



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



**Metodika pro kvalitativní hodnocení
ovoce a zpracovatelských produktů
z hlediska obsahu látek prospěšných
pro zdraví člověka**

Marcela Hollá a kol.



**CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2019**





UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

**METODIKA PRO KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ OVOCE
A ZPRACOVATELSKÝCH PRODUKTŮ Z HLEDISKA
OBSAHU LÁTEK PROSPĚŠNÝCH PRO ZDRAVÍ
ČLOVĚKA**

Marcela Hollá a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2019

Autorský kolektiv:

UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,
Katedra analytické chemie

Mgr. Marcela Hollá, doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D., PharmDr. Petr Chocholouš,
Ph.D., Mgr. Anežka Adamcová, Mgr. Stanislava Košková, Mgr. Barbora Šmídová

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

RNDr. Aneta Bílková, Ing. Veronika Nekvindová, Ph.D., Ing. Pavol Suran

Název:

Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka

Vydala:

UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,
Katedra analytické chemie, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Vydáno v roce 2019

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: hollama@faf.cuni.cz

Foto: RNDr. Aneta Bílková a kol.

Oponenti:**Odborný oponent z oboru:**

Ing. Vladan Falta, Ph.D. – BIOCONT LABORATORY spol. s.r.o.

Oponent ze státní správy:

Ing. Martina Leibl, Ph.D. – Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit

Certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury TAČR a je výstupem řešení projektu TJ01000151 „Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí“. 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. Publikaci bylo uděleno Osvědčení číslo 45848/2019-MZE-18140 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

© UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,
2019

ISBN 978-80-906644-4-9

Obsah

ANOTACE	7
1 ÚVOD.....	9
2 CÍL METODIKY.....	10
3 VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	11
3.1 Fenolické látky.....	11
3.1.1 Stanovení a HPLC separace fenolických sloučenin.....	11
3.1.2 Význam fenolických sloučenin.....	16
3.2 Antioxidační aktivita.....	16
3.2.1 Nejčastější metody stanovení antioxidační aktivity.....	16
3.3 Metody pro chemickou analýzu a identifikaci fenolických látek.....	17
3.3.1 Stanovované fenolické látky.....	18
3.3.2 Analyzované vzorky.....	20
3.3.3 Chemikálie a činidla	20
3.3.4 Příprava vzorku	21
3.4 Chemická analýza fenolických látek.....	21
3.4.1 HPLC-DAD-CAD.....	21
3.4.2 HPLC CoulArray	22
3.4.3 Stanovení antioxidační aktivity	22
3.5 Porovnání metod na základě vybraných validačních parametrů	23
3.5.1 Test vhodnosti systému	23
3.5.2 Lineární rozsah, detekční a kvantifikační limit.....	23
3.5.3 Linearita TEAC stanovení.....	26

3.6 Komentář k získaným výsledkům	26
3.6.1 Porovnání detekční technik	26
3.6.2 HPLC analýza jablečných extraktů	27
3.6.3 CoulArray analýza jablečných extraktů	30
3.6.4 Stanovení TEAC	41
3.6.5 Celkové porovnání výsledků použitých technik	42
3.7 Pomologické hodnocení plodů jabloní	45
4 ZÁVĚR	47
5 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	47
6 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	48
7 EKONOMICKÉ ASPEKTY	48
8 POUŽITÁ LITERATURA	49
9 FOTODOKUMENTACE	54

ANOTACE

Metodika je určena konzumentům a pěstitelům jabloní, zpracovatelům ovoce a obchodníkům. Zahrnuje podrobné informace o využitých metodách pro stanovení obsahu fenolických látek v jablkách a vlastní popis chemických analýz. Popsány jsou podmínky separace, metody detekce, příprava reálných vzorků k analýze, stanovení celkové antioxidační aktivity ve vybraných odrůdách jabloní i novošlechtění. Z dosažených výsledků jsou pro další zpracování doporučeny odrůdy s vysokým obsahem fenolických látek a odpovídající antioxidační aktivitou. Metodika je doplněna o poznatky související s metodami analýz bioaktivních látek v jablkách vyplývajících z literární rešerše a z poznatků získaných v průběhu řešení projektu TAČR TJ01000151.

ANNOTATION

The described methodology is intended for use of consumers and apple growers, fruit processing units, and dealers. It includes detailed information concerning the methods used to determine the content of phenolic substances in apples and the description of chemical analyzes. Separation conditions, methods of detection, preparation of apple samples for analysis, determination of total antioxidant activity in selected varieties of apples, and new breeding are described. The obtained results led to varieties with both higher content of phenolic substances and antioxidant activity recommended for further processing. The methodology is supplemented with knowledge related to the methods of analysis of bioactive substances in apples resulting from the literature search and from the results obtained during the work on project TACR TJ01000151.

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
CAD	detekce na principu nabitého aerosolu
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ECD	elektrochemický detektor
FLD	fluorescenční detektor
FRAP	Metoda používaná ke stanovení antioxidačních vlastností biologických vzorků. Metoda využívá redukčního potenciálu antioxidačních látek na tripyridyltriazin železitý (FeIII-TPTZ), který je za nízkého pH redukován na svou železnatou formu spolu s intenzivním modrým zbarvením. (Ferric Reducing Ability of Plasma)
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LOD	detekční limit
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometr
ORAC	Metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Metoda ORAC je založena na vytvoření peroxylového radikálu feroeritru a jeho oxidaci činidlem ABAP (2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
TAA	celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity)
TEAC	Metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Testuje schopnost vzorku či látek zhaset kation-radikál ABTS.+ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Activity)

1 ÚVOD

Jablka jsou jedním z nejčastěji konzumovaných plodů na světě. V roce 2011 byla podle statistik Organizace pro výživu a zemědělství [1] odhadnuta světová produkce jablek na přibližně 75 milionů tun. Jedná se o ovoce s vysokými výživovými hodnotami, vysokou produkcí a dobrou přístupností na trhu. Díky moderním technologiím skladování lze v závislosti na odrůdě skladovatelnost plodů jabloní prodloužit až o jeden rok.

Jablka obsahují různé fenolické sloučeniny [2] a za použití analytických metod s využitím kapalinové chromatografie ve spojení nejčastěji s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je možné identifikovat celou řadu polyfenolických molekul, hlavními složkami jsou (+)-katechin a (-)-epikatechin (ze skupiny flavan-3-olů a flavanolů), floridzin (dihydrochalkonové glykosidy), kvercetin (flavonoly), prokyanidiny (antokyany), kyanidin-3-O-galaktosid (antokyany), kyselina chlorogenová (ester kyseliny chinové a kávové), rutin (flavonoly), kyselina gallová (fenolické kyseliny) a kyselina p-kumarová (hydroxycinnamáty) [3, 4]. Obecně se obsah polyfenolů pohybuje mezi 19,6 a 55,8 mg na plod (flavan-3-oly), 17,7–33,1 mg na plod (flavonoly) a 10,6–80,3 mg na plod (kyselina chlorogenová); nejnižší hodnoty byly zaznamenány pro floridzin (1,0–9,3 mg na plod) a antokyanin (0,1–6,5 mg na plod) [5]. Charakterizace molekul polyfenolů jablek spojených s jejich lokalizací ve slupce, dužnině a semenech dokazuje, že slupka a také semena jsou na tyto sloučeniny bohaté [5, 6, 7].

2 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je stanovení vybraných fenolických látek v genotypech jabloní zahrnující rozsáhlou kolekci perspektivních novošlechtění a dalších známých odrůd. Dále vyvinout rutinní, jednoduchou a rychlou separaci umožňující analýzu velkého počtu vzorků s použitím rychlé HPLC metody a vybraného typu detektoru. Následně provést monitoring vybraných sedmi fenolických sloučenin (kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, kvercetin, rutin, floridzin a floretin) v jablečných extraktech pomocí HPLC-diode array detekce (DAD), detekce nabitého aerosolu (CAD) a CoulArray detektoru. Zároveň je cílem metodiky porovnání těchto detekčních technik a výběr nejvhodnější, univerzální metody pro dostatečně selektivní a citlivé stanovení látek s antioxidační aktivitou v plodech jabloní. Součástí metodiky je i pomologické hodnocení stanovovaných odrůd a novošlechtění pro komplexnost problematiky a pro kvalitativní hodnocení tohoto ovoce s pozitivním vlivem na zdraví člověka.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 Fenolické látky

Fenolické sloučeniny jsou minoritními složkami rostlin a plodů. Přesto však mají významné a lidskému organismu prospěšné vlastnosti. Na lidský organismus mají fenolické látky příznivé účinky, které závisí na přijatém množství a biologické dostupnosti. Pozitivně ovlivňují kardiovaskulární systém, mají roli v prevenci rakovinového bujení a neurodegenerativních onemocnění a dále rovněž vykazují antimikrobiální, protizánětlivé a antialergické účinky [9, 10, 12, 13, 14].

Na základě těchto skutečností vzrostl zájem o analýzu potravin, které mohou být potenciálními zdroji těchto látek. Jedná se o ovoce, zeleninu a průmyslové produkty z nich vyrobené. Mezi nejčastěji konzumované druhy ovoce se řadí jablka, která tedy představují významný zdroj těchto látek. Fenolické látky, rovněž také polyfenoly, jsou sloučeniny přírodního původu nacházející se ve všech rostlinných tkáních. Základní strukturální jednotkou fenolických látek je aromatický kruh obsahující jednu, případně více hydroxylových skupin. Spojením základních jednotek mohou vznikat až vysokomolekulární komplexní polymery. Majoritní podíl těchto látek se vyskytuje ve formě glykosidů. Dle struktury jsou polyfenoly rozdělovány do několika základních skupin [9, 10, 11, 12].

3.1.1 Stanovení a HPLC separace fenolických sloučenin

K analýze rostlinných vzorků se zaměřením na fenolické látky je nejčastěji využívána kapalinová chromatografie, která umožňuje dělení složitých směsí, kterými rostlinné vzorky a extrakty z nich připravené bezpochyby jsou. Využívány jsou i různé způsoby detekce.

Při separaci fenolických látek je využíván nejčastěji systém kapalinové chromatografie s použitím kolon naplněných reverzní stacionární fází. Používané kolony mají délku 150 – 250 mm a vnitřní průměr 2,1, 3,0 a 4,6 mm. Stacionární fáze je nejčastěji tvořena částicemi silikagelu s navázanými uhlovodíkovými řetězci (C8, C18). Mobilní fázi tvoří většinou směs dvou kapalin – mírně kyselý vodný roztok (obsahující kyselinu octovou, mravenčí, trifluoroctovou) a organické rozpouštědlo. Slabě kyselé prostředí snižuje ionizaci analytů, a tím umožňuje zvýšit retenci polyfenolů (slabě kyselá látka) na koloně. Téměř vždy je zvolena gradientová eluce. Průtoková rychlost a dávkovaný objem vzorku závisí na použité stacionární fázi a velikosti kolony.

Detekce je nejčastěji kombinací DAD a fluorescenčních (FLD) či MS detektorů, méně jsou používány detektory elektrochemické. Využití DAD detektoru je umožněno přítomností aromatických kruhů ve struktuře těchto látek. FLD detektor lze použít u látek, které jsou schopné nativní fluorescence, případně fluorescence po vhodné derivatizaci. Tato skutečnost podmiňuje vyšší selektivitu stanovení daných látek. Do popředí se dostává také MS, ale jejímu využití v rutinní praxi brání nákladné přístrojové zařízení [15, 16].

Při použití HPLC lze docílit separace širokého spektra látek, čímž se tato metoda stává univerzální a snadno aplikovatelnou pro dělení složitějších směsí. Použitím systému HPLC s vybraným typem detekce lze získat kvalitativní i kvantitativních údaje.

Nejčastěji analyzovanými vzorky jsou čerstvé ovoce, zelenina, červené víno, pivo a rostlinné oleje. V nedávné době byla pozornost obrácena také k průmyslově zpracovaným produktům, jako jsou ovocné a zeleninové džusy a šťávy případně výlisky nebo sušené ovoce.

Studie uvedené v Tabulce č. 1 byly zaměřené na stanovení fenolických látek v materiálech rostlinného původu. Tyto studie poukazují na možnost využít pro úpravu vzorku různé metody, ale převážně byla aplikována extrakce rozpouštědly s danou polaritou pro stanovení vybraných extrahovaných látek.

Pro samotnou separaci vzorků byla ve všech případech použita kapalinová chromatografie v reverzně-fázovém módu. Separace probíhaly na kolonách, které obsahovaly sorbent s navázanými C18 nebo C8 uhlovodíky. Délka kolon byla od 100 mm do 250 mm. Delší kolony a rostoucí počet sledovaných analytů měly vliv na celkový čas separací, který se pohyboval v řádu desítek minut. Uvedené studie ukazují, že pro detekci fenolických látek lze využít různých typů detektorů a jejich kombinací.

Tabulka 1 Přehled separačních podmínek z předěšých studií

Stanovované látky	Materiál	Úprava vzorku	Typ kolony a stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Délka analýzy	Zdroj
70 polyfenolů	Komerčně dostupné džusy: jahodový, pomerančový, jablčíný, hroznový, borůvkový, brusinkový, višňový	Zředění, centrifugace	Zorbax SB-C18 (3,5 μm, 150 × 4,6 mm)	A - kyselina mravenčí / voda B - kyselina mravenčí / acetonitril / voda	PDA FLD	28 min	[11]
Kyselina gallová, vanilová, kávová, syringová, ferulová, katechin, kvercetin, kvercitrin, kaempferol, myricetin, trans-resveratrol, epikatechin, kyselina protokatechová, 2,5-dihydroxybenzaldehyd	Hroznové víno	Extrakce diethyletherem	Nova-Pak C18 (4 μm, 150 × 3,9 mm)	A - kyselina octová / voda B - kyselina octová / voda / methanol	DAD FLD	35 min	[17]
Kyselina gallová, kávová, syringová, chlorogenová, katechin, 3,4-dihydroxybenzoovou, kvercetin, rutin, kaempferol, epikatechin, myricetin, resveratrol, kyselina 4-hydroxybenzoová a kyselina p-kumarová	Červené víno	Extrakce ethyl acetátem	Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μm, 250 × 4,6 mm)	A - Kyselina mravenčí B - Methanol C - Voda	DAD FLD	24 min	[18]

Stanovované látky	Material	Úprava vzorku	Typ kolony a stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Délka analýzy	Zdroj
Kyselina gallová, kávová, syringová, chlorogenová, ferulová, skořicová, feruloin, floridzin, katechin, kvercetin, epikatechin, prokyanidin B1 a B2, isorhamnetin, kyselina p-kumarová, kyselina hydroxybenzoová, 5-hydroxymethyl furfural	Jablečná šťáva Sušená jablka Čerstvé hrušky	Extrakce ethyl acetátem	Aqua C18 (5 µm, 250 x 4,6mm)	A - Kyselina octová/voda B - Kyselina octová/ voda/ acetonitril	DAD MS	60 min	[19]
Kyselina chlorogenová, ferulová, floretin, kyselina kumarová, kyselina kávová a skořicová, kvercetin, rutin, floridzin	Jablka	Extrakce ethanolom v ultrazvukové lázni	Luna C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm)	A- Kyselina octová/ voda B - Kyselina octová/ voda/ methanol	DAD	40 min	[20]
Kyselina chlorogenová, katechin epikatechin, kvercetin-3-O-rannosid	Sušená jablka	Extrakce methanolem v ultrazvukové lázni Mikrovlátná extrakce	Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A - Kyselina mravenci / voda B - Acetonitril	DAD	20 min	[21]
Kyselina chlorogenová, kávová, protokatechová, homovanilová, rutin, floridzin	Jablka	Tlaková extrakce vroucí vodou	Ascentis Expres C18 (2,7 µm, 150 x 2,1 mm)	A - Mravenčan amonny/voda B - methanol s kyselinou mravenci	DAD CAD ECD	40 min	[22]

Stanovované látky	Materiál	Úprava vzorku	Typ kolony a stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Délka analýzy	Zdroj
5-O-kafeoylchinová kyselina, 4-O-kafeoylchinová kyselina, prokyanidin, isovitexin, agrimoniin, kaempferol, 3 O p kumaroylchinová kyselina, katechin, prokyanidin B3, glukuronid luteolinu, kvercetin, rhamnoglukosid, luteolin malonylhexosid, apigenin-7-O-glukuronid, apigenin-7-O-glukosid, kvercetin-3-O rhamnoglukosid, kvercetin-3-O-galaktosid, kvercetin-3-O-rhamnosid kvercetin-3-O-glukosid, luteolin 7 O glukosid, kaempferol-3-O-glukosid, kaempferol malonylhexosid	Řepík lékařský	Extrakce vroucí vodou	Kinetex C8 (1,7 µm, 100 x 2,1 mm)	A - Kyselina mravenčí/voda B - kyselina mravenčí/acetoniitril	DAD CAD MS ³	40 min	[23]

3.1.2 Význam fenolických sloučenin

Fenolické sloučeniny jsou důležité pro růst a ochranu rostlin proti UV záření, patogenním mikroorganismům a predátorům. Dále ovlivňují sensorické vlastnosti plodů [8]. Obsah fenolických látek v plodech a následně v průmyslově zpracovaných produktech rostlinného původu je ovlivněn typem odrůdy, podmínkami pěstování, skladování a průmyslového zpracování.

