

IDENTIFIKACE ZEMĚ PŮVODU JABLEK POMOCÍ CHEMICKÝCH ANALÝZ

IDENTIFICATION OF THE COUNTRY OF ORIGIN FOR APPLES USING CHEMICAL ANALYSIS

Jana Hajšlová¹, Vladimír Kocourek¹, Jiří Sedlák², Petr Vacková¹, Klára Navrátilová¹, Kamila Hůrková¹, Vojtěch Hrbek¹

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5/19056, 166 28 Praha 6

² VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

e-mail: jana.hajslova@vscht.cz

ABSTRAKT

V České republice představují jablka dlouhodobě nejvýznamnější ovocnářskou komoditu, jejich domácí produkce je však ohrožována dovozem levnějších zahraničních jablek. Protože i přesto spotřebitelé často upřednostňují domácí produkty a jsou ochotni si za ně připlatit, je neopomenutelným rizikem nesprávné označování země původu, tzv. „falešná geograficita“. Z analytického hlediska je však kontrola geografického původu obtížným úkolem a dosud publikované postupy mají své limity. Cílem této pilotní studie bylo ověření potenciálu nové, dosud netestované strategie odhalení jablek s nesprávně uvedeným geografickým původem. Realizována byla necílová analýza epikutikulární vrstvy plodů pomocí techniky UHPLC-HRMS/MS, získaná data („chemické otisky“) byla analyzována pomocí pokročilých statistických metod. Výsledky ukázaly významné rozdíly ve spektru epikutikulárních vosků různých odrůd jablek a naznačily potřebu zpracování rozsáhlejšího souboru exaktně charakterizovaných plodů, která umožní konstrukci diagnostického modelu pro určení geograficity.

Klíčová slova: *Malus* sp., epikutikulární vosky, chemické otisky, původ, plody

ABSTRACT

Apples have long been the most important fruit commodity in the Czech Republic, but their domestic production is threatened by imports of cheaper foreign apples. However, taking into account the fact that consumers often prefer domestic products

and are willing to pay extra for them, incorrect labelling of the country of origin (so-called "false geographicality") is an unavoidable risk. From an analytical point of view, however, the control of geographical origin is a difficult task and the procedures published so far have their limitations. The aim of this pilot study was to verify the potential of a new, as yet untested strategy for detecting apples with incorrectly stated geographical origin. Non-target analysis of the epicuticular layer of fruits was performed using the UHPLC-HRMS/MS technique. Obtained data ("chemical fingerprints") were analysed using advanced statistical methods. The results showed significant differences in the spectrum of epicuticular waxes of different apple cultivars and indicated the need to process a larger set of exactly characterized fruits, which will allow the construction of a diagnostic model to determine geographical origin.

Keywords: *Malus* sp., epicuticular waxes, chemical fingerprints, origin, fruits

ÚVOD

Kvalita jablek se odvíjí nejenom od atraktivity jejich vzhledu, chutě a vůně, ale konzumenty dnes zajímá i geografický původ plodů, který, mimo jiné, spojuje s chemickou bezpečností, konkrétně rizikem výskytu reziduí pesticidů. Přístupy pěstitelů k rozsahu aplikace chemických prostředků proti škůdcům se totiž mohou významně lišit a informace v tomto smyslu, pokud se jedná o importované ovoce, nejsou prakticky dostupné. Konzumenti proto ve vzrůstající míře dávají, i přes vyšší cenu, přednost jablkům vypěstovaným v České republice, v jejichž bezpečnost mají větší důvěru, neboť čeští producenti akcentují tzv. „nízkoreziduální“ produkci. Nepoctiví prodejci jsou ale motivováni nižšími cenami zahraničních produktů a přistupují k falšování údajů o jejich původu – tzv. geograficitě. Průkaznost falšování na základě analýzy reziduí pesticidů u vzorků, kde není známa historie produkce či skladování není jednoduchá, z tohoto důvodu je třeba uvažovat i nad alternativními (resp. komplementárními) přístupy, které by umožnily odhalení ekonomické kriminality a zlepšily ochranu spotřebitelů.

Pro autentikaci jablek podle země původu byly dosud publikovány různé postupy, využívající například hmotnostní spektrometrii izotopových poměrů (IR-MS) (Bat a kol. 2012, Mimmo a kol. 2015, Longobardi a kol. 2015), infračervenou spektroskopii v blízké oblasti (NIR) (Li a kol. 2018), mikroextrakci tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (SPME-GC-MS) (Guo a kol. 2012) nebo elektronický nos a elektronický jazyk (Longobardi a kol. 2015, Wu a kol. 2018), obvykle s využitím statistického zpracování dat. Studie však byly provedeny pouze s omezeným počtem vzorků a nebyly tak dostatečně pokryty různé faktory přirozené variability, které mohou výsledky do značné míry ovlivňovat (různé odrůdy, pěstební lokality, zemědělské praktiky, meziroční variabilita ap.).

