek, optimální dobu skladování a termíny vyskladnění jablek dle jednotlivých odrůd. Nové poznatky mohou přispět k lepšímu marketingu jablek, kdy prodej jablek s vysokými obsahy zdraví prospěšných látek přispěje ke zvýšenému zájmu zákazníků, za lepší se prodejnost jablek, případně bude výhodnější realizační cena. Poptávka po zdravém ovoci bez reziduí pesticidů a zároveň s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek je neustále rostoucí. Ekonomický přínos metodiky je přímo vyčíslitelný zvýšenou realizační cenou skladovaných jablek se zachováním vysokého obsahu látek s antioxidační aktivitou, nepřímo zvýšením zdraví současné populace konzumací jablek se zvýšeným obsahem látek s pozitivním vlivem na lidské zdraví.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Publikace předcházející metodice

PECHOVÁ, M. *Stanovení vybraných fenolických látek v ovoci*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

BORTLOVÁ, K. *Hodnocení obsahu fenolických látek v ovoci*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

SKLENAROVA, H., BILKOVA, A., PECHOVA, M., CHOCHOLOUS P. (2018). Determination of major phenolic compounds in apples: Part I-Optimization of high-performance liquid chromatography Separation with diode array detection. *J. Sep. Sci.* 41: 3042-3050, 2018.

Seznam použité literatury:

[1] Kopec, K. (2006). Pojednání o významu ovoce a zeleniny. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita.

[2] Kováčiková, E. (1997). Ovoce a zelenina. Bratislava, VÚP

[3] Loescher, W. (2016). Cherries (*Prunus* spp.): The fruit and its importance. *Encyclopedia of Food and Health*

[4] Cao, J., Jiang, Q., Lin, J., Li, X., Sun, C., Chen, K. (2015). Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China. *Food Chem.* 173, 855.

[5] Ho, Chi-Tang et al. (1992). Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC

[6] Krejčíková, A. Zajímavé reakce fenolických látek. FPE ZČU, Plzeň.

[7] Balasundram, N. et al. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99., 191–203.

[8] Marcaníková, K., Beňová, B. (2010). Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy.* 104, 27-30.

[9] Kaniová, L. (2015). Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu. Brno. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

- [10] Velišek, J., Cejpek, K. (2008). Biosynthesis of Food Components. Osis, Tábor.
- [11] Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions [online]. December 2014, 229 [cit. 2018-01-17]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63281-400008-2. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/287232949_Chemopreventive_Properties_of_Fruit_Phenolic_Compounds_and_Their_Possible_Mode_of_Actions
- [12] Fiedorová, I. (2008). Fenolické látkové složky v potravinách. Lednice. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici. Vedoucí práce Ing. Josef Balík, Ph.D.
- [13] PubChem, Open Chemistry database [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z:
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid#section=Top
- [14] Yilmaza, Ü. T. et al. (2013). Determination of Gallic Acid by Differential Pulse Polarography: Application to Fruit Juices. *Journal of Analytical Chemistry.*, 68(12), 1064-1069. DOI: 10.1134/S1061934813120113. ISSN 10619348.
- [15] Chemical Book [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0158671.htm
- [16] Farah, A., et al. (2008). Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *Journal of Nutrition*, 138(12), 2309-2315. DOI: 10.3945/jn.108.095554.
- [17] Pedriali, C. A. et al. (2008). The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. *Quiemica Nova*. 31(8), 2147-2151. ISSN 1678-7064.
- [18] WebMD [online]. [cit. 22. YY01. 2018]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-294-%20QUERCETIN.aspx?activeIngredientId=294&activeIngredientName=QUERCETIN>
- [19] Gosch, Ch., Halvwirth, H., Stich, K. (2010). Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 2010, 838-843.
- [20] FooDB [online]. [cit. 22. 01. 2018]. <http://foodb.ca/compounds/FDB015553>
- [21] Silvaraman D. et al. (2014). Isolation, characterization and insilico pharmacological screening of medicinally important bio-active phytoconstituents from the leaves of ipomoea aquatica forsk. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*, 6(2), 262-267. ISSN 0975-1491.
- [22] *Alberta Food Composition Database* [online]. [cit. 01. 02. 2018]. <http://afcdb.ca>

Pérez-Illarbe J., Hernández T., Estrella T.: Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1990, (192), 551-554.

[23] Bai, L., Guo, S., Liu, Q. et al. (2015). Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, 24(2), 293-298. DOI: 10.1016/j.jfda. 10.002. ISSN 10219498.

[24] Martí, R., Valcírcel, M., Herrero-Martínez, eJ. M., Cebollacornejo, J., Rosellé, S. (2015). Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chemistry.*, 169, 169-179. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.151. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614011996>

[25] Jinshui, Ch., Qun, X., Lina, L., Rohrer, J. Determination of Phenolic Compounds in Apple Orchard Soil. *Thermo Scientific Webpage, applicacation Note 1077.*, 1-5

[26] Escarpa, A., González, M.C. (1999). Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A.*, 830, 301-309.

[27] Schieber, A., Keller, P., Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 910, 265-273

[28] Sklenarova, H., Bilkova, A., Pechova, M., Chocholous P. (2018). Determination of major phenolic compounds in apples: Part I-Optimization of high-performance liquid chromatography Separation with diode array detection. *J. Sep. Sci.* 41: 3042-3050, 2018.

9 FOTODOKUMENTACE







Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor rostlinných komodit, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

vydává

OSVĚDČENÍ

4034/2019-MZE-17222

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování**

Autor / autoři: **RNDr. Aneta Bílková a kol.**

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o., RADANAL s.r.o.**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2018**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu NAZV č. **QJ1510354**.

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolovu“? **ANO**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N_{mei} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce: **www.vsuo.cz**

V Praze dne 23/1/2019

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdeněk Trnka
ředitel odboru rostlinných komodit

.....
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 29.1.2019

.....
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