Fenolické látky se řadí mezi látky s antioxidační aktivitou. Tato aktivita je závislá na struktuře jednotlivých látek, zejména na počtu a pozici hydroxylových skupin a typu substitucí na aromatických kruzích.

3.2 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita hraje důležitou roli mezi příznivými biologickými účinky potravin na zdraví člověka. V rostlinných materiálech bylo zjištěno přes pět tisíc druhů fytonutrientů, tj. faktorů s mikronutriční aktivitou, které ovlivňují řadu biochemických pochodů. Rozhodující je jejich schopnost působit již v malých koncentracích na intracelulární úrovni a zpomalovat nebo rušit nežádoucí oxidační reakce. Je to dáno relativně vyšším oxidačně–redukčním potenciálem, schopností rychle odstranit reaktivní formy kyslíku a další volné radikály, schopností vázat katalyticky aktivní prvky do neaktivních komplexů, redukovat meziprodukty řetězových oxidačních změn nebo stimulovat aktivity endogenních antioxidačních enzymů [24].

3.2.1 Nejčastější metody stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivitu látek lze změřit metodami jednak chemickými a jednak fyzikálními. Chemické metody mohou být založeny na použití činidel, které poskytují s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zbarvení se většinou měří spektrofotometricky [26].

Jednou ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity je metoda využívající zhášení radikálového kationu ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)]. Radikál kationtu se připravuje reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem v poměru 2:1 za vzniku modrozeleného roztoku, jehož zbarvení je měřitelné při 734 nm. Vlivem antioxidantů dochází k odbarvení modrozelené reakční směsi, přičemž úbytek absorbance je úměrný antioxidační aktivitě [25, 26].

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí látek byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (Total Antioxidant Activity). Existuje velké množství metod pro stanovení TAA, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity). Antioxidační aktivita se vyjadřuje jako poměr antioxidačního účinku vzorku k 1,0 mmol/l roztoku Troloxu - ve vodě rozpustné formy vitamínu E [25, 27].

Pro měření antioxidační aktivity lze také využít metody založené na zhášení

fluorescence. Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) a metoda FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) jsou založené na principu redoxní reakce, kde je u antioxidantu měřena spíše redukční schopnost. Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů, které jsou téměř bezbarvé a po redukci vytváří fialové produkty měřitelné spektrofotometricky při 793 nm [25].

3.3 Metody pro chemickou analýzu a identifikaci fenolických látek

Fenolické látky představují širokou skupinu biologicky aktivních látek. V současnosti je známo více než 8000 různých struktur, které patří do této skupiny [28]. Náročnost stanovení těchto látek spočívá právě v jejich strukturální různorodosti a jejich vzájemné podobnosti v jednotlivých skupinách. Z tohoto důvodu většinou není možná separace a jednoznačná identifikace všech látek pomocí jediné separační metody. Pouze specifické analyty nebo skupiny analytů typické pro daný typ vzorku, které se zároveň dostatečně liší svými vlastnostmi, mohou být separované a detekované jednou analytickou metodou. Navíc, rostlinné vzorky a extrakty se vyznačují velmi bohatým zastoupením dalších obsahových látek, které tvoří takzvanou matici. Patří sem polysacharidy, fytoosteroly, proteiny, vitamíny, stopové prvky a další látky. Z těchto důvodů se při vývoji separační metody klade důraz na zvýšenou separační účinnost, selektivitu detekce a citlivost stanovení.

Vzhledem ke skutečnosti, že fenolické látky mají schopnost absorbovat UV záření, standardní UV detekce při jedné vlnové délce není pro jejich analýzu dostatečně selektivní. Jejich absorpční spektra jsou velmi podobná, a navíc je nutné jejich odlišení od matrice obsahující celou řadu dalších látek. Proto UV detekce při jedné vlnové délce není dostatečná pro odhalení možné koeluce strukturálně podobných látek [29]. Pro úspěšnou analýzu je tedy nutný výběr citlivé a selektivní detekční techniky jako např. DAD, elektrochemická nebo MS detekce [30]. Dále je možné využít spojení detekčních technik, jejichž kombinace přináší výhody různých detekčních principů pro řešení problémů se selektivitou stanovení.

Z dosud publikovaných prací je zřejmé, že využití DAD jako samostatné detekční techniky pro hodnocení obsahu fenolických látek v různých druzích ovoce, zeleniny a dalších rostlin je velmi běžné [31-35]. Také spojení separace s MS, elektrochemickou detekcí (ECD) nebo CAD detekcí je pro tyto analýzy typické [30, 36-39]. Pro citlivé stanovení látek obsahujících fluorofory, jako jsou kyselina gallová a epikatechin, může být využito FLD detekce [40]. Potvrzení specifického složení směsí fenolických látek bývá založeno na MS detekci. Pro další identifikaci látek se využívá MS/MS fragmentace, zejména když nejsou k dispozici příslušné standardy těchto látek. Na druhou stranu, MS identifikace a kvantifikace látek ve složitém rostlinném extraktu je často spojená s neočekávanými maticovými efekty a pak je potřeba využít izotopicky značené standardy, což zvyšuje cenu takové analýzy.

DAD detekce umožňuje současný sběr dat napříč celým UV-VIS spektrem. Získané výsledky ve formě 3D grafu mohou být využity pro kontrolu čistoty píku a tím i k odhalení možné koeluce látek. Fenolické sloučeniny mají ve své struktuře

minimálně jeden aromatický kruh, což umožňuje UV-DAD detekci při specifických vlnových délkách. Také je možné zkombinovat DAD detekci s dalším detektorem založeným na jiném detekčním principu.

Další spektrální metodou, která se využívá pro detekci některých fenolických látek je FLD. Hlavní výhodou je nastavení excitační a emisní vlnové délky a tímto způsobem zlepšení selektivity, ale také citlivosti detekce v porovnání s DAD detekcí. Ze skupiny běžně se vyskytujících fenolických látek může být FLD detekce použita pro stanovení kyseliny gallové a katechinu/epikatechinu.

Kromě spektrálních metod může být využita také CAD detekce. Její hlavní výhodou je kvantifikace netěkavých analytů včetně těch, které nevykazují výraznější absorpci v UV spektru. Dále je tato detekce nezávislá na spektrálních a chemických vlastnostech látek a je vhodná pro neutrální, bazické i kyselé, a také velmi polární analyty. Všeobecnou nevýhodou CAD detekce je absence spektrálních dat a tím možností lepšího rozlišení jednotlivých látek, což může být vyřešeno spojením s DAD detekcí.

Dalším přístupem je využití ECD detekce (CoulArray), která patří do skupiny elektrochemických detekčních metod. Tento typ umožňuje detekci všech oxidovatelných látek ve vzorku, takže je velmi citlivý pro stanovení elektro-aktivních látek. Každá látka ve vzorku, která může být oxidovaná na detekční elektrodě, tedy potenciální antioxidant, poskytuje určitý signál. Takto je získána další informace nejen o identifikovaných fenolických látkách, ale také o dalších látkách, které nemusí být jednoznačně identifikované, ale přesto vykazují antioxidační aktivitu. Tak je zjištěn celkový obsah látek s antioxidační aktivitou v daném vzorku.

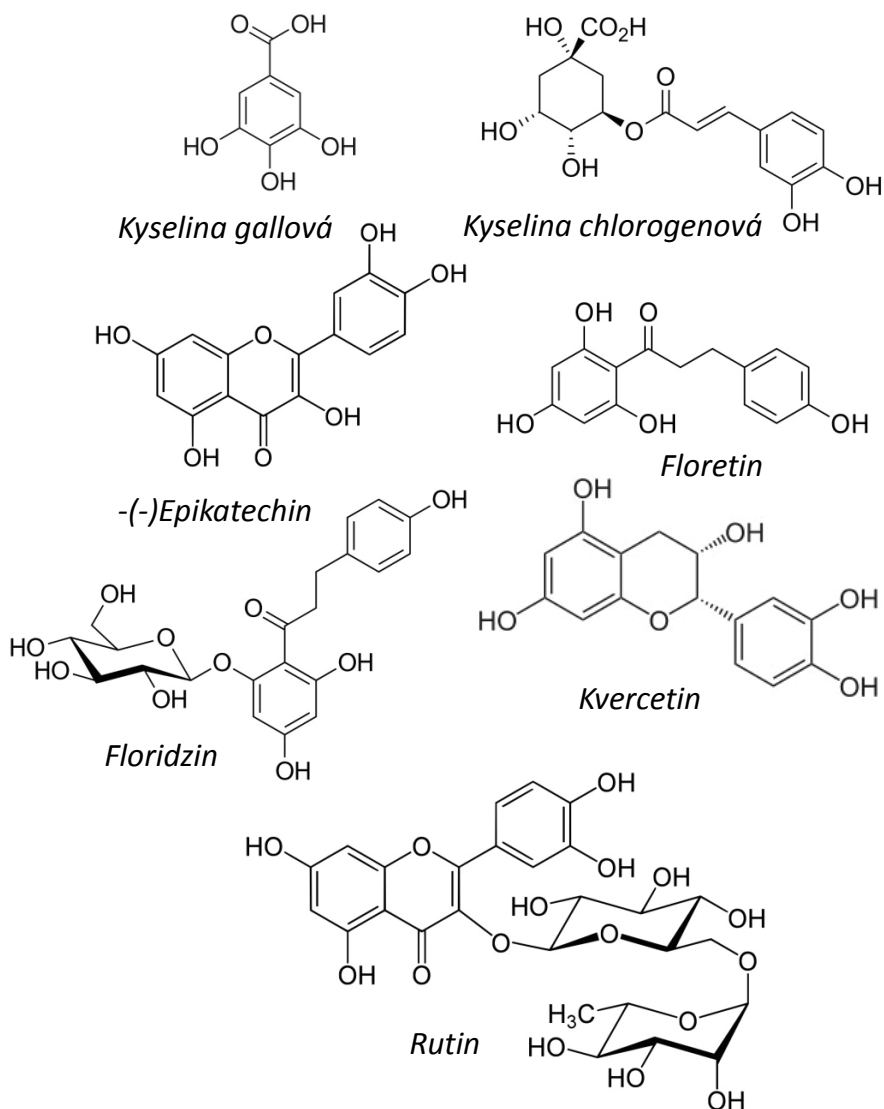
3.3.1 Stanovované fenolické látky

Pro stanovení fenolických látek v čerstvých jablkách byly vybrány tyto hlavní obsahové sloučeniny: kyselina gallová, kyselina chlorogenová, (-)-epikatechin, rutin, floridzin, kvercetin a floretin. Jedná se o aglykony (kyselina gallová, (-)-epikatechin, kvercetin, floretin), estery kyselin (kyselina chlorogenová) a o glykosidy (floridzin a rutin). Struktury těchto látek jsou ukázány v Obrázku 1.

Kyselina gallová se řadí mezi fenolové kyseliny. Jedná se o derivát kyseliny benzoové obsahující hydroxylové skupiny v pozicích 3, 4 a 5. Kyselina gallová tvoří základní jednotku hydrolyzovaných taninů, zároveň má antiangiogenní, antioxidační a antikancerogenní účinky [41-43].

Kyselina chlorogenová je ester kyseliny chinové a kávové. Vysoký obsah této sloučeniny mají kávová zrna. V jablcích je tato sloučenina hlavní obsahovou látkou s antioxidačními vlastnostmi. Tato kyselina má široké spektrum pozitivních účinků na lidský organismus od antioxidační aktivity po ovlivnění metabolismu lipidů a glukózy [41, 42, 44].

(-)-Epikatechin je antioxidant zařazený mezi flavonoly. Vyskytuje se v mnoha druzích rostlin, v ovoci i v zelenině. Příkladem zdroje flavonolů je zelený čaj, kakao, čokoláda nebo červené víno [41, 42].



Obrázek 1. Struktury vybraných fenolických látek stanovených v jablkách [41]

Rutin je řazen mezi flavonoly. Jedná se o glykosid vytvořený spojením kvercetinu a rutinózy. Účinně vychytává NO a snižuje fragilitu kapilár. Tento flavonoid se nachází v mnoha rostlinách, v ovoci i zelenině [41, 42].

Floridzin, floretin glykosylovaný β -D-glukopyranózou, se řadí mezi dihydrochalkony. Mimo antioxidantních a dalších vlastností společných pro většinu flavonoidů působí floridzin jako kompetitivní inhibitor renální reabsorpce glukózy. Je obsažen v jablečných slupkách [41, 42].

Kvercetin je zástupcem skupiny flavonolů. Při konzumaci stravy bohaté na kvercetin, má tento flavonoid významné protirakovinné a antioxidantní účinky, dále příznivě ovlivňuje agregaci trombocytů, inhibuje oxidaci LDL lipoproteinů a snižuje plazmatickou hladinu lipidů. Díky těmto vlastnostem má kvercetin protektivní účinky na kardiovaskulární systém [41, 44, 45].

Floretin je aglykon floridzinu a řadí se rovněž mezi dihydrochalkony. Je obsažen v jablkách, hruškách a rajčatech. Uplatňuje se při vychytávání peroxynitritu a inhibici peroxidace lipidů. Dále je mu připisována schopnost inhibovat růst několika typů rakovinových buněk a indukovat apoptózu u buněk leukemických a buněk melanomu [41, 42].