Jako slibný přístup k autentikaci země původu jablek se nabízí analýza složení metabolitů jejich povrchové, epikutikulární vrstvy, která dynamicky reaguje na vnější vlivy a nese tak cennou informaci o okolním prostředí (Tessmer a kol. 2012). Kutikula, vnější ochranná vrstva plodu, se skládá ze strukturní matrice kutinu, který je pokrýván vrstvou vosků (Belding a kol. 1998). Zatímco intrakutikulární vosky jsou přímo zabudovány do kutinové matrice, epikutikulární vosky jsou lokalizovány na povrchu kutinového polymeru (Yang a kol. 2017). Tyto vosky jsou z chemického hlediska komplexní směsí uhlovodíků s dlouhým řetězcem a jejich derivátů (karboxylových kyselin, alkoholů, aldehydů a ketonů, esterů aj.) a sekundárních metabolitů s cyklickými strukturami (např. pentacyklické triterpenoidy) (Leide a kol. 2018, Shepherd a Griffiths 2006). Jejich mikrostruktura je vysoce uspořádaná a na základě její morfologie se rozlišuje mnoho různých typů (Barthlott a kol. 1998). Množství, mikrostruktura i složení vosků jsou významně ovlivňovány environmentálními podmínkami, např. teplotou, intenzitou záření, vlhkostí, povětrností a nadmořskou výškou. Například studie Riederera a Schneidera (1990) prokázala významný vliv různých denních a nočních teplot na množství alkanů, primárních alkoholů, mastných kyselin a esterů u citrusů. Další studie ukazují pozitivní korelaci mezi rostoucí intenzitou záření a přítomností látek s kratším řetězcem u ječmene (Shepherd a kol. 1995, Shepherd a kol. 1997). Uplatňují se ale také další vlivy. Příkladem může být znečištění ovzduší, používaná agrotechnika, aplikace pesticidů a regulátorů růstu či ataky škůdců a chorob. Ke změnám navíc dochází také v průběhu skladování sklizených plodů (vliv teploty, vlhkosti, koncentrace ethylenu ap.) (Li a kol. 2017). Lze předpokládat, že kombinace všech těchto stresových faktorů budou pro jablka s různou geograficitou natolik odlišné, že způsobí prokazatelné rozdíly ve složení kutikulárních vosků těchto jablek.

Složení kutikulárních vosků bylo detailně zkoumáno v mnoha publikacích za využití různých analytických metod. Pro jejich extrakci je možné využít předem enzymově izolované kutikulární membrány (Fernandez-Moreno a kol. 2016, Leide a kol. 2018), ale byly popsány i jednoduché postupy využívající pouze oplach povrchu plodů rozpouštědlem (nejčastěji chloroformem, ale také dichlormethanem, petroletherem, hexanem aj.) (Belding a kol. 1998, Lara a kol. 2015, Li a kol. 2017, Li a kol. 2019).

Pro analýzu je nejčastěji využívána plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (Barthlott a kol. 1998, Lara a kol. 2015, Leide a kol. 2018, Li a kol. 2019), která však vyžaduje chemickou derivatizaci. Alternativní metodou pro analýzu vosků, nyní stále více využívanou, může být kapalinová chromatografie s reverzní fází ve spojení s hmotnostní spektrometrií (RP-LC-MS), a to obvykle s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) nebo ionizací elektrosprejem (ESI) (Chen a kol. 2015, Tada a kol. 2005). Výhodou LC-ESI-MS je možnost simultánní detekce různých tříd lipidů, a to při použití aditiv včetně obtížně ionizovatelných neutrálních esterů vosků. Použití MS s vysokým rozlišením umožňuje kvantifikaci na základě molekulárních nebo aduktových iontů, zatímco aplikace kolizní energie je vhodná pro získání informace o struktuře molekul (Chen a kol.

2015). Výhodná může být i separace pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC) (Planeta a kol. 2000), která je vhodná pro látky širokého rozmezí polarit a nabízí větší všestrannost při výběru podmínek (např. využití jak polárních, tak nepolárních stacionárních fází), a tak možnost většího ovlivnění charakteru separace. Využívat přitom může stejné detektory jako LC (Tarafder 2016).

Pro studium složek epikutikulárních vosků byla v této pilotní studii jako nejvhodnější zvolena strategie „chemických otisků“ (fingerprintů) realizovaných pomocí chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS).

MATERIÁL A METODY

Vzorky jablek

Celkem bylo k analýzám použito 51 vzorků jablek uvedených v tabulce 1. Jednalo se o ovoce zejména z České republiky (20 vzorků) a Polska (26 vzorků). Dva vzorky byly původem z Chile a tři z Itálie.

Tabulka 1. Přehled vyšetřovaných vzorků jablek

Table 1. Overview of examined samples of apples

Kód vzorku	Odrůda	Producent/Distributor	Obchod	Země původu
1255	‘Jonagold’	Pomona Těšetice	-	ČR
1257	‘Idared’	Pomona Těšetice	-	ČR
1258	‘Idared’	Polsko	-	Polsko
1259	‘Redscaiffe’	Pomona Těšetice	-	ČR
1260	‘Golden delicious’	Pomona Těšetice	-	ČR
1261	‘Golden delicious’	VŠÚO	-	ČR
1262	‘Red Jonaprince’	VŠÚO	-	ČR
1263	‘Idared’	VŠÚO	-	ČR
1264	‘Gala’	Pomona Těšetice	-	ČR
1448	‘Golden delicious’	Blanická s.r.o.	Penny	ČR
1449	‘Fuji’	Bio organic	Lidl	Chile
1450	‘Granny Smith’	GebriClementi GmbH	Lidl	Itálie
1451	‘Pink lady’	pinkladyeurope.com	Lidl	Chile
1452	‘Golden delicious’	-	Lidle	ČR
1453	‘Jonagold’	Bohemia apple, družstvo	Lidl	ČR
1454	‘Golden delicious’	Bohemia apple, družstvo	Albert	ČR
1456	BIO ‘Red Delicious’	Čerofrucht s.r.o.	Kaufland	Itálie
1457	‘Fuji’	THE GROWER’S HARVEST, Farm GrownVVISS a.s.	Kaufland	ČR
1458	‘Fuji’	THE GROWER’S HARVEST, Farm GrownVVISS a.s.	Tesco	ČR
1507	‘Red Jonaprince’	-	-	Polsko
1508	‘Champion’	Hortim- International spol. s.r.o.	-	Polsko
1509	‘Champion’	-	-	Polsko