3.3.2 Analyzované vzorky

Stanovení obsahových látek bylo provedeno u 16 odrůd a 11 novošlechtění. K chemickým analýzám vybraných obsahových látek byly vybrány tyto odrůdy a novošlechtění 'Santana', 'Angold', 'Artiga', 'Golden Delicious', 'Lady Silvia', 'Melrose', 'Meteor', 'Red Jonaprince', 'Reluga', 'Rubinstep', 'Topaz', 'Benet', 'Golida', 'Jarka', 'Resista', 'Rubinola', 'HL 53', 'HL 72', 'HL 207', 'HL 648', 'HL 1194', 'HL 1199', 'HL 1343', 'HL 1592', 'HL 1651', 'HL 2010' a 'HL 2350'. Jablka pocházela z výsadby Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy, s.r.o. Jablka byla sklizena v termínu od 11. září do 18. října 2018, v době optimální zralosti plodů. Vzorky byly před samotným zpracováním do podoby extraktu skladované po dobu 3 měsíců v lednici při teplotě 3-5°C.

3.3.3 Chemikálie a činidla

V naší studii byly využity tyto standardy fenolických látek: kyselina gallová (97,5-102,5%), kyselina chlorogenová ($\geq 95\%$), (-)epikatechin ($\geq 90\%$), rutin hydrát ($\geq 94\%$), kvercetin ($\geq 95\%$), floridzin ($\geq 99\%$), floretin ($\geq 99\%$). Všechny pocházely od dodavatele Sigma Aldrich (Praha). Dále byla použita rozpouštědla kvality „HPLC-grade“ acetonitril (ACN) a methanol (MeOH), obě od dodavatele Sigma Aldrich (Praha). Kyselina octová ($\geq 99\%$), kyselina mravenčí ($\geq 95\%$) a octan sodný byly dodány také firmou Sigma Aldrich (Praha). Všechny použité chemikálie odpovídaly čistotě p.a. Ultra-čistá voda byla vyrobena přístrojem Milli-Q (Millipore, USA). Dusík plyn 5.0 v čistotě 99.999% pro CAD detekci byl dodán firmou Linde gas (CZ). Činidla pro stanovení TAA - (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Trolox) a 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) byla dodána firmou Sigma Aldrich (Praha).

Zásobní roztoky standardů kyseliny gallové, floretinu, floridzinu, kvercetinu a rutinu byly připraveny rozpuštěním v extrakčním rozpouštědle v koncentraci

0,5 mg/ml. Zásobní roztok kyseliny chlorogenové byl připraven v koncentraci 2 mg/ml, roztok epikatechinu 1 mg/ml, oba také v extrakčním rozpouštědle. Všechny zásobní roztoky byly před použitím uchovávány při 4 °C a ve tmě.

Směsný roztok standardů byl připraven smísením 10 µl zásobního roztoku každého standardu a doplněním do 1 ml extrakčním rozpouštědlem. Výsledné koncentrace analytů ve směsném roztoku byly 5 µg/ml pro kyselinu gallovou, rutin, floridzin, kvercetin a floretin, 20 µg/ml pro kyselinu chlorogenovou a 10 µg/ml pro epikatechin. Tyto koncentrace byly zvoleny podle očekávaného obsahu analytů v jablečných extraktech. Směsný standard byl použit pro optimalizaci metody. Na test vhodnosti chromatografického systému byl použit směsný standard o koncentraci 5 µg/ml.

Extrakční rozpouštědlo bylo připraveno smísením methanolu s kyselinou octovou. Výsledný obsah kyseliny octové v methanolu byl 0,1% v/v. Octanový pufr pro CoulArray detekci byl připraven v 10 mmol/l koncentraci. Hodnota pH pufru byla upravena kyselinou mravenčí na 3,0 a roztok byl zfiltrován membránovým filtrem s póry o průměru 0,22 µm.

3.3.4 Příprava vzorku

Reprezentativní vzorek určité odrůdy a novošlechtění byl připraven homogenizací 3-5 plodů včetně slupky pomocí vysokootáčkového stolního mixéru Sencor (Praha). Dále bylo odváženo množství 3 g homogenátu a vloženo do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. K homogenátu bylo přidáno 15 ml extrakčního rozpouštědla, methanol s kyselinou octovou 0,1% (v/v), a zkumavka byla umístěna na 10 min do ultrazvukové lázně. Po extrakci proběhla centrifugace po dobu 10 min při 4400 G a 4 °C, získaný supernatant byl přefiltrován přes teflonový filtr s velikostí pórů 0,45 µm a roztok byl před vlastní analýzou uchováván při 4 °C.

3.4 Chemická analýza fenolických látek

3.4.1 HPLC-DAD-CAD

Pro analýzu fenolických profilů byl použit HPLC/UHPLC systém od Thermo Scientific, Dionex UltiMate™ 3000 RSLC system (Kalifornie, USA) složený z binárního čerpadla, autosampleru, kolonového termostatu, „diode array“ detektoru (DAD) a detektoru nabitého aerosolu (CAD) - Corona ultra (ESA Biosciences, part of Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Ovládání systému, sběr a zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru Dionex-Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (Thermo Fischer Scientific, CA, USA).

Pro separaci fenolických látek byla použita analytická kolona Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s předkolonou Ascentis Express C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm). Separace byla provedena s využitím lineárního gradientu v němž složka A byla ultra-čistá voda okyselená na pH 2,8 kyselinou octovou a složka B acetonitril. Průběh gradientu byl následující: 0 min 10% B, 10 min 50% B, 10,2 min 10% B, 10,2-12,5 min 10% B při průtokové rychlosti 1 ml/min a teplotě 30 °C. DAD detekce byla hodnocena při těchto vlnových délkách: 254 nm (rutin), 280 nm (kyselina gallová,

epikatechin, floridzin, floretin), 320 nm (kyselina chlorogenová) a 365 nm (kvercetin). Stejný chromatografický systém byl použit také při CAD detekci, která byla spojena v tandemu s DAD detekcí. Nebulizátor CAD detektoru byl nastaven na 25°C. Teplota autosampleru byla nastavena na 10 °C pro udržení stability testovaných látek. Objem nastříkovaného vzorku byl 10 µl, aby byla dodržena dostatečná citlivost stanovení těchto látek. Identifikace fenolických sloučenin ve vzorku byla dosažena porovnáním retenčních časů se standardy a v případě DAD detekce také porovnáním absorpčních spekter v průběhu daného chromatografického píku. Koncentrace fenolických látek byly vyhodnoceny na základě integrované plochy píku identifikovaného analytu v jablečném extraktu porovnáním se standardem. Pro získání správných výsledků stanovení těchto látek byla využita „valley-to-valley“ integrace.

3.4.2 HPLC CoulArray

Pro CoulArray detekci elektro-aktivních látek byl využit 8-kanálový CoulArray 5600A detektor (ESA, Chelmsford, MA, USA). Tento detektor byl zapojen v HPLC/UHPLC systému LC Agilent 1260 Infinity (Kalifornie, USA), který obsahoval kvartérní čerpadlo a autosampler. Pro vyhodnocení získaných dat byl použit CoulArray 3.10 software. Použitá metoda odpovídala doporučení výrobce - maximální tlak 20 MPa a maximálně 50 % obsah organické složky v mobilní fázi. Na začátku analýzy proběhlo nulování detektoru a na konci analýzy čištění detekční cely. Potenciál 8-kanálového detektoru byl nastaven v rozsahu 200-900 mV s pravidelným přírůstkem 100 mV. Hodnota 200 mV zajistila oxidaci silně redukujících interferujících látek z matrice vzorku nebo z mobilní fáze. Vysoký potenciál do 900 mV pak zajistil oxidaci přirozeně se vyskytujících antioxidantů ve vzorcích jablečných extraktů. Vodivost mobilní fáze byla zajištěna obsahem octanového pufru o pH 3,0 upraveného kyselinou mravenčí, který tvořil složku A a acetonitril byl použit jako složka B v gradientové eluci. Pro separaci byl použit následující průběh gradientu: 0 min 5% B, 15 min 30% B, 25 min 50% B, 27 min 50% B, následován poklesem na 5% B pro ekvilibraci. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Separace probíhala na stejné koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) s předkolonou Ascentis Express C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm) při teplotě 35 °C. Byl rovněž použit stejný objem nastříkovaného vzorku 10 µl. Plochy píků získané z odezvy 8-kanálového detektoru byly hodnoceny jako suma pro porovnání celkového obsahu antioxidantů v jednotlivých odrůdách.

3.4.3 Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla hodnocena na základě tzv. „Trolox equivalent antioxidant capacity assay“ (TEAC) v 96-jamkových mikrotitračních destičkách se stejnými methanolickými jablečnými extrakty, které byly použity pro HPLC separaci. TEAC poskytuje informace o obsahu látek s antioxidační aktivitou. Míra antioxidační aktivity látek ve vzorku se standardně vyjadřuje jako množství Troloxu. Tímto způsobem je možné porovnávat jednotlivé druhy ovoce, zeleniny, či potravin. Pro vyhodnocení antioxidační aktivity byl použit radikál 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazylu

(DPPH). V průběhu analýzy bylo smíšeno 15 μl vzorku s 235 μl roztoku DPPH o koncentraci 610 $\mu\text{mol/l}$. Nejprve byla proměřena kalibrační závislost v rozsahu odpovídajícím očekávanému obsahu antioxidantů v jablečných extraktech. Kalibrace byla hodnocena s pomocí Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), 15 μl roztoku Troloxu s koncentrací v rozsahu 1-400 $\mu\text{mol/L}$ reagovalo s 235 μl roztoku DPPH. Mikrotitrační destičky s napipetovanými roztoky byly zakryty a ponechány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Absorbance byla poté změřena pomocí spektrofotometru EPOCH (BioTek), upraveného pro detekci v mikrotitračních destičkách (micro UV reader) při 515 nm proti slepému roztoku. Aktivita extraktů založená na vychytávání DPPH radikálu byla vynesena do grafu proti měnící se koncentraci Troloxu a výsledky byly vyjádřeny jako TEAC v jednotkách μg Trolox/ml jablečného extraktu. Každý extrakt byl proměřen třikrát a hodnocen byl průměr.

3.5 Porovnání metod na základě vybraných validačních parametrů

Test vhodnosti chromatografického systému byl hodnocen pro sedm testovaných fenolických látek v jablečném methanolickém extraktu. Validace proběhla v souladu s EMA doporučením [46]. Kvůli porovnání detekčních metod byl důraz kladen zejména na hlavní parametry detekce tedy lineární rozsah a limity detekce a kvantifikace.

3.5.1 Test vhodnosti systému

Pro vyhodnocení validačních parametrů v rámci testu vhodnosti chromatografického systému byl proveden šestkrát opakovaný nástřik směšného roztoku standardů. Vyvinutá chromatografická metoda byla charakterizována následujícími parametry: opakovatelnost retenčního času (t_R), opakovatelnost plochy píku, faktor symetrie (S), rozlišení (R_S), kapacita píku (PC) a retenční faktor (R_f). Shrnutí výsledků testu vhodnosti pro oba detektory (DAD a CAD) jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3.

3.5.2 Lineární rozsah, detekční a kvantifikační limit

Lineární rozsah vyvinuté metody byl testován v rozsahu 0,05 - 20 $\mu\text{g/ml}$ pro každý analyt. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí lineární regrese a metody nejmenších čtverců pro kalibrační závislost plochy píku dané látky na koncentraci. Testovaný kalibrační rozsah odpovídal očekávanému obsahu sedmi analyzovaných látek v jablečných extraktech. Každý bod kalibrační křivky byl změřen třikrát a pro vyhodnocení byla použita průměrná hodnota plochy. Nejnižší bod kalibrační křivky, který odpovídal 10-násobku signálu v porovnání s šumem základní linie byl vyhodnocen jako limit kvantifikace (LOQ). Detekční limit (LOD) byl vypočítán ze vztahu mezi LOQ a LOD limity, kdy LOD je odvozen jako 3,3-násobek signálu k šumu. Kalibrační křivky pro DAD detekci byly hodnoceny při třech vlnových délkách - 254, 280 a 320 nm. Výsledky získané pro oba detektory (DAD a CAD) jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5.

Tabulka 2 Test vhodnosti pro DAD detektor; 5 µg/ml, (n=6)

Analyt	Opakovatelnost						
	t_R^a (min)	t_R RSD (%)	Plocha píku RSD (%)	S ^b	R _S ^c	P _C ^d	R _f ^e
Kyselina gallová ^{280 nm}	2,81	0,16	0,20	0,91	-	139,89	0,63
Kyselina chlorogenová ^{320 nm}	4,47	0,00	0,62	0,96	17,64	126,00	1,60
Epikatechin ^{280 nm}	5,19	0,00	0,66	0,82	24,53	114,64	2,02
Rutin ^{254 nm}	6,09	0,15	0,44	0,94	9,48	139,89	2,54
Floridzin ^{280 nm}	7,60	0,11	0,16	0,87	21,90	114,64	3,42
Kvercetin ^{365 nm}	9,57	0,11	0,86	1,19	18,61	114,64	4,56
Floretin ^{280 nm}	10,48	0,10	0,53	0,91	26,56	114,64	5,09

^a retenční čas; ^b faktor symetrie; ^c rozlišení; ^d kapacita píku; ^e retenční faktor

Tabulka 3 Test vhodnosti pro CAD detektor; 5 µg/ml, (n=6)

Analyt	Opakovatelnost						
	t_R^a (min)	t_R RSD (%)	Plocha píku RSD (%)	S ^b	R _S ^c	P _C ^d	R _f ^e
Kyselina chlorogenová	4,50	0,42	0,40	0,93	18,75	126,00	1,62
Epikatechin	5,22	0,33	0,36	0,86	7,51	126,00	2,04
Rutin	6,12	0,25	0,42	0,95	9,66	157,25	2,56
Floridzin	7,64	0,20	0,67	0,87	15,93	126,00	3,44
Kvercetin	9,60	0,20	0,39	1,16	18,35	114,64	4,58
Floretin	10,51	0,16	0,09	0,91	8,54	126,00	5,11

^a retenční čas; ^b faktor symetrie; ^c rozlišení; ^d kapacita píku; ^e retenční faktor

Tabulka 4 Detekční a kvantifikační limit, lineární rozsah a parametry lineární regrese pro fenolické látky hodnocené pomocí DAD detekce

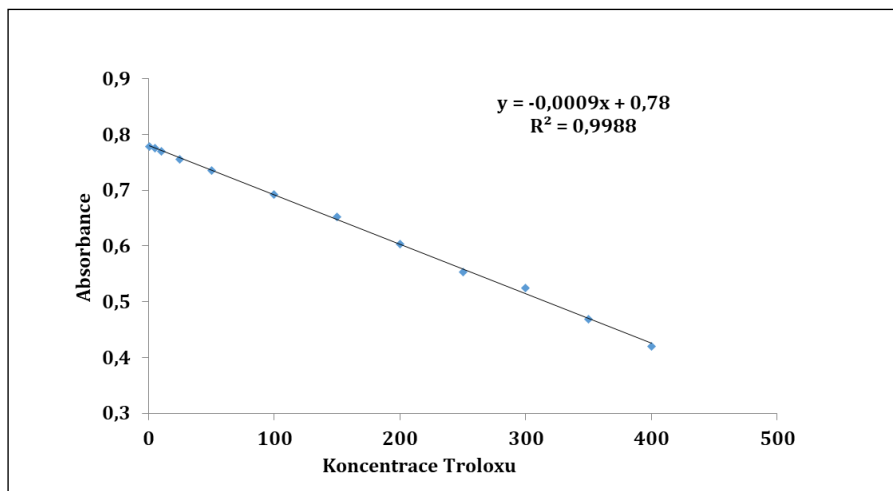
Analyt	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Lineární rozsah (µg/ml)	Rovnice kalibrace	R ²
Kyselina gallová ^a	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2405x - 0,0175	0,9992
Kyselina chlorogenová ^b	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2255x - 0,0342	0,9987
Epikatechin ^a	0,07	0,25	0,25 - 20	0,0882x - 0,0143	0,9992
Rutin ^c	0,07	0,25	0,25 - 20	0,1947x - 0,0217	0,9990
Floridzin ^a	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2175x - 0,0114	0,9992
Kvercetin ^c	0,03	0,10	0,10 - 20	0,3982x - 0,0908	0,9980
Floretin ^a	0,03	0,10	0,10 - 20	0,3793x - 0,0187	0,9992
Vlnová délka detekce: ^a 280 nm; ^b 320 nm; ^c 254 nm; R ² koeficient determinace					

Tabulka 5 Detekční a kvantifikační limit, lineární rozsah a parametry lineární regrese pro fenolické látky hodnocené pomocí CAD detekce

Analyt	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Lineární rozsah (µg/ml)	Rovnice kalibrace	R ²
Kyselina gallová	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0059x - 0,0044	0,9953
Kyselina chlorogenová	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0099x - 0,0063	0,9957
Epikatechin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0166x - 0,0067	0,9997
Rutin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0147x - 0,0039	0,9988
Floridzin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0196x - 0,0024	0,9996
Kvercetin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0230x - 0,0200	0,9874
Floretin	0,15	0,50	0,50 - 20	0,0224x - 0,0115	0,9997
R ² koeficient determinace					

3.5.3 Linearita TEAC stanovení

Pro testování linearity byly připraveny roztoky v koncentračním rozsahu 1–400 µg/ml. Testované kalibrační rozmezí odpovídalo očekávanému obsahu antioxidantů v jablečných extraktech. Každý bod kalibrační křivky byl změřen třikrát a pro vyhodnocení byla použita průměrná hodnota. Rovnice kalibrační závislosti a koeficient determinace jsou uvedeny na Obrázku 2.



Obrázek 2. Kalibrační křivka pro TEAC stanovení

3.6 Komentář k získaným výsledkům

3.6.1 Porovnání detekční technik

Cílem této metodiky bylo vyvinout screeningovou HPLC metodu pro rychlé stanovení vybraných fenolických látek v komplexní matici jablečného extraktu pomocí DAD a CAD detekce. Stanovení bylo provedeno pro detailní porovnání detekčních technik a jejich výhod, a naopak omezení ve vztahu k selektivitě a citlivosti hodnocení obsahu fenolických látek. Diskutovány byly také možnosti detekce z pohledu širokého rozsahu fyzikálně-chemických vlastností analytů a obsahu dalších látek v komplexní matici. Porovnání detekčních technik bylo provedeno na základě výsledků stanovení obsahu sledovaných látek v reálných vzorcích. Dále byly výsledky porovnány také s CoulArray (CA) detekcí a s konvenčním stanovením antioxidační aktivity (TEAC).

Při porovnání fenolických profilů jablečných extraktů získaných s DAD a CAD detekcí byly nalezeny dva hlavní trendy. V případě CAD detekce docházelo k nadhodnocení, resp. podhodnocení obsahu některých látek. V případě kyseliny chlorogenové byly nalezeny oba případy, vliv na rozdíl v obsahu nalezeném při použití CAD detekce mají zejména další obsahové látky eluované v blízkosti píku

kyseliny chlorogenové a není tak možné jejich rozlišení díky chybějícím spektrálním datům. Většina výsledků stanovení obsahu kyseliny chlorogenové byla ve srovnání s DAD detekcí podhodnocena. U odrůd 'HL 648', 'HL 1343', 'HL 2350', 'Melrose' a 'Red Jonaprince' bylo však nalezeno mírné nadhodnocení jejího obsahu. Tyto rozdíly jsou způsobeny dalšími minoritními složkami v jablečných extraktech jednotlivých odrůd, které ovlivňují signál univerzálního CAD detektoru. Navíc, u čtyř testovaných odrůd 'HL 1592', 'Meteor', 'Rubinstep' a 'Golida' byla kyselina chlorogenová detekována pomocí DAD detekce při 320 nm, ale CAD detektor její obsah vůbec nezaznamenal. Pokud byla kyselina chlorogenová nalezena pouze v nízkých koncentracích s pomocí DAD detektoru, pak byl u CAD detekce její signál překryt dalšími obsahovými látkami a nebylo ji tedy možné pomocí CAD detekce vyhodnotit. Pouze pokud byl její signál u DAD detekce při 320 nm vyšší, její pík bylo možné snadno vyhodnotit i se záznamu CAD detektoru. Na základě těchto výsledků je možné konstatovat, že DAD detekce kyseliny chlorogenové při 320 nm je přesnější a zároveň dostatečně citlivá pro její stanovení v komplexní matici jablečného extraktu, i když je její obsah u některých odrůd relativně nízký.

V případě stanovení epikatechinu a rutinu bylo pozorováno nadhodnocení jejich obsahu v porovnání s DAD detekcí. Získané výsledky z CAD detekce pak byly výrazně vyšší než u DAD detektoru. Stejně tak byl nadhodnocen obsah floridzinu v šesti odrůdách 'HL 53', 'HL 72', 'Red Jonaprince', 'Rubinstep', 'Benet' a 'Golida'.

Obecně byly výsledky získané s CAD detekcí vyšší v porovnání s DAD. Hlavním důvodem je nedostatečné rozlišení dalších obsahových látek a nižší citlivost univerzální CAD detekce, která vede ke snadnému překrývání signálů jednotlivých látek. Například pro dostatečné rozlišení neidentifikovaných látek eluovaných mezi 6. a 8. minutou, tedy blízko retenčního času floridzinu, by bylo potřeba daleko delší separace pro jeho dostatečné odlišení a tím také přesné stanovení jeho obsahu pomocí CAD detekce.

3.6.2 HPLC analýza jablečných extraktů

Porovnání výsledků stanovení obsahu vybraných fenolických látek a také jejich celkového obsahu vyhodnoceného DAD a CAD detekcí je shrnuto v Tabulce 6.

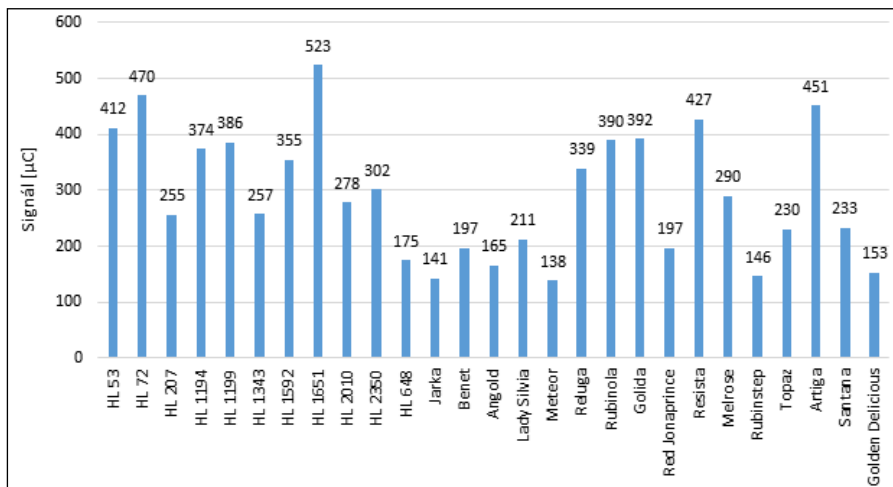
Tabulka 6 Obsah vybraných fenolických látek a jejich celkový obsah stanovené pomocí DAD a CAD detekce vyhodnocené v µg/g (n=3)

Odrůda	Kyselina chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Floridzin		Kvercetin		TOTAL	
	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD		
	320 nm		280 nm		254 nm		280 nm		365 nm		DAD	CAD
'HL 53'	15,92	13,23	2,26	10,48	5,55	14,87	3,43	8,95	1,30	0,00	28,46	47,54
'HL 72'	20,36	20,11	7,21	15,02	6,19	10,57	4,02	10,13	1,23	0,00	39,02	55,83
'HL 207'	30,54	28,75	3,24	9,89	3,24	8,23	3,03	<LOQ	0,00	0,00	40,04	46,87
'HL 648'	11,16	14,20	2,07	10,78	5,32	10,41	1,75	<LOQ	0,00	0,00	20,29	35,39
'HL 1194'	28,89	27,66	10,44	17,25	3,22	9,49	3,20	5,57	1,19	0,00	46,94	59,98
'HL 1199'	23,21	19,38	14,99	17,15	1,55	<LOQ	4,30	<LOQ	1,16	0,00	45,21	36,53
'HL 1343'	3,83	6,86	5,38	6,87	1,76	<LOQ	1,14	<LOQ	1,17	0,00	13,28	13,72
'HL 1592'	4,07	0,00	2,89	9,15	6,62	12,08	2,17	<LOQ	1,16	0,00	16,91	21,23
'HL 1651'	93,19	72,65	11,70	29,80	5,86	20,77	13,62	14,29	0,00	0,00	124,38	137,51
'HL 2010'	84,44	82,90	0,00	0,00	1,47	<LOQ	5,49	5,72	0,00	0,00	91,39	88,62
'HL 2350'	5,04	6,30	22,99	24,71	1,88	<LOQ	2,45	<LOQ	1,28	0,00	33,65	31,01
'Santana'	21,98	19,99	0,00	<LOQ	2,78	<LOQ	3,58	<LOQ	1,19	0,00	29,53	19,99
'Angold'	27,11	26,92	0,00	<LOQ	3,63	8,44	2,57	<LOQ	0,00	0,00	33,32	35,36

Odrůda	Kyselina chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Floridzin		Kvercetin		TOTAL	
	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD		
	320 nm		280 nm		254 nm		280 nm		365 nm		TOTAL	
	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD	DAD	CAD		
'Lady Silvia'	13,99	12,74	10,30	7,91	<LOQ	<LOQ	3,21	<LOQ	1,20	0,00	28,70	20,65
'Melrose'	11,70	12,07	1,52	9,68	1,40	<LOQ	4,66	5,01	1,19	0,00	20,48	26,75
'Meteor'	2,61	0,00	0,00	7,77	2,60	<LOQ	1,82	<LOQ	0,00	0,00	7,03	7,77
'Red Jonaprince'	10,11	10,92	0,00	<LOQ	0,80	<LOQ	2,41	5,06	0,00	0,00	13,32	15,99
'Reluga'	3,93	<LOQ	13,61	18,27	3,54	5,11	3,32	<LOQ	1,21	0,00	25,60	23,38
'Rubinstep'	6,73	0,00	3,39	<LOQ	1,45	<LOQ	2,17	5,76	1,18	0,00	14,93	5,76
'Topaz'	6,04	5,19	3,90	7,70	2,89	<LOQ	1,23	<LOQ	0,00	0,00	14,06	12,89
'Benet'	15,90	15,04	0,00	11,89	2,48	12,24	5,94	13,58	0,00	0,00	24,33	52,74
'Gollida'	2,06	0,00	6,66	17,17	8,91	14,91	2,55	12,04	1,20	0,00	21,38	44,12
'Jarka'	15,36	15,98	1,82	12,54	2,80	9,49	2,85	9,46	1,22	0,00	24,04	47,47
'Resista'	12,50	11,84	2,64	33,65	8,99	24,90	5,96	6,35	1,25	0,00	31,35	76,75
'Rubinola'	77,72	69,02	19,38	19,04	<LOQ	0,00	7,81	7,86	0,00	0,00	104,91	95,92

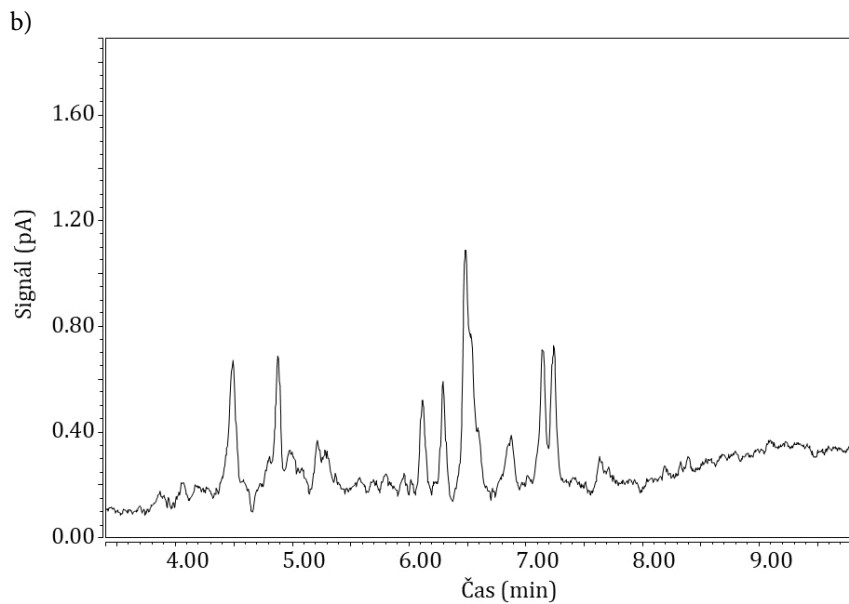
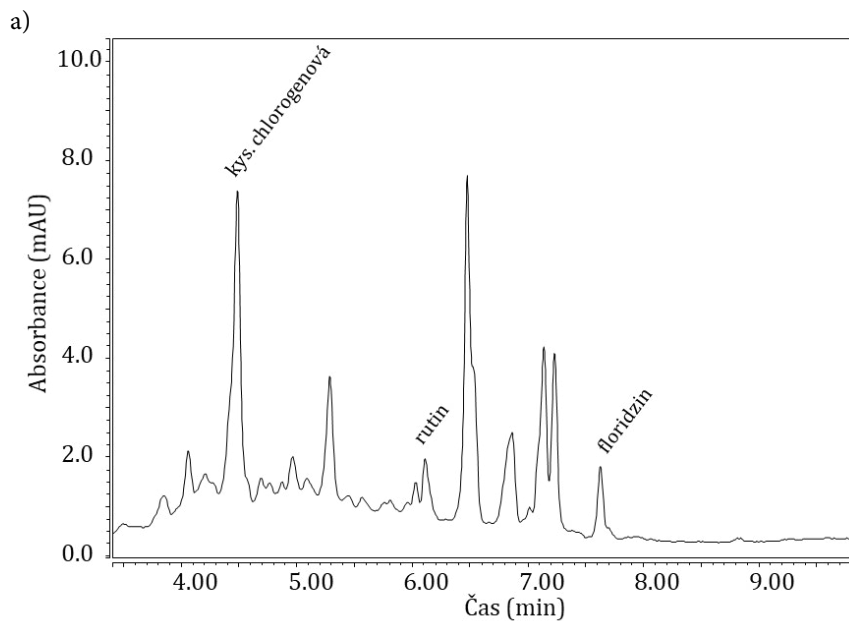
3.6.3 CoulArray analýza jablečných extraktů

Výsledky získané s CA detekcí jsou shrnuty na Obrázku 3. Jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými testovanými odrůdami a vyšší obsah látek s antioxidační aktivitou u odrůd 'HL 1651', 'HL 72', 'Artiga', 'Resista' a 'HL 53', u kterých je obsah vyšší než 400 μC . Při porovnání celkového obsahu látek hodnocených pomocí DAD a CAD detekce je zřejmé, že tyto odrůdy patří také ve většině případů k odrůdám s vyšším obsahem fenolických látek, ale ne vždy je korelace těchto výsledků jasná. Je to dáno různou antioxidační aktivitou jednotlivých látek, kdy i nižší obsah látky s vyšší aktivitou vede k nárůstu signálu CA detektoru, zatímco při DAD a CAD detekci je zjištěn pouze její nízký obsah.