1510	'Red Jonaprince'	Sun-Sad sp.z.o.o Nowe Grobice	-	Polsko
1511	'Champion'	Hortim- International spol. s.r.o.	-	Polsko
1512	'Red Chief'	Hortim- International spol. s.r.o.	-	Itálie
2315	'Gala Schiga'	ZD Dolany	-	ČR
2316	'Champion'	ZD Dolany	-	ČR
2317	'Rubín'	ZD Dolany	-	ČR
2318	'Bohemia Gold'	ZD Dolany	-	ČR
2479	'Empire'	-	-	Polsko
2480	'Red Jonaprince'	-	-	Polsko
2481	'Idared'	-	-	Polsko
2482	'Champion'	-	-	Polsko
2483	'Gala' "Veronika"	-	-	Polsko
2484	'Red Jonaprince'	-	-	Polsko
2485	'Golden Delicious'	ZD Dolany	-	ČR
2486	'Topaz'	-	-	Polsko
2487	'NŠ'	-	-	Polsko
2488	'Gala' "Dobrovice"	-	-	Polsko
2489	'Golden Delicious'	-	-	Polsko
2490	'Topaz'	ZD Dolany	-	ČR
2491	'Jonagold'	-	-	Polsko
2492	'Pagacz'	-	-	Polsko
2493	'Ligol'	-	-	Polsko
2494	'Mutsu'	-	-	Polsko
2900	'Gala 'Mundial'	-	-	Polsko
2901	'Galaval'	-	-	Polsko
2902	'Golden Delicious'	-	-	Polsko
2903	'Red Jonaprince'	-	-	Polsko
2904	'Honeycrunch'	-	-	Polsko
2905	'Rubinola'	-	-	Polsko

Příprava vzorků

K izolaci epikutikulárních vosků z povrchu jablek byla využita směs rozpouštědel dichlormethan – methanol (1:1, v:v). Extrakty získané ze tří plodů byly spojeny a zkoncentrovány pomocí vakuové odparky, zbytková rozpouštědla byla odstraněna proudem dusíku a odparek zvážen. 100 mg vzorku bylo rozpuštěno v uvedené směsi rozpouštědel, a přefiltrovaný roztok převeden do vialky pro následnou analýzu.

Analýza extraktů

Připravené extrakty byly analyzovány metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS). Separace 1 µl vzorku byla provedena s využitím chromatografu Dionex UltiMate 3000 na koloně BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm), její teplota byla 60 °C. Mobilní fáze byla A: 5 mM mravenčan amonný v H₂O:MeOH (95:5, v:v) + 0,1% kyselina mravenčí, B: 5 mM mravenčan amonný v iPrOH:MeOH:H₂O (65:30:5,

v:v:v) + 0,1% kyselina mravenčí. K detekci byl užit QTOF – TripleTOF™ 6600 (SCIEX, USA) s elektroprayem (ESI, iontový zdroj) provozovaným v pozitivním i negativním módu; rozsah m/z 100 – 1200; rozlišení FWHM > 40 000. Ke kontrole přesnosti hmoty, intenzity a posunu retenčního času během celé sekvence měření byl použit kontrolní vzorek (IQC sample) obsahující směs extraktů všech vzorků.

Statistická analýza

Data generovaná pomocí UHPLC-HRMS/MS, byla následně zpracována a statisticky vyhodnocena pomocí programu Marker View. Pro zpracování dat byla nastavena následující kritéria: rozsah retenčních časů 0–22 min, tolerance retenčního času 0,2 min; tolerance hmoty 0,02 Da; minimální spektrální šířka píku 0,2 Da a maximální počet píků 8000. Pro zredukování dimenze dat byly odstraněny izotopické hmoty a dále byly odečteny látky přítomné ve slepých vzorcích. Za účelem rozdělení jednotlivých vzorků do shluků podle jejich geografického původu byla data nejprve analyzována pomocí analýzy hlavních komponent PCA, pro procesování bylo použito Paretovo škálování (Pareto scaling). Po tomto zpracování byla data dále normalizována na celkovou sumu ploch.

Takto upravená data z programu Marker View byla převedena do programu SIMCA. Zde byla data podrobena statistické analýze metodou diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců PLS-DA s cílem vytvořit statistický model, podle kterého by bylo možno ověřovat geografickou autenticitu jablek. Podobně jako při použití metody PCA bylo i zde použito Paretovo škálování. Následně bylo množství dat zredukováno a vybrány byly pouze hodnoty, které měly hodnotu VIP skóre (Variable Influence on Projection) větší než 1, jednalo se tedy jen o ty ionty, které měly statisticky významný vliv na rozdělení do jednotlivých skupin. Z takto upravených dat byly vybrány pomocí grafu komponentních vah látky nejvíce charakteristické pro dané statistické rozdělení.

Pro následnou identifikaci charakteristických markerů byl použit software Peak View, který byl díky získaným hmotnostním spektrům schopen pomocí hodnot m/z a izotopového profilu určit sumární vzorec neznámých látek. Po získání sumárního vzorce bylo zapotřebí využít online chemických databází k bližší identifikaci dané látky. Získaná fragmentační spektra byla porovnána s odbornou literaturou.

VÝSLEDKY A DISKUSE

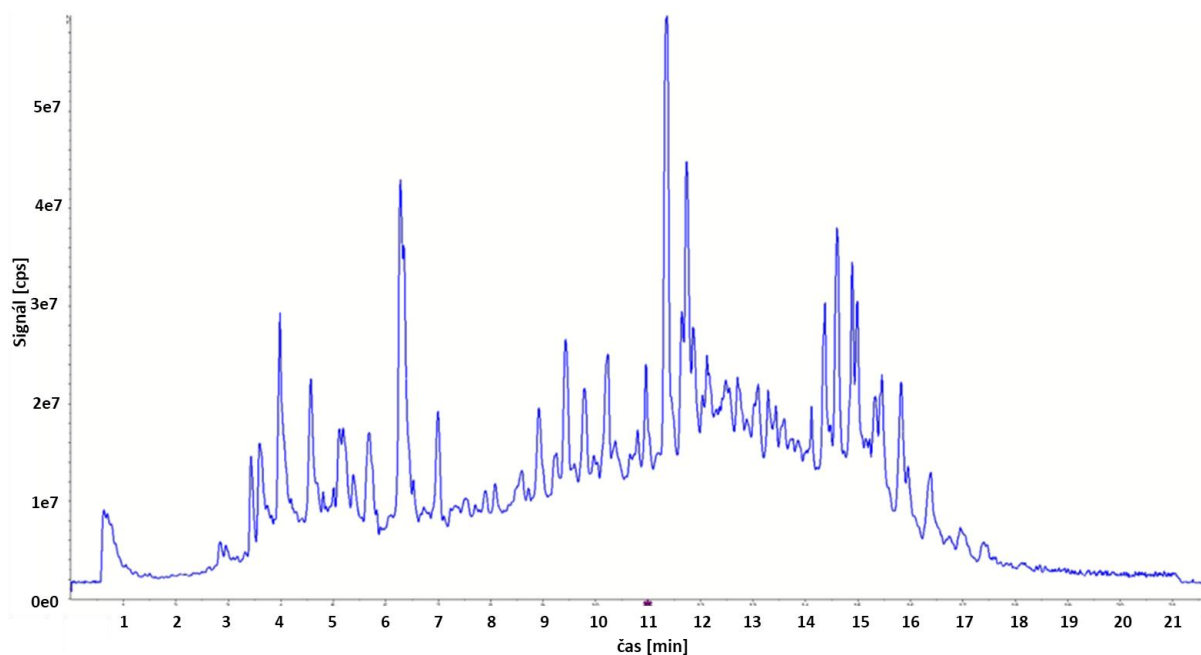
Chromatografické profily získané analýzou extraktů směsí dichlormethan/methanol (1:1, v/v) jsou pro oba ionizační módy uvedeny níže (viz Graf 1 a 2), celkově obsahovaly řádově tisíce signálů (tzv. „features“). Graf komponentního skóre PCA neukázal významné klastrování vzorků jablek původem z České republiky a Polska, PLS-DA analýza trend při srovnání fingerprintů příslušných extraktů ukázala určitý

rozdíl, nicméně validační parametry modelu nebyly pro rozlišení českých a polských jablek dostačující (viz Graf 3).

Jak již bylo v úvodní části shrnuto, složení epikutikulární vrstvy jablek je podmíněno nejen genetickými faktory, ale je ovlivněno i podmínkami v dané lokalitě i agrotechnickými praktikami. Právě od této skutečnosti se odvíjela pracovní hypotéza o možnosti využití studia epikutikulárních vosků k autentikaci geografického původu plodů. Pro izolaci této složky povrchové vrstvy jablek byly v úvodní části experimentu testovány různé směsi rozpouštědel s cílem získat co nejbohatší zastoupení přítomných sloučenin, složek metabolomu (je nutné zdůraznit, že optimalizace extrakce si neklade za cíl jejich kvantitativní izolaci). Jako nejvhodnější byla zvolena směs dichlormethan – methanol (1:1, v/v), která byla poté použita pro zpracování dostupného souboru jablek. Pro separaci vzorku byla zvolena ultraúčinná kapalinová chromatografie na koloně s reverzní fází, pro detekci pak vysokorozlišovací tandemová hmotnostní spektrometrie, tedy technika, která disponuje řadou předností včetně možnosti identifikace sloučenin na základě přesných hmot generovaných iontů. Na grafech 1 a 2 jsou uvedeny získané záznamy v obou ionizačních módech, detekovány byly tisíce iontů („features“).