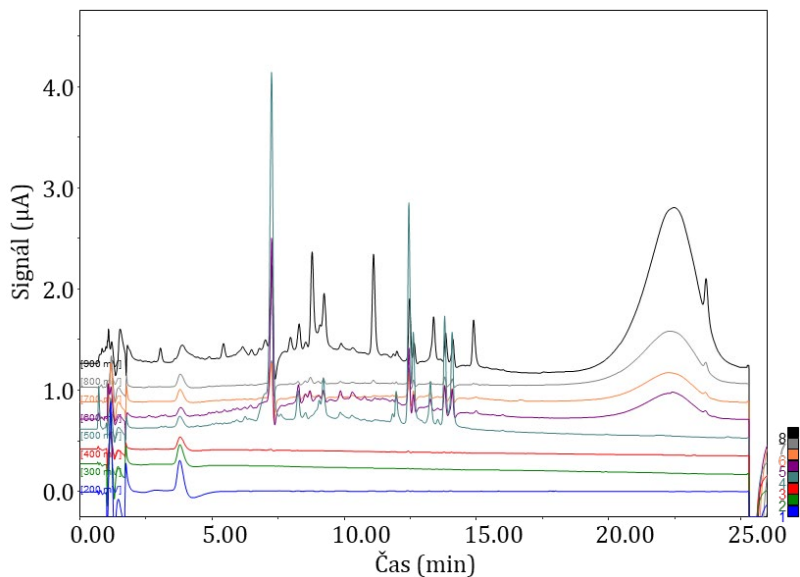


Obrázek 3. Výsledky stanovení celkového obsahu látek s antioxidační aktivitou hodnocené pomocí CoulArray detekce

Pro ilustraci získaných výsledků jsou na následujících Obrázcích 4-10 uvedeny chromatogramy separace fenolických látek a stanovení antioxidační aktivity u vybraných odrůd.

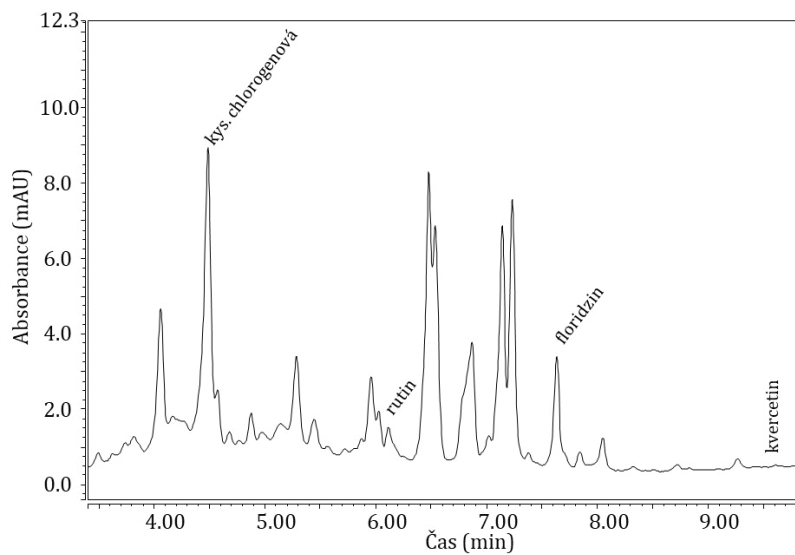


c)

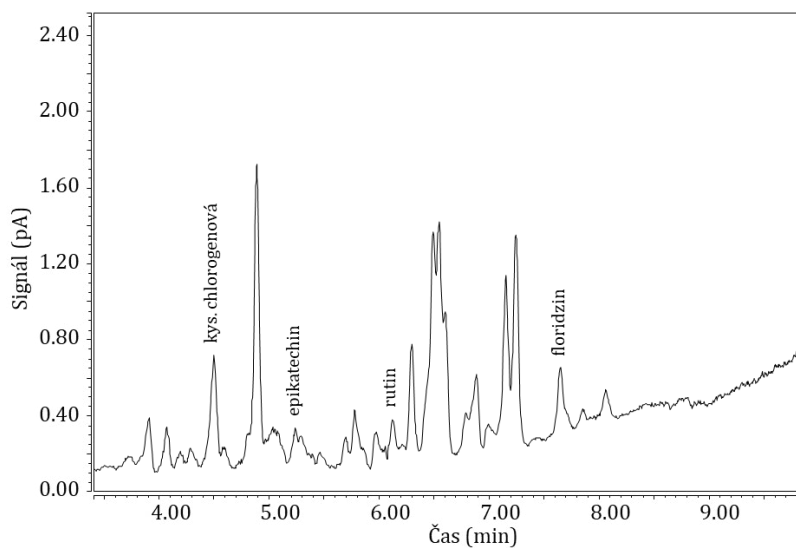


Obrázek 4. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'Angold'; a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce

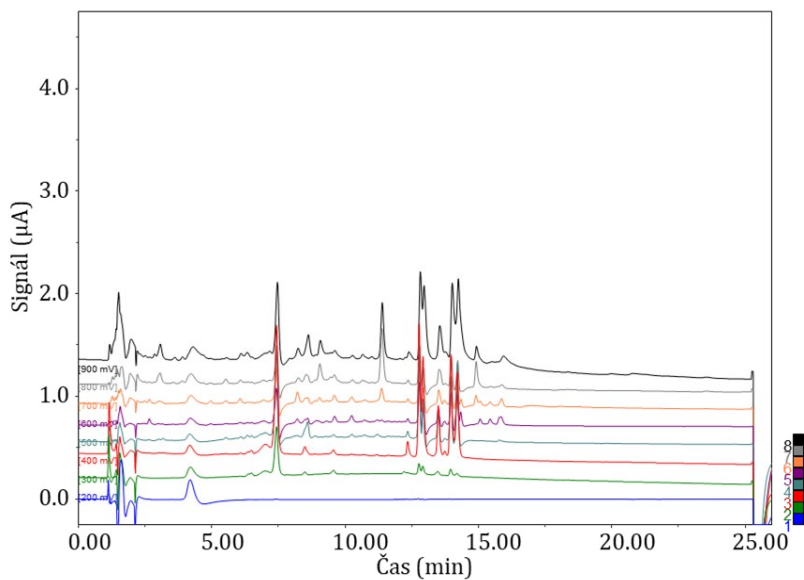
a)



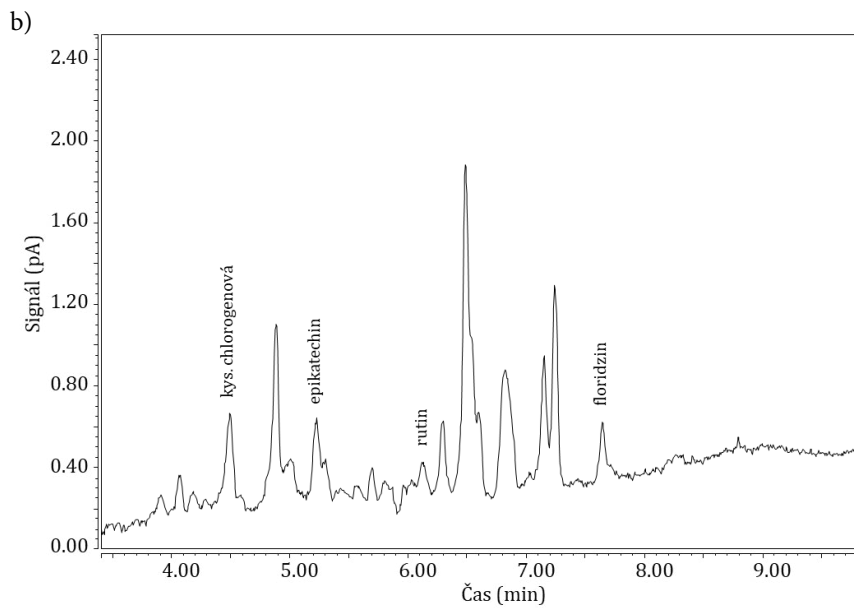
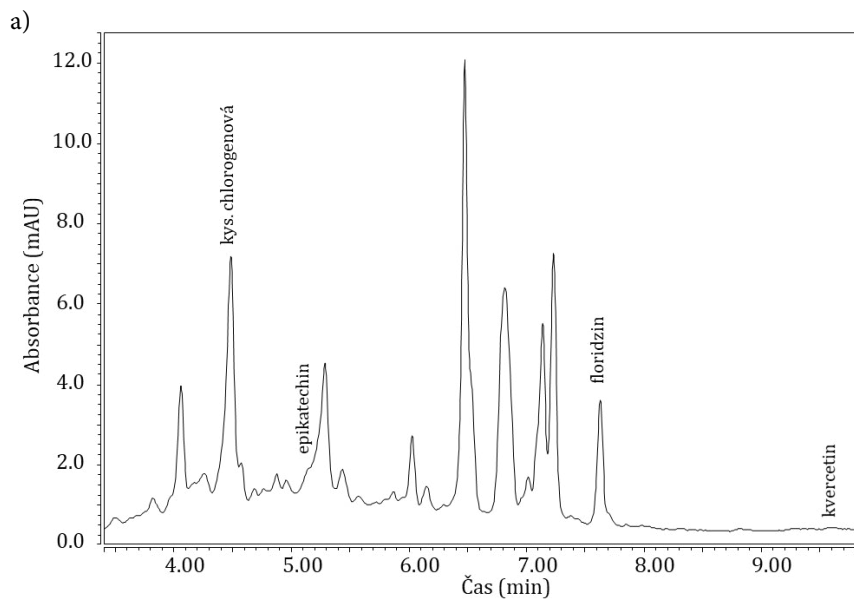
b)



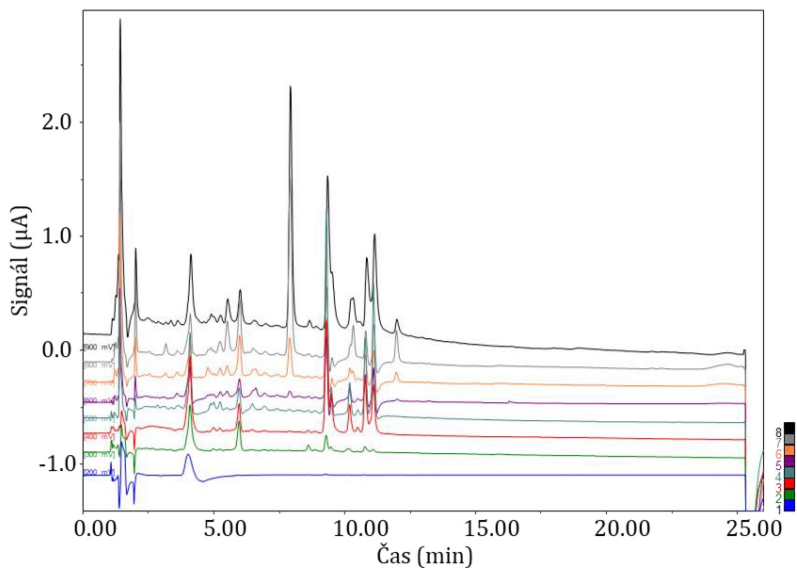
c)



Obrázek 5. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'Santana'; a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce

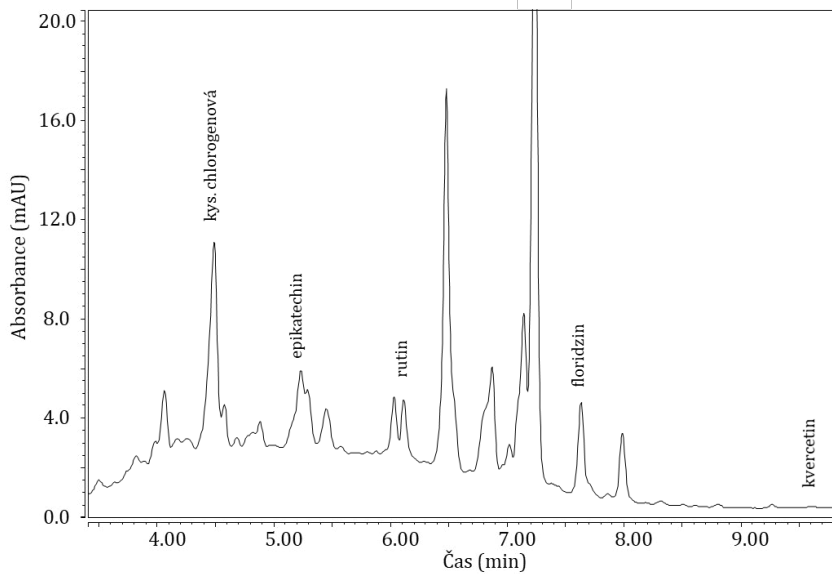


c)

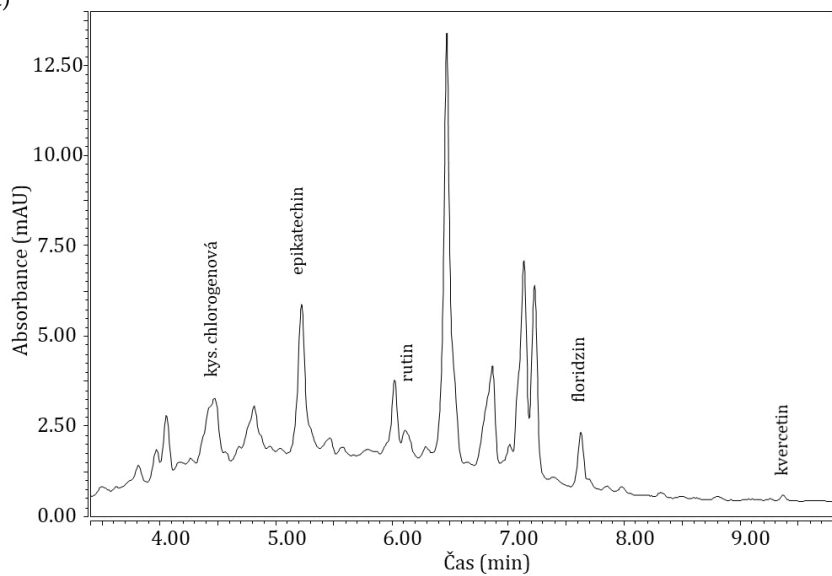


Obrázek 6. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'Lady Silvia'; a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce