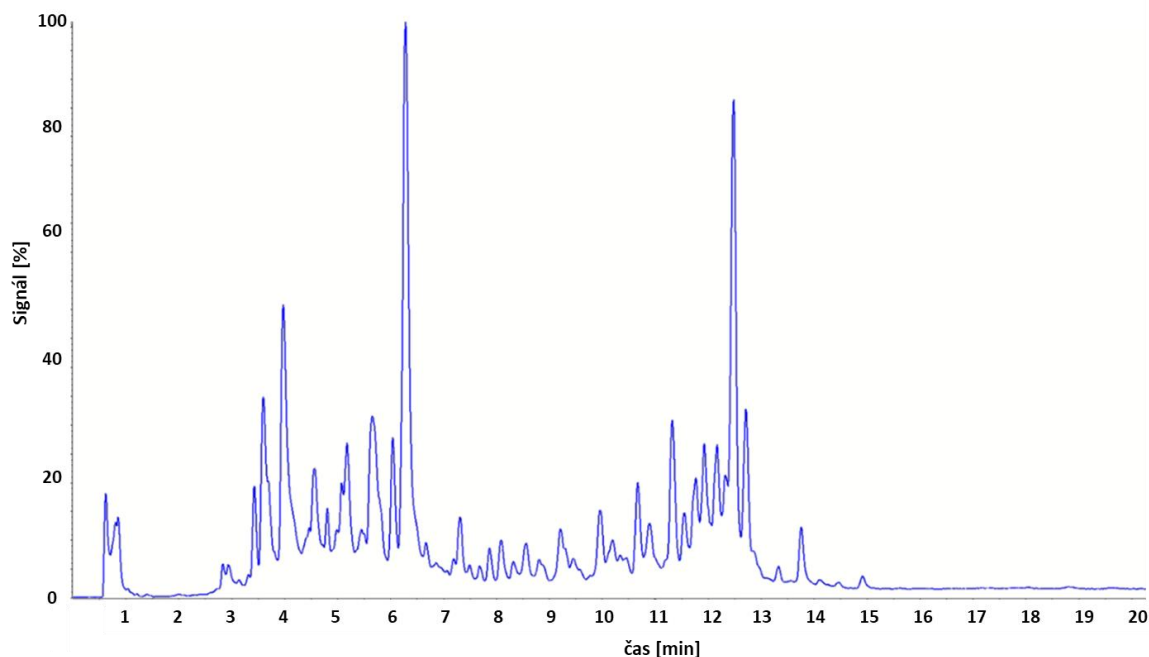
Graf 1. UHPLC-HRMS chromatogram (celkový iontový tok, TIC) směsného vzorku extraktů kutikuly jablek odrůdy Golden Delicious, ionizace ESI+

Graph 1. UHPLC-HRMS chromatogram (total ion current, TIC) of mixed sample of apple cuticle extracts of cultivar Golden Delicious, ESI ionization



Graf 2. UHPLC-HRMS chromatogram (celkový iontový tok, TIC) směsného vzorku extraktů kutikuly jablek odrůdy Golden Delicious, ionizace ESI-

Graph 2. UHPLC-HRMS chromatogram (total ion current, TIC) of mixed sample of apple cuticle extracts of cultivar Golden Delicious, ESI ionization

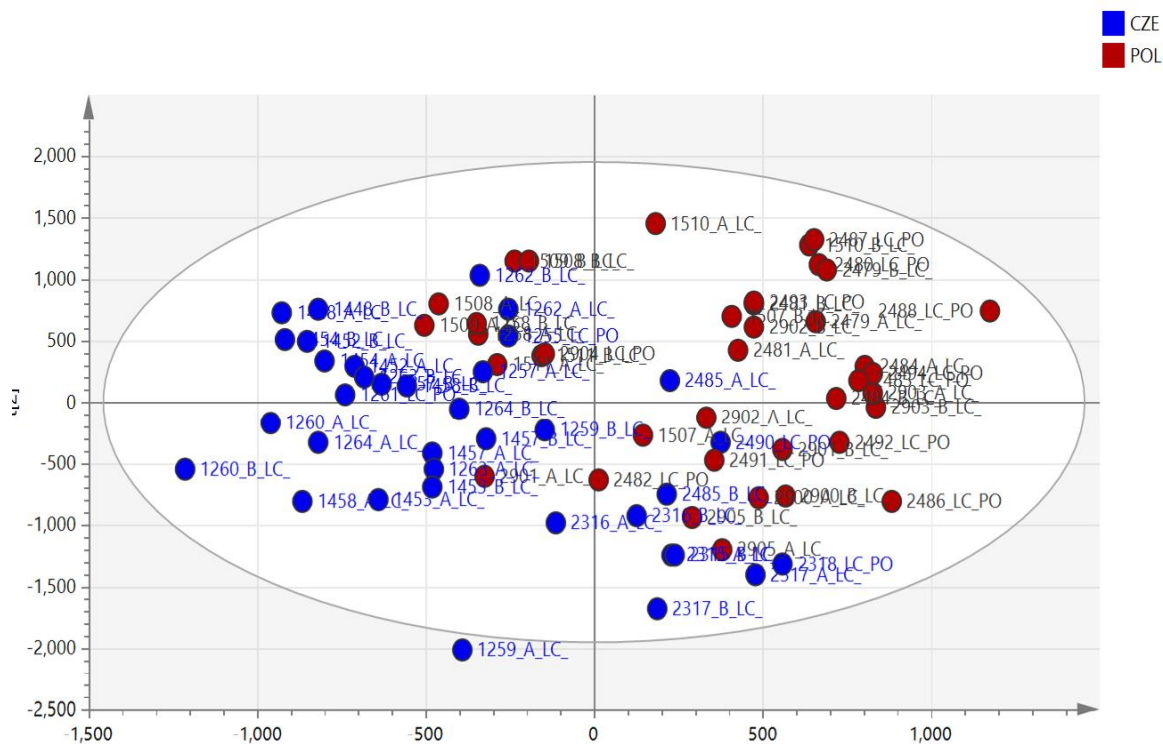


Data získaná analýzu souboru vzorků byla zpracována výše popsanými statistickými postupy. Graf komponentního skóre PCA neukázal významné klastrování vzorků jablek původem z České republiky a Polska, PLS-DA analýza trendů při srovnání „chemických otisků“ příslušných extraktů ukázala určitý rozdíl, nicméně validační parametry modelu nebyly příliš vysoké a oba soubory vzorků různého původu tedy nebyly od sebe navzájem dostatečně spolehlivě odděleny (viz Graf 3). Pro získání robustního modelu k určení geograficity by bylo třeba zřejmě pracovat s podstatně většími soubory vzorků stejné odrůdy.

Na straně druhé, jak ukazuje Graf 4, lepší parametry modelu (tedy separaci obou souborů) jsme pozorovali pro česká a italská jablka (těch však byl podstatně menší počet). Tato skutečnost je principiálně v souladu s pracovní hypotézou, že příznivým faktorem projevujícím se v separaci obou souborů stejného geografického původu byly pravděpodobně výrazněji odlišné klimatické podmínky v místech původu jablek.

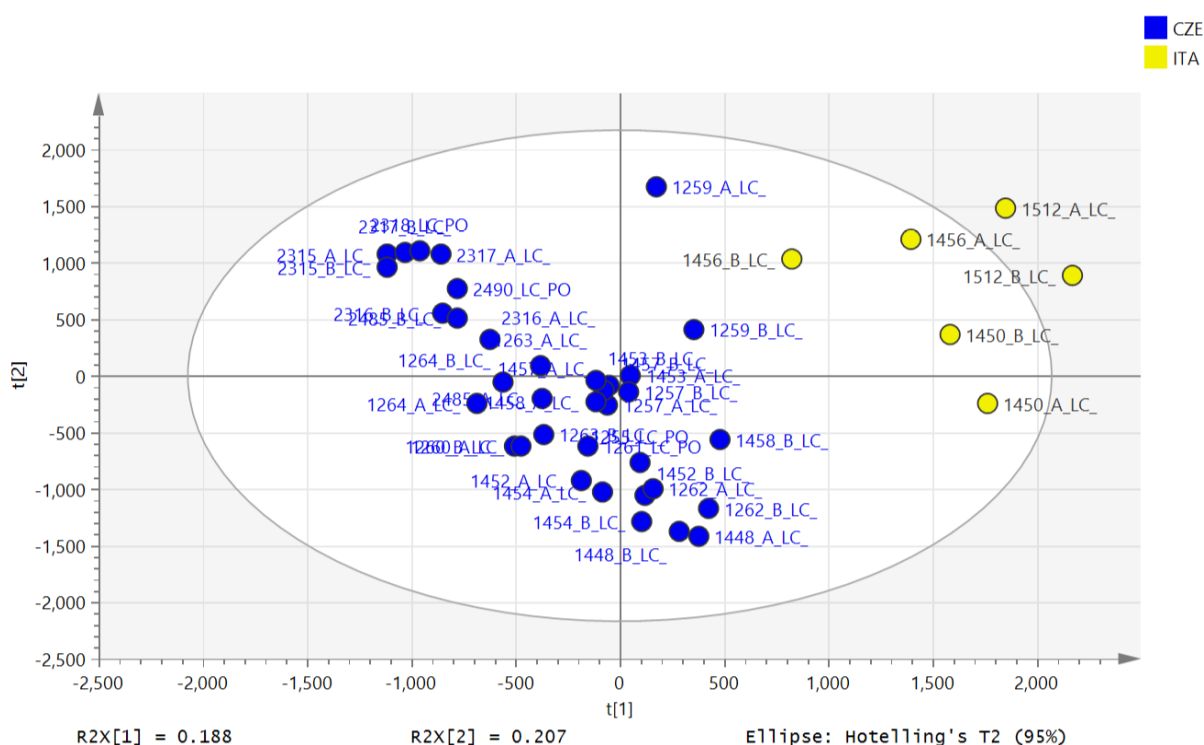
Graf 3: PLS-DA, graf komponentního skóre pro česká a polská jablka (všechny odrůdy), ionizace ESI+

Graph 3. PLS-DA, component score graph for Czech and Polish apples (all cultivars), ESI + ionization