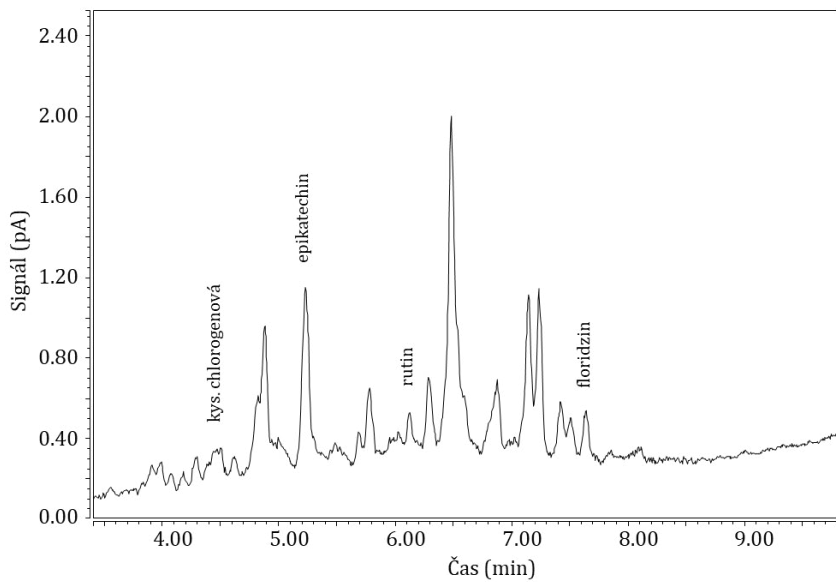
a)

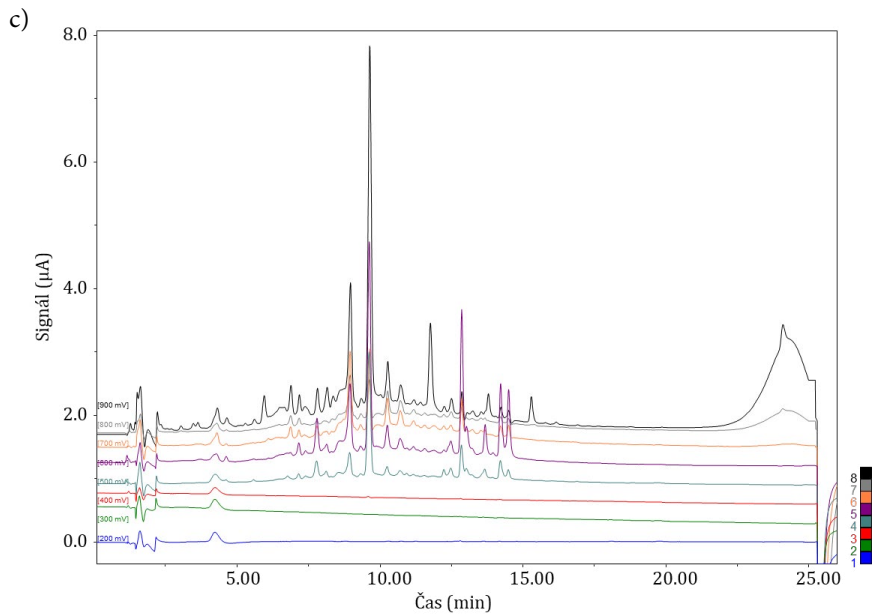


a)

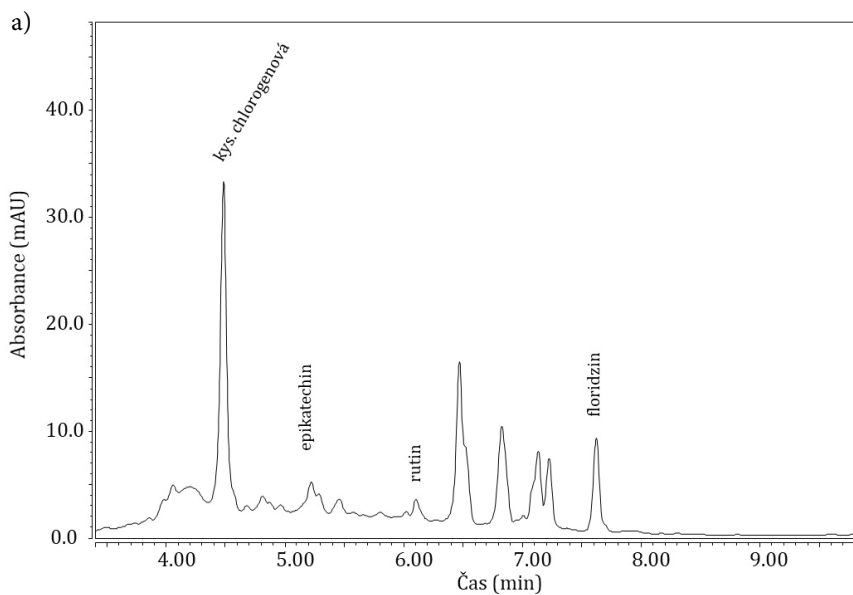


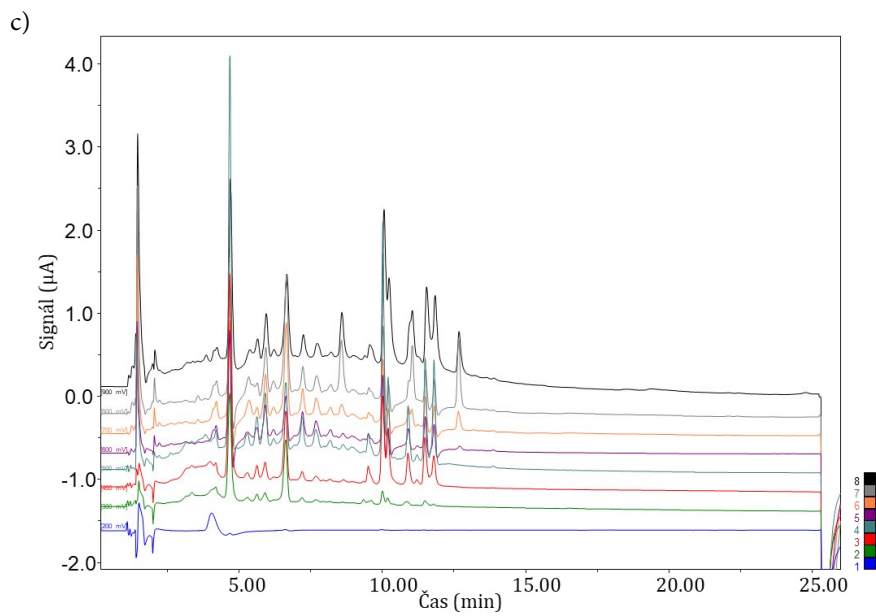
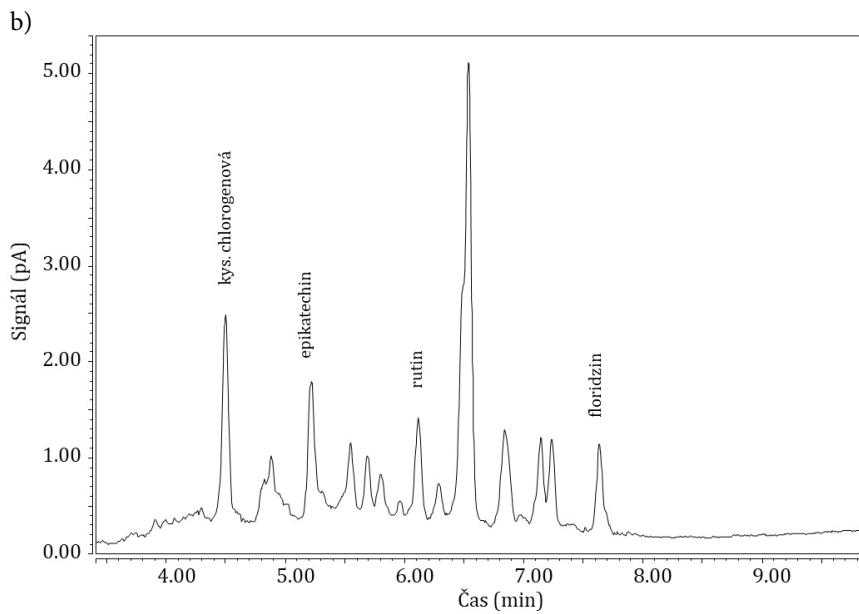
b)



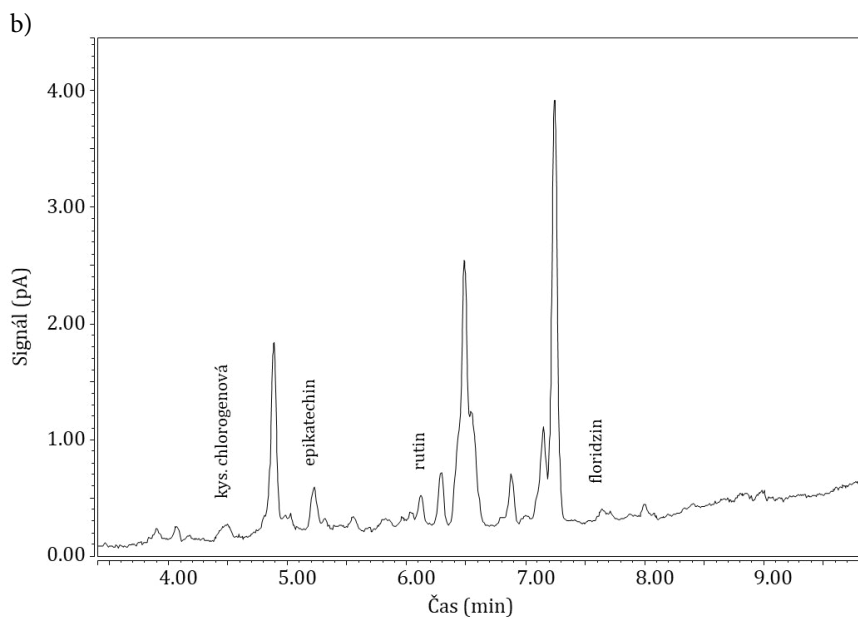
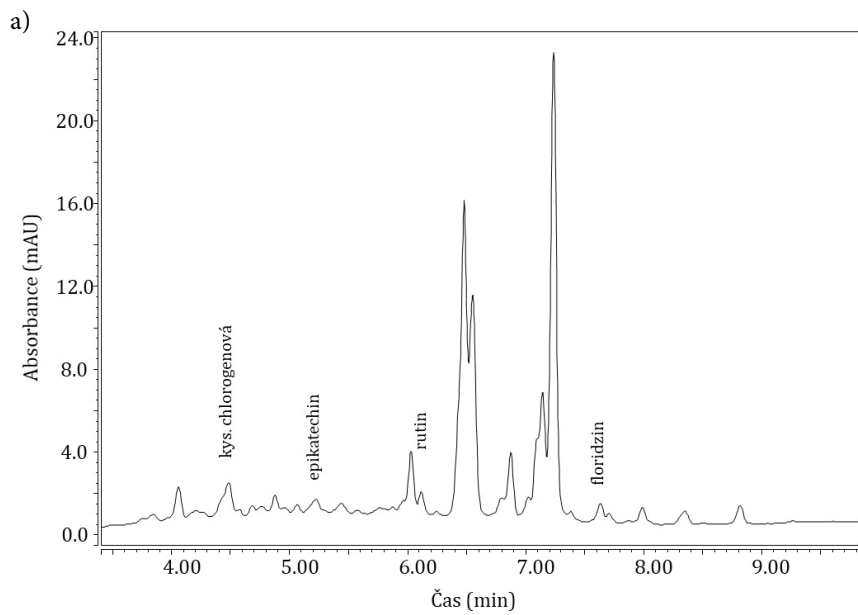


Obrazek 8. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'HL 72'; a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce

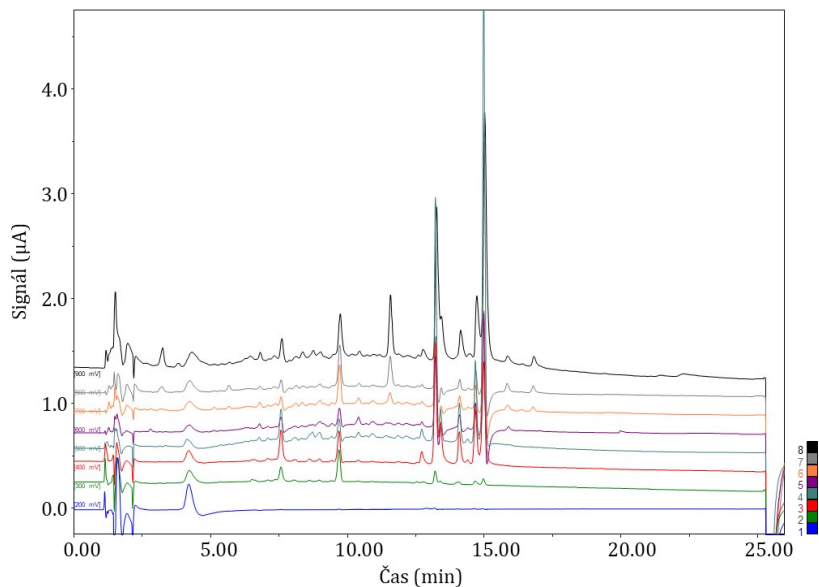




Obrázek 9. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'HL 2350': a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce



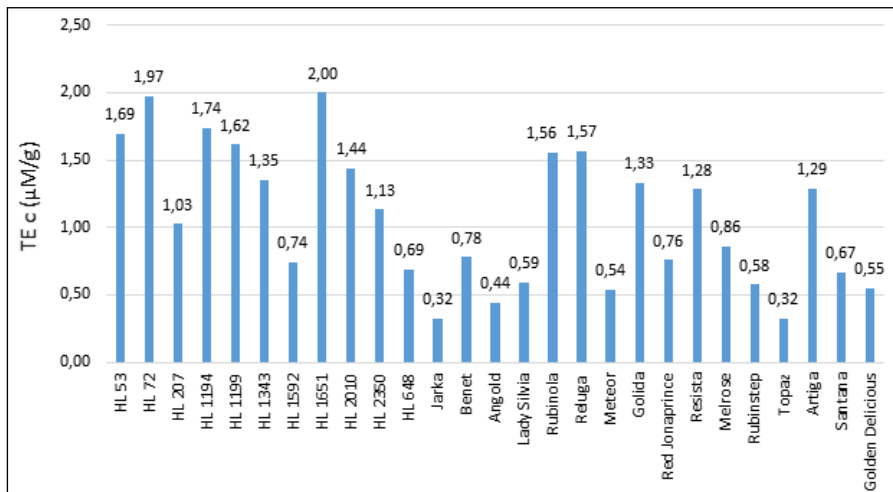
c)



Obrázek 10. Chromatogramy stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity v odrůdě 'HL 1651'; a) DAD – 280 nm, b) CAD, c) CoulArray detekce

3.6.4 Stanovení TEAC

Výsledky stanovení antioxidační aktivity hodnocené metodou TEAC jsou uvedené na Obrázku 11. Z výsledků vyplývá jasná korelace mezi CA detekcí a TEAC stanovením. Odrůdy, které vykazují vyšší obsah těchto látek jsou z nově vyšlechtěných odrůd opět 'HL 1651', 'HL 72', 'HL 53' a nově také 'HL 1194'. Z běžně pěstovaných odrůd dosahují vyšších výsledků 'Rubinola' a 'Reluga', ale odrůdy vyhodnocené v CA detekci patří i v této metodě k těm s vyšším obsahem antioxidačně aktivních látek. Korelace mezi těmito dvěma technikami je tedy velmi výrazná. Zatímco TEAC metoda je běžně používaná, ale nepřináší informace o složení jablečného extraktu, tak CA detekce ve spojení se separací kombinuje jak složení, tak aktivitu těchto látek. Sama o sobě je ale nedostatečně citlivá a selektivní pro rozlišení jednotlivých látek a opět je potřeba zkombinovat její výsledky s další detekcí, nejlépe s DAD.