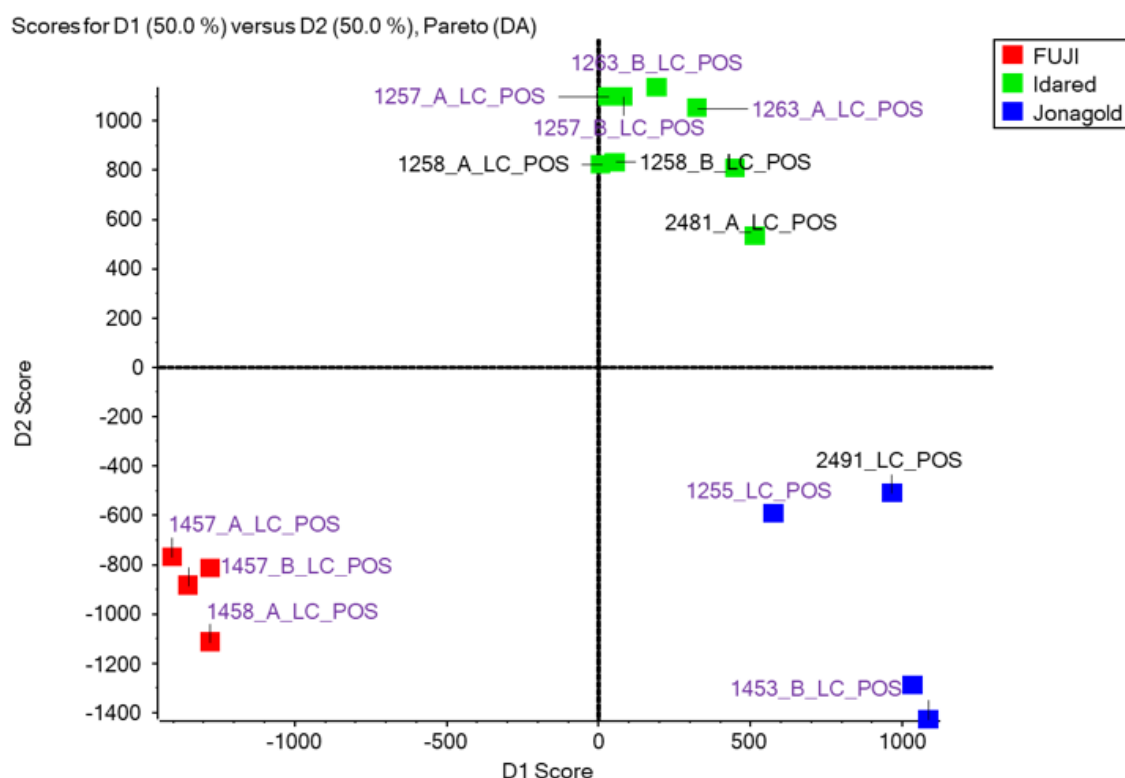
Graf 4. PLS-DA, graf komponentního skóre pro česká a italská jablka, ionizace ESI+. Další statistické zpracování dat ukázalo, že jablka se zřetelně klastrovala podle odrůd. Tento poznatek, resp. získaný model, by mohl být využitelný pro autentikaci odrůd jablek podobného vzhledu, které běžný spotřebitel / obchodník nedokáže rozeznat (viz Graf 5).

Graph 4. PLS-DA, component score graph for Czech and Italian apples, ESI + ionization. Subsequent statistical processing of data showed that the apples were clearly clustered by cultivar. This knowledge, resp. the obtained model could be useful for the authentication of apple cultivars with similar appearance, which the standard consumer/trader cannot recognize (see Graph 5).



Graf 5. PLS-DA, graf komponentního skóre, extrakty jablek a rozdělení na základě jednotlivých odrůd: 'Idared', 'Jonagold', 'Fuji'

Graph 5. PLS-DA, component score graph, apple extracts and distribution based on individual cultivars: 'Idared', 'Jonagold', 'Fuji'



ZÁVĚR

Autentikace geografického původu jablek pomocí chemických analýz je skutečná výzva, neboť složení vzorku dané odrůdy je podmíněno řadou faktorů, z nichž mnohé při zakoupení plodů v tržní síti je obtížné či přímo nemožné dohledat. Prezentovaná studie využívající strategii „chemických otisků“ epikutikulárních vosků pomocí techniky UHPLC-HRMS/MS nicméně naznačuje, že konstrukce dostatečně robustního modelu bude u vzorků z různých lokalit ČR a Polska proveditelná jen za předpokladu víceletého šetření rozsáhlých souborů vzorků vybraných odrůd. Kritická analýza dat generovaná v rámci jednorocní studie zároveň ukázala, že je možné spolehlivě klasifikovat odrůdu i v případě plodů velmi podobného vzhledu.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledek byl vytvořen v rámci projektu NAZV QK1910104 „Výzkum metabolomických metod pro laboratorní ověření geografické autenticity jablek“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017–2025 ZEMĚ.