Obrázek 11. TEAC stanovení antioxidační aktivity u jednotlivých testovaných odrůd

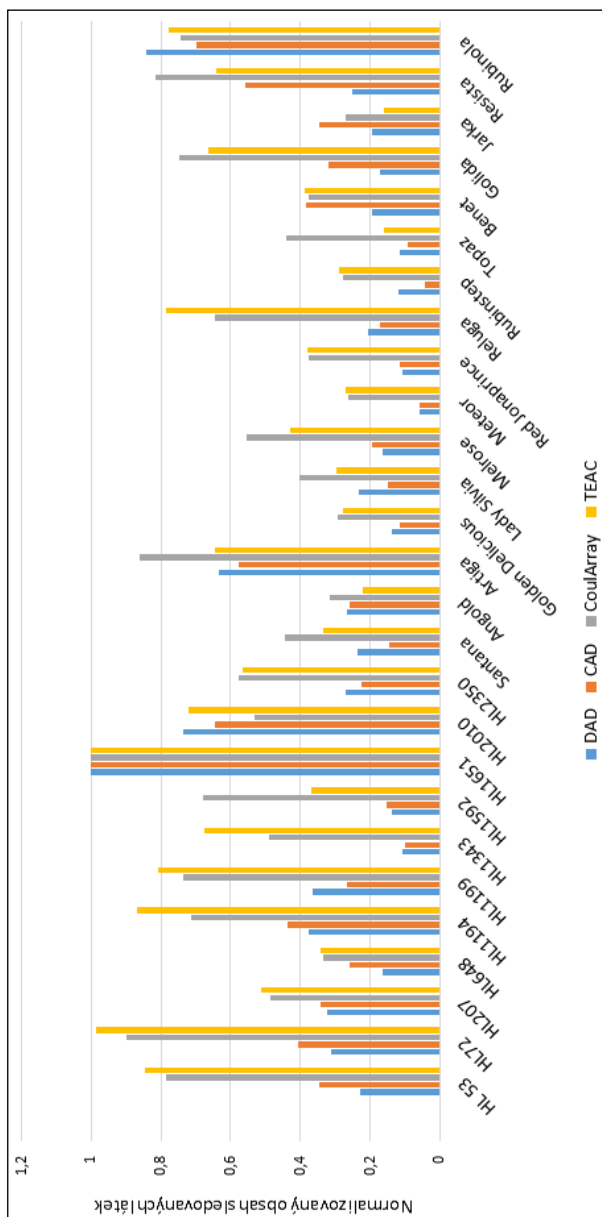
3.6.5 Celkové porovnání výsledků použitých technik

Výsledky analýz jablečných extraktů jednotlivých odrůd byly pro účel objektivního porovnání normalizované, viz Obrázek 12. Z grafu vyplývá, že pro hodnocení celkového obsahu bioaktivních látek s antioxidačními vlastnostmi jsou nevhodnější metody CoulArray a TEAC, které dokážou citlivě reagovat na přítomnost látek s redukčním účinkem a látek schopných neutralizovat volné radikály. Tyto metody jsou vzájemně komplementární. Korelace s dalšími detekčními technikami je ale nízká. Výjimku můžeme nalézt u odrůd 'HL 2010', 'Angold', 'Jarka' a 'Rubinola', kde byl celkový obsah vybraných fenolických látek podobný, případně převyšoval obsah látek stanovených pomocí CoulArray a TEAC. V těchto případech měly vybrané kvantifikované fenolické látky hlavní podíl na bioaktivních účincích dané odrůdy a vliv dalších neidentifikovaných obsahových látek byl minoritní.

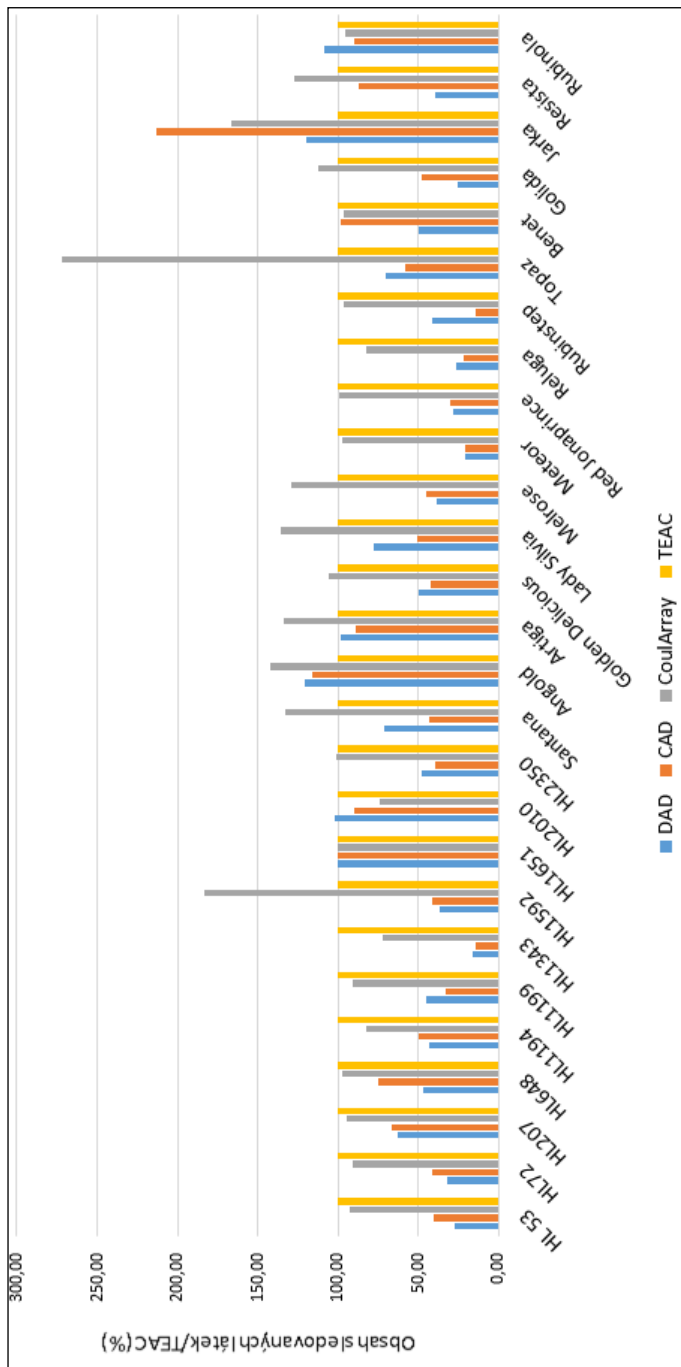
Pro porovnání odrůd vzhledem k možnému benefitu z příjmu bioaktivních látek jejich konzumací, byly výsledky z DAD, CAD a CoulArray detekce přepočítané na výsledky TEAC, viz Obrázek 13. Důvod přepočtu výsledků ostatních detekčních technik na TEAC vyplývá z principu metody. V Obrázku 13 odpovídá hodnota výsledků TEAC sto procentům, ostatní výsledky jsou k ní dopočítané v poměru z normalizovaných dat. Na základě výsledků je i v tomto případě vidět, že TEAC a CoulArray detekce poskytují nejpřesnější obraz o možné zdravotní prospěšnosti jednotlivých odrůd.

Samotné množství kvantifikovaných fenolických látek pomocí DAD, případně CAD detekce, nemusí být nejlepším výpovědním parametrem pro volbu odrůdy s potenciálně největším zdravotním benefitem. Sedm fenolických látek, které byly stanoveny v testovaných odrůdách, se liší mírou antioxidačního účinku. Navíc je důležité přihlédnout i k obsahu neidentifikovaných látek, které mohou k celkovému

antioxidačnímu účinku odrůdy výrazně přispívat. Rozdíly v síle antioxidantů je možné sledovat na záznamech z CoulArray detektoru. Silné antioxidanty, které lehce odevzdávají proton radikálu, se oxidují už při nižších potenciálech, zatímco ty slabé až při vyšších.



Obrázek 12. Celkové porovnání normalizovaných výsledků obsahu sledovaných látek



Obrazek 13. Porovnání výsledků použitých metod vztažené na výsledky TEAC (TEAC=100%)

Odrůdy 'HL 1651', 'HL 2010', 'Artiga' a 'Rubinola' se vyznačovaly vysokým obsahem identifikovaných fenolických látek a stejně tak vysokou aktivitou biologicky aktivních látek při CoulArray detekci a také v TEAC výsledcích. Na druhé straně, odrůdy 'HL 53', 'HL 72', 'HL 1343', 'Meteor', 'Reluga' a 'Rubinstep' obsahovaly malé množství identifikovaných fenolických látek, ale navzdory tomu byly jejich výsledky TEAC a CoulArray detekce porovnatelné. To poukazuje na dvě možnosti. Buď identifikované fenolické látky patří mezi silné antioxidanty, nebo se v daných extraktech nacházejí jiné, neidentifikované látky, které významným způsobem příznivě ovlivňují antioxidační aktivitu.

Z praktické stránky, metoda TEAC umožňuje nejrychlejší stanovení celkového obsahu bioaktivních látek, avšak je manuálně náročná a náchylná na vznik náhodných chyb. V porovnání s ní je metoda CoulArray detekce časově náročnější, ale vznik náhodných chyb při automatizovaném nástřiku extraktů je minimalizovaný. Metody DAD a CAD zaujímají samostatné postavení v analýze ovoce, z důvodu identifikace konkrétních obsahových látek. Výrazným omezením použití CAD detekce je její univerzální odpověď na obsah eluovaných látek ve stejném retenčním čase. CAD detekce vyžaduje pro analýzu vzorků s komplexní maticí jako jsou právě rostlinné/ovocné vzorky používání delších gradientů, aby došlo ke kompletní separaci i minoritních složek extraktů.

3.7 Pomologické hodnocení plodů jableň

Pro komplexnost řešené problematiky bylo jako doplňkové provedeno také hodnocení pomologických a fenologických znaků. Porovnání základních znaků je uvedeno v Tabulce 7, kde jsou uvedeny hodnoty pro vůni, tloušťku slupky, konzistenci, šťavnatost, kyselost, chuť a celkový vzhled. Co se týče hodnocení vůně, stupnice je v rozmezí 1-9, kde 1 značí nepříjemná, 5 nevýrazná a 9 příjemná. Celkem u 15 vzorků byla vůně hodnocena jako nevýrazná. Nejpříjemnější vůně byla pozorována u 'HL 72' a 'HL 1651'.

U tloušťky slupky hodnota 3 znamená slabá, 5 střední a 7 je silná. Nejhojnější zastoupení u vybraných odrůd a novošlechtění má střední tloušťka slupky. Odrůda 'Golidá' a 'HL 1194' vykazovaly silnou tloušťku slupky. U konzistence převažovalo hodnocení číslem 6, což znamená středně jemná, neboť 3 je hrubozrnná, 5 střední a 7 jemná. Dále byla hodnocena šťavnatost, která byla největší u odrůdy 'Artiga' a 'HL 72'. Většina vzorků dosahovala hodnot 5 a 6, kdy 5 znamená středně šťavnatá. Kyselost byla hodnocena na škále 1 až 9, kdy 1 znamená velmi kyselá a 9 velmi sladká. Většina vzorků byla charakterizována jako sladce navinulá (5) resp. navinule sladká (6). Odrůdy 'Rubinstep' a 'HL 1651' byly označeny za nasládlé. U chuti převažovalo hodnocení 6 (dobrá) a 7 (velmi dobrá). Celkový vzhled byl nejlepší u odrůdy 'Angold', dále pak u odrůdy 'Santana', 'HL 1199', 'HL 1343' a 'HL 72'.

Z dosažených výsledků pomologického a fenologického hodnocení je patrné, že nejlepší vlastnosti vykazovaly odrůdy 'Angold', 'Meteor', 'Lady Silvia', 'Santana', z novošlechtění 'HL 72', 'HL 207', 'HL 2350' a 'HL 1343'.

Tabulka 7 Přehled základních pomologických znaků testovaných novošlechtění a odrůd jablek

Hybrid/ Odrůda	Vůně	Tloušťka Slupky	Konzi- stence	Šťavnatost	Kyselost	Chuť	Vzhled
'HL 53'	5	4	6	5	6	5	7
'HL 72'	7	5	6	8	6	7	8
'HL 648'	5	6	6	6	6	7	5
'HL 207'	4	4	5	5	5	6	7
'HL 1194'	5	7	5	5	6	5	6
'HL 1199'	5	6	5	5	6	6	8
'HL 1343'	6	4	4	6	6	7	8
'HL 1592'	5	4	6	5	5	6	6
'HL 1651'	7	5	5	5	7	7	5
'HL 2010'	5	5	7	5	6	6	6
'HL 2350'	6	6	5	7	6	7	7
'Santana'	4	5	4	6	6	5	8
'Angold'	5	5	6	7	5	7	8
'Artiga'	4	5	6	8	4	5	6
'Golden Delicious'	6	6	5	5	5	5	6
'Lady Silvia'	6	4	7	6	5	6	7
'Melrose'	6	6	6	6	5	6	6
'Meteor'	6	5	6	7	6	7	7
'Red Jonaprince'	5	5	6	6	6	6	6
'Reluga'	6	6	6	6	6	7	7
'Rubinstep'	5	5	6	5	7	6	7
'Topaz'	5	6	6	7	5	7	7
'Benet'	5	6	7	6	6	6	6
'Golida'	5	7	6	6	5	7	6
'Jarka'	5	5	5	5	5	5	6
'Resista'	5	4	6	5	6	6	7
'Rubinola'	5	5	6	6	6	6	7

4 ZÁVĚR

Byla vyvinuta nová screeningová HPLC-DAD-CAD metoda pro rychlé vyhodnocení fenolického profilu methanolických extraktů různých odrůd jablek. Validace byla provedena v souladu s doporučením EMA. Bylo provedeno podrobné porovnání výsledků DAD a CAD detekce pro stanovení fenolických látek v komplexní matici pomocí vybraných validačních parametrů. Byla diskutována rizika nadhodnocení, resp. podhodnocení obsahu fenolických látek při použití CAD detekce. Nadhodnocení je spojeno zejména s nekompletní separací analytů a dalších obsahových látek přítomných v extraktu. Tímto způsobem byl zkrácen obsah epikatechinu a rutinu. Na druhou stranu v případě analytů přítomných pouze v nízkých koncentracích byl jejich signál překryt dalšími eluovanými látkami. Tento jev byl pozorován u kyseliny chlorogenové, kterou bylo možné v nízkém obsahu detekovat pomocí DAD detekce při 320 nm, ale nebyla detekovaná při použití CAD detekce.