POUŽITÁ LITERATURA

- BARTHLOTT, W., C. NEINHUIS, D. CUTLER, F. DITSCH, I. MEUSEL, I. THEISEN and H. WILHELMI. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical journal of the Linnean society*. 1998, 126(3): 237–260. ISSN 0024-4074. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x.
- BAT, K.B., R. VIDRIH, M. NECEMER, B.M. VODOPIVEC, I. MULIC, P. KUMP and N. OGRINC. Characterization of Slovenian apples with respect to their botanical and geographical origin and agricultural production practice. *Food Technology and Biotechnology*. 2012, 50(1): 107–116. ISSN 1330-9862.
- BELDING, R.D., S.M. BLANKENSHIP, E. YOUNG and R.B. LEIDY. Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998, 123(3): 348–356. ISSN 2327-9788. DOI: 10.21273/JASHS.123.3.348.
- FERNANDEZ-MORENO, J.P., S. MALITSKY, J. LASHBROOKE, A.K. BISWAL, R.C. RACOVITA, E.J. MELLEROWICZ, R. JETTER, D. ORZAEZ, A. AHARONI and A. GRANELL. An efficient method for medium throughput screening of cuticular wax composition in different plant species. *Metabolomics*. 2016, 12(4): 73. ISSN 1573-3882. DOI: 10.1007/s11306-016-0982-0.
- GUO, J., T. YUE and Y. YUAN. Feature selection and recognition from nonspecific volatile profiles for discrimination of apple juices according to variety and geographical origin. *Journal of food science*. 2012, 77(10): C1090-C1096. ISSN 1750-3841. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02914.x.
- CHEN, J., K.B. GREEN and K.K. NICHOLS. Characterization of wax esters by electrospray ionization tandem mass spectrometry: double bond effect and unusual product ions. *Lipids*. 2015, 50(8): 821–836. ISSN 1558-9307. DOI: 10.1007/s11745-015-4044-6.
- LARA, I., B. BELGE and L.F. GOULAO. A Focus on the biosynthesis and composition of cuticle in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63(16): 4005–4019. ISSN 1520-5118. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00013.
- LEIDE, J., A.X. DE SOUZA, I. PAPP and M. RIEDERER. Specific characteristics of the apple fruit cuticle: investigation of early and late season cultivars ‘Prima’ and ‘Florina’ (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*. 2018, 229: 137–147. ISSN 0304-4238. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.10.042.

- LI, C., L. LI, Y. WU, M. LU, Y. YANG and L. LI. Apple variety identification using near-infrared spectroscopy. *Journal of Spectroscopy*. 2018, 2018(10): 1–7. ISSN 2314-4939. DOI: 10.1155/2018/6935197.
- LI, F., D. MIN, C. REN, L. DONG, P. SHU, X. CUI and X. ZHANG. Ethylene altered fruit cuticular wax, the expression of cuticular wax synthesis-related genes and fruit quality during cold storage of apple (*Malus domestica* Borkh. c.v. Starkrimson) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2019, 149: 58–65. ISSN 0925-5214. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2018.11.016.
- LI, F., D. MIN, B. SONG, S. SHAO and X. ZHANG. Ethylene effects on apple fruit cuticular wax composition and content during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 2017, 134: 98–105. ISSN 0925-5214. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.011.
- LONGOBARDI, F., G. CASIELLO, A. VENTRELLA, V. MAZZILLI, A. NARDELLI, D. SACCO, L. CATUCCI and A. AGOSTIANO. Electronic nose and isotope ratio mass spectrometry in combination with chemometrics for the characterization of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food chemistry*. 2015, 170: 90–96. ISSN 0308-8146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.057.
- MIMMO, T., F. CAMIN, L. BONTEMPO, C. CAPICI., M. TAGLIAVINI, S. CESCO and M. SCAMPICCHIO. Traceability of different apple varieties by multivariate analysis of isotope ratio mass spectrometry data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2015, 29(21): 1984–1990. ISSN 1097-0231. DOI: 10.1002/rcm.7306.
- PLANETA, J., P. NOVOTNA, V. PACAKOVA, K. ŠTULÍK, M. MIKEŠOVÁ and J. VEJROSTA. Application of supercritical fluid chromatography to the analysis of waxes in objects of art. *Journal of High Resolution Chromatography*. 2000, 23(5): 393–396. ISSN 1615-9314. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4168(20000501)23:53.3.CO;2-I.
- RIEDERER, M. and G. SCHNEIDER. The effect of the environment on the permeability and composition of Citrus leaf cuticles. *Planta*. 1990, 180(2): 154–165. ISSN 1432-2048. DOI: 10.1007/BF00193990.
- SHEPHERD, T. and D.W. GRIFFITHS. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*. 2006, 171(3): 469–499. ISSN 1469-8137. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x.
- SHEPHERD, T., G.W. ROBERTSON, D.W. GRIFFITHS and A.N. BIRCH. Effects of environment on the composition of epicuticular wax esters from kale and swede. *Phytochemistry*. 1997, 46(2): 83–96. ISSN 0031-9422. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00272-0.
- SHEPHERD, T., G.W. ROBERTSON, D.W. GRIFFITHS, A.N.E. BIRCH and G. DUNCAN. Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. *Phytochemistry*. 1995, 40(2): 407–417. ISSN 0031-9422. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00281-B.

- TADA, A., Z.-L. JIN, N. SUGIMOTO and K. SATO. Analysis of the constituents in jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 2005, 46(5): 198–204. ISSN 1882-1006. DOI: 10.3358/shokueishi.46.198.
- TARAFDER, A. Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 81: 3–10. ISSN 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2016.01.002.
- TESSMER, M.A., L.R. ANTONIOLLI and B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA. Cuticle of 'Gala' and 'Galaxy' apples cultivars under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012, 55(5): 709–714. ISSN 1516-8913. DOI: 10.1590/S1516-89132012000500010.
- WU, H., T. YUE and Y. YUAN. Authenticity tracing of apples according to variety and geographical origin based on electronic nose and electronic tongue. *Food analytical methods*. 2018, 11(2): 522–532. ISSN 1936-976X. DOI: 10.1007/s12161-017-1023-y.
- YANG, Y., B. ZHOU, J. ZHANG, C. WANG, C. LIU, Y. LIU, X. ZHU and X. REN. Relationships between cuticular waxes and skin greasiness of apples during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 2017, 131: 55–67. ISSN 0925-5214. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2017.05.006.