V této práci je doloženo, že samotná CAD detekce není vhodná ve spojení s rychlou screeningovou separační metodou pro hodnocení obsahu látek v komplexní matici. Ale spojení s DAD detekcí, která doplňuje metodu o jiný princip detekce nebo při prodloužení doby chromatografické separace pro dokonalé rozlišení všech obsahových látek, je její aplikace vhodná zejména pro potvrzení obsahu další detekční technikou. V případě DAD detekce je její využití dostatečně selektivní a citlivé pro stanovení vybraných sedmi fenolických sloučenin v jablečném extraktu. Doplňující informace o spektru látky eluované v daném retenčním čase pak slouží k odhalení případné koeluce a tím jsou odstraněny případné chyby stanovení. Ačkoliv je separace v této metodě relativně krátká, trvá pouhých 12,5 min, bylo možné odlišit jednotlivé analyty mezi sebou i mezi dalšími obsahovými látkami.

Další informace byly doplněny pro stanovení látek s antioxidační aktivitou, kde byly porovnány CoulArray detekce a neseparační TEAC metoda. Byla získána úzká korelace mezi výsledky obou technik. Pro rychlé stanovení obsahu bioaktivních látek byla TEAC metoda dostačující. Pro doplnění podrobnějších informací o vzorcích ovocných extraktů je vhodné zkombinovat DAD a CA detekci, kdy mohou být identifikované hlavní obsahové složky, stanoven jejich obsah a dále určena i jejich antioxidační aktivita. Tímto způsobem je komplexně popsáno složení těchto vzorků a mohou tak být rozlišeny odrůdy, které obsahují více bioaktivních látek, resp. látek s větší antioxidační aktivitou, a také dokážou tento obsah udržet i při skladování nebo zpracování plodů.

5 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Sepsaná metodika komplexně zpracovává problematiku využití různých detekčních technik vybraných fenolických látek v odrůdách jabloní a novošlechtění ve spojení s kapalinovou chromatografií. 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.

Publikace, která shrnuje konkrétní problematiku nebyla dosud poskytnuta pěstitelům, osobám, zabývající se kvalitou ovoce či zpracovatelům. Jedná se o komplexní porovnání dostupných metod a jejich kritické hodnocení z pohledu stanovení obsahu zdraví prospěšných látek a antioxidační aktivity. Výsledky jsou využitelné zejména organizacemi zabývajícími se kvalitou ovoce a následným prodejem jablek. Znalosti o kvalitě a obsahu antioxidačních látek ve vybraných odrudách i novošlechtění jabloní mohou být využity pro marketing ovoce, pro zpracovatelské produkty a zároveň je to možnost, jak zákazníkovi nabídnout ovoce s vysokým obsahem zdraví prospěšných sloučenin s antioxidační aktivitou.

6 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Certifikovaná metodika je určena pěstitelům, konzumentům a distributorům jablek. Metodika je prospěšným zdrojem informací pro pěstitele, spotřebitele a obchodníky. Rovněž komplexně řeší problematiku vybraných chemických metod pro detekci látek s antioxidační aktivitou a doporučuje vhodné rutinní metody jejich stanovení v praxi. Vzhledem ke skutečnosti, kterou je zvýšený zájem o ovoce s vysokým obsahem antioxidačních látek, vzrostl zájem o analýzu potravin, které mohou být potenciálními zdroji těchto látek. Spotřebitelé začínají sledovat obsah zdraví prospěšných látek v jablkách k udržení dobrého zdravotního stavu současně populace dětí, dospělých i starších osob. Na základě získaných výsledků a popisu dané metodiky lze říci, že vysoký obsah fenolických látek a zároveň vysokou hladinu zdraví prospěšných látek s antioxidačními účinky mají odrůdy 'Angold', 'Artiga', 'Lady Silvia' a 'Rubinola', 'Topaz', 'Jarka', z novošlechtění 'HL 1651', 'HL 2010' a 'HL 207'. Získané informace mohou být využity ve zpracovatelském průmyslu pro vznik a výrobu zpracovatelských produktů např. moštů, šťáv, sušených křížal při zachování vysoké hladiny těchto látek. Tyto produkty pak představují jiný způsob, jak přenést do těla látky s antioxidačním účinkem oproti konzumaci čerstvého ovoce.

7 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ovoce je velmi důležitou součástí zdravé výživy, je zdrojem mnoha vitamínů, minerálů, vlákniny a dalších zdraví prospěšných látek. Například, třešně a meruňky jsou velmi oblíbeným sezónním ovocem a jablka jsou populární pro svou celoroční dostupnost.

Z pohledu uplatnění metodiky a jejího dopadu na ekonomické aspekty vycházíme ze současné průměrné roční produkce ovoce v ČR. Celková výměra ovocných sadů v ČR se meziročně opětovně zvýšila, k 31. 5. 2018 dosahuje podle ČSÚ 17 440 ha, tj. o 329 ha více. Co se týče jabloní, celková výměra plodných produkčních výsadeb činí v ČR aktuálně 6 800 ha, s průměrných výnosem 15,37-19,57t/ha (v tříletém období, Výroční zpráva 2018 MZe ČR). To vytváří ročně produkci 100-135 tis. t jablek při realizační ceně kolem 16 Kč/kg v hodnotě 1,6-2,1 mld. Kč ročně. Lze předpokládat, že u 10 % produkce bude zvýšená realizační cena o 10 % vlivem nabídky odrůd

jabloní s vysokou antioxidační aktivitou pro přímý konzum, ale i pro využití ve zpracovatelském průmyslu pro výrobu zpracovatelských produktů se zachováním významných antioxidačních látek.

Podle vývoje trhu s lokálním ovocem a situace v okolních, zejména západoevropských zemích lze očekávat, že podíl produkce plodů a zpracovatelských produktů odrůd jabloní, třešní a meruněk s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek vzroste. Získané poznatky pomůžou pěstitelům a zpracovatelům ovoce k výrobě vysoce kvalitních produktů s vysokým benefitem pro zdraví populace a pro jejich využití v nabídce pro děti do škol z důvodu zvýšeného poptávky po zdravém ovoci a výrobcích z nich. Předpokládá se též zvýšený zájem prodejců a obchodních řetězců o prodej odrůd vybraných ovocných druhů s detekovaným množstvím zdraví prospěšných látek a vysokým antioxidačním potenciálem a zvýšení uplatnění tohoto ovoce na trhu i ve zpracovatelském průmyslu. Nepřímým ekonomickým přínosem je zlepšení zdraví současné populace konzumací vysoce kvalitního ovoce a výrobků z nich.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Publikace předcházející metodice:

KOŠKOVÁ, S. Hodnocení vybraných obsahových látek v ovoci metodou HPLC-DAD-CAD. Hradec Králové, 2019. 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 highperformance liquid chromatography Separation with diode array detection. J. Sep. Sci. 41: 3042-3050, 2018

Seznam použité literatury:

[1] Food and Agriculture Organization [cit. 15. 7. 2013]. Dostupné z: <http://faostat3.fao.org/home/index.html2>.

[2] Scalbert A., Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. The Journal of Nutrition. 130, 2073-2085.

[3] Cuthbertson D., Andrews P. K., Reganold J. P., Davies N. M., Lange B. M. (2012). Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60, 8552-8560.

[4] Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., Mattivi F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 6532-6538.

[5] McGhie T. K., Hunt M., Barnet L. E. (2005). Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 3065-3070.

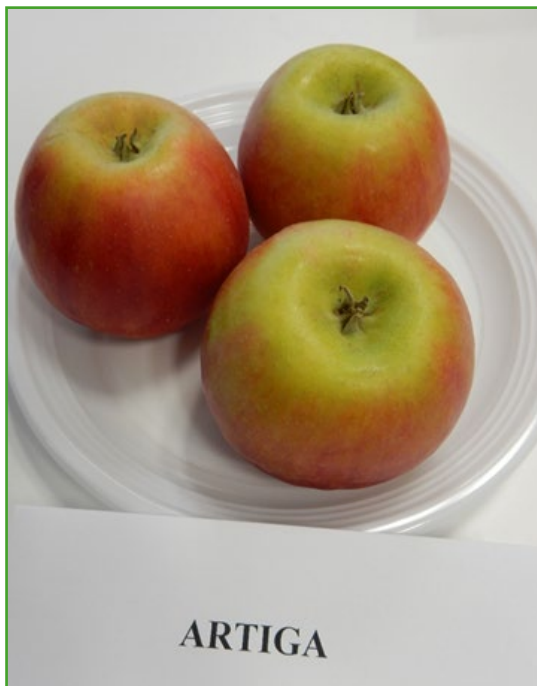
- [6] Łata B., Trampczyńska A., Paczesna J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*. 121, 176-181.
- [7] Duda-Chodak A., Tarko T., Tuszyński T. (2011). Antioxidant activity of apples—An impact of maturity stage and fruit part. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 10, 443-454.
- [8] Iacopini P., Camangi F., Stefani A., Sebastiani L. (2010). Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus x domestica* Borkh. In a peroxynitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 518-524.
- [9] Košková, S. (2017). Hodnocení antioxidační aktivity přírodních látek s využitím luminiscenčních analytických metod. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [10] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99, 191-203.
- [11] Díaz-García, M. C., Obón, J. M., Castellar, M. R., Collado, J., Alacid, M. (2013). Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 138 (2-3), 938-949.
- [12] Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I., Collado, J., Alacid, M. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 126 (4), 1821-1835.
- [13] Porgali, E., Büyüktuncel, E., Pérez, J. P. et al. (2012). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*. 45 (1), 145-154.
- [14] Batista, Â. G., Ferrari, A. S., Da Cunha, D. C. et al. (2016). Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry*. 197 (1), 1153-1159.
- [15] Nováková, L. (2017). Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními technikami. UK, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [16] Szultka, M., Buszewski, B., Papaj, K., Szeja, W., Rusin, A. (2013). Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 47, 47-67.
- [17] Rodríguez-Delgado, M. A., Malovaná, S., Pérez, J. P. et al. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. 912 (2), 249-257.

- [18] Porgali, E., Büyüktuncel, E., Pérez, J. P. et al. (2012). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*. 45 (1), 145-154.
- [19] 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 (2), 265-273.
- [20] Bai, L., Guo, S., Liu, O. et al. (2016). Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24 (2), 293-298.
- [21] Stan, A., Bujor, O., Liliana, B. (2017). Extraction of phenolic compounds from organic dried apples: comparison between conventional, microwave - and ultrasound - assisted extraction methods. *JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 21 (3), 8-14.
- [22] Plaza, M., Kariuki, J., Turner, C. (2013). Quantification of Individual Phenolic Compounds' Contribution to Antioxidant Capacity in Apple: A Novel Analytical Tool Based on Liquid Chromatography with Diode Array, Electrochemical, and Charged Aerosol Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (2), 409-418.
- [23] Granica, S., Krupa, K., Kłębowska, A., Kiss, A. K. (2013). Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS3 method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 86, 112-122.
- [24] Linder, M. C. (1991). Nutrition and metabolism of the trace elements. In LINDER, MC. (Ed.) *Nutritional Biochemistry and metabolism with clinical application*. 2nd ed. East Norwalk: Appleton and Lange, 215-276.
- [25] Zloch, Z., Čelakovský, J., Aujezdská, A. (2004). Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Chemické Listy*.
- [26] Kahkonen, M. P. et al. (1999). Antioxidant activity of plant extractes containing phenolic copounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 3954-3962.
- [27] Fogliano, V., Verde, V., Randozzo, G. (1999). Metod for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1035-1040.
- [28] King, A. M. Y., G. Young, (1999). Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 99 (2), 213-218.
- [29] Ullucci, P.A., et al. (2016). Targeted Analyses of Secondary Metabolites in Herbs, Spices, and Beverages Using a Novel Spectro-Electro Array Platform, Thermo Fisher Scientific, Chelmsford, MA, USA.

- [30] Granica, S., et al. (2013). Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS(3) method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 86, 112-22.
- [31] Rossle, C., et al. (2010). Effect of storage on the content of polyphenols of minimally processed skin-on apple wedges from ten cultivars and two growing seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (3), 1609-14.
- [32] McGhie, T.K., M. Hunt, L.E. Barnett. (2005). Cultivar and Growing Region Determine the Antioxidant Polyphenolic Concentration and Composition of Apples Grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (3), 3065-70.
- [33] Marti, R., et al. (2015). Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chemistry*. 169, 169-79.
- [34] Liaudanskas, M., et al. (2015). A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits. *International Journal of Food Properties*, 18 (5), 945-953.
- [35] Mihailović, N.R., et al. (2018). Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 67, 1-9.
- [36] Plaza, M., J. Kariuki, and C. Turner. (2014). Quantification of individual phenolic compounds' contribution to antioxidant capacity in apple: a novel analytical tool based on liquid chromatography with diode array, electrochemical, and charged aerosol detection. *J Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (2), 409-18.
- [37] Verdu, C.F., et al. (2013). Comparison of two methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the quantification of polyphenols in cider apple juices. *Molecules*. 18 (9), 10213-27.
- [38] Montero, L., et al. (2013). Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1313, 275-83.
- [39] Santos, J., et al. (2014). Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*. 1327, 118-31.
- [40] Viñas, P., et al. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 871 (1-2), 85-93.
- [41] Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. [cit. 11. 9. 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>.

- [42] Pubchem, Open Chemistry database [cit. 11. 9. 2018]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [43] The European Bioinformatics Institute [cit. 11. 9. 2018]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:30778>.
- [44] Naveed, M., et al. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97, 67-74.
- [45] Coates, P. M. (2005). *Encyclopedia of dietary supplements*. New York: Marcel Dekker, ISBN 08-247-5503-0.
- [46] European Medicines Agency, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2015.

9 FOTODOKUMENTACE









Ministerstvo zemědělství, odbor zemědělských komodit, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

45848/2019-MZE- 18140

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 pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka**

Autoři: **Mgr. Marcela Hollá a kol.**

Název organizací: **Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**

Místo vydání: **Hradec Králové**

Rok vydání: **2019**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu TAČR č. **TJ01000151 „Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí“**

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **NE**

V Praze dne 28.8.2019

**MINISTERSTVO
ZEMĚDĚLSTVÍ**
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1 - Nové Město
-9-

Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová
pověřena řízením odboru zemědělských
komodit

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZE:

V Praze dne 29.8.2019

Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

**METODIKA PRO KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ OVOCE
A ZPRACOVATELSKÝCH PRODUKTŮ Z HLEDISKA OBSAHU LÁTEK
PROSPĚŠNÝCH PRO ZDRAVÍ ČLOVĚKA**

Autorský kolektiv:

**UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ,
Katedra analytické chemie**

Mgr. Marcela Hollá, doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D., PharmDr. Petr Chocholouš,
Ph.D., Mgr. Anežka Adamcová, Mgr. Stanislava Košková, Mgr. Barbora Šmídová

Vydal: **UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ s.r.o.**

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Reprint s.r.o.

Počet kopií: 200

ISBN 978-80-906644-4-9

