

POLYFENOLY A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA MERUNĚK S OHLEDEM NA SKLADOVÁNÍ

POLYPHENOLS AND ANTIOXIDATION ACTIVITY OF APRICOTS WITH REGARD TO STORAGE

Aneta Bílková^{1,2}, Pavlína Knapová¹

¹ VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Hořice

² KARLOVA UNIVERZITA, Farmaceutická fakulta,
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, katedra analytické chemie

e-mail: Aneta.Bilkova@vsuo.cz

ABSTRAKT

Meruňky stejně jako další ovoce obsahují celou řadu prospěšných látek pro lidský organismus, významnou skupinu z nich tvoří fenolické látky. Validovaná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem používajícím diodové pole byla využita pro srovnání obsahu fenolických látek v čerstvém ovoci a po 20 dnech skladování v 1-methylcyklopropenu. Ve vzorcích byly kvantifikovány 4 fenolické látky, a to kyselina chlorogenová, katechin, epikatechin a rutin. Ke změnám obsahu sledovaných látek rovněž docházelo během skladování. Byly porovnávány vzorky plodů meruněk, u nichž byly použity přípravky na ochranu rostlin se vzorkem bez postřiku pesticidů. Byl rovněž změřen celkový polyfenolický profil použitím metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí CoulArray™. Výsledky získané z obou měřících metod jsou porovnatelné a vzájemně spolu korelují z hlediska obsahů jednotlivých fenolických látek.

Klíčová slova: polyfenoly, meruňky, antioxidační aktivita, skladování

ABSTRACT

Apricots and other fruits contain a number of beneficial substances, a significant group of those compounds are phenolic substances. The validated method of high performance liquid chromatography with diode array detector was used to compare the content of phenolic substances in fresh material and after 20 days of storage in 1-methylcyclopropene. Four substances, namely chlorogenic acid, catechin, epicatechin, and rutin, were quantified in the samples. The contents also changed during storage. Furthermore, samples in which plant protection products were used were compared with a sample with no treatment. The overall polyphenolic profile was also determined using the liquid chromatography method with CoulArray™ detector. The results obtained using both methods were comparable and correlated well with each other in terms of the contents of individual phenolic substances.

Keywords: polyphenols, apricots, antioxidant activity, storage

ÚVOD

Meruňky (*Prunus armeniaca* L.) jsou jedním z nejvýznamnějších druhů rodu *Prunus* pěstovaných na světě. Meruňky jsou důležitým nutričním zdrojem vlákniny, vitaminů skupiny B (B1, B2, B3, B5, B6, B9) a vitamínu C. Z dostupné literatury je známo, že celkový obsah fenolů v meruňkách je většinou tvořen sloučeninami, mezi které patří kyselina chlorogenová, kyselina neochlorogenová, rutin, katechin a epikatechin (Radi 2004, Dragovic-Uzelac 2005). Díky tomuto bohatému fenolickému složení se předpokládá, že meruňky mají dobrou antioxidační aktivitu, neboť existuje pozitivní a vysoce významný vztah mezi celkovým obsahem fenolů a antioxidační aktivitou (Karakaya *et al.* 2001).

Meruňky jsou klimakterické ovoce s velmi krátkou dobou skladovatelnosti, jednak díky vysoké rychlosti dýchání a také díky rychlému procesu zrání (Egea 2007). Aby se prodloužila doba upotřebení plodů, byly vyvinuty různé způsoby konzervace, včetně zavařování, mrazení, sušení a balení v kontrolovaných atmosférách (Sharma 1992, Botondi 2015). Obecně lze říci, že jakákoli ztráta živin v ovoci a zelenině závisí na druhu, teplotě, době zpracování a podmínkách skladování.

Využití metody kapalinové chromatografie s detektorem využívající diodovým pole (DAD detekce) jako samostatné detekční techniky pro hodnocení obsahu fenolických látek v různých druzích ovoce, zeleniny a dalších rostlin je velmi běžné. DAD detekce umožňuje současný sběr dat napříč celým UV-VIS spektrem. 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. 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.

Cílem našeho výzkumu bylo porovnání obsahu polyfenolů a změn celkové antioxidační aktivity s časem u čerstvých plodů meruněk při využití posklizňového ošetření účinnou látkou 1-methylcyklopropan (1-MCP). Aplikace tohoto přípravku má za cíl prodloužit skladovatelnost ovoce. Velmi dobrých výsledků dosahuje ošetření plodů 1-MCP v kombinaci se skladováním v atmosféře s ultra nízkým obsahem kyslíku (ULO) či v jinak řízené atmosféře (Bílková *et al.* 2020). Účinná látka 1-MCP se při posklizňovém ošetření přednostně naváže na receptory ethylenu a tím blokuje další dozrávání plodu klimakterického typu.

MATERIÁL A METODY

Analyzované vzorky

Testované vzorky plodů meruněk k analýze obsahu polyfenolických látek a antioxidační aktivity byly získány z experimentální výsadby VÝZKUMNÉHO A ŠLECHTITELSKÉHO ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉHO HOLOVOUSY s.r.o. Pro výzkum byla vybrána středně raná odrůda meruňky 'Betinka', která je vhodná pro přímý konzum. Vzorky plodů byly odebírány ze dvou typů výsadeb, kde v jedné výsadbě byly praktikovány zásady integrované ochrany ovoce, a druhá výsadba byla obhospodařována bez použití jakýchkoliv pesticidů.

Podmínky a technologie skladování

Posklizňové ošetření proběhlo v první den po naskladnění. Přípravek na bázi 1-MCP byl aplikován rozptýlením pomocí difuzéru v plynotěsně uzavřených prostorách ULO boxu. Použitá dávka 1-MCP u plodů meruněk byla 0,06 g/m³. Doba působení přípravku trvala 24 hodin. Po této době došlo k vyvětrání atmosféry obsahující 1-MCP. Po vyvětrání byl skladovací kontejner opět uzavřen a další skladování probíhalo v běžné atmosféře. V rámci studie byly porovnávány čerstvé plody a plody skladované po dobu 20 dní.

Příprava vzorků a stanovení obsahu polyfenolických látek pomocí HPLC-DAD

Extrakty byly připraveny navážením 3 g homogenátu meruněk a přidáním 15 ml extrakčního roztoku (0,1% koncentrované kyseliny octové v methanolu). Následovala extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 10 min, centrifugace při 4400 rpm a 4 °C po dobu 10 min. Následně byl supernatant přefiltrován přes PTFE filtr s velikostí pórů 0,22 µm. Extrakty byly před analýzou uchovávány ve tmě při teplotě 4 °C.

Celkem bylo ke stanovení vybráno 16 fenolických látek, které se v meruňkách vyskytují (Campbell 2013, Dragovic-Uzelac 2005, Gardia-Viguera 1994, Radi 2004, Roussos 2011). Pro stanovení byla použita validovaná metoda HPLC-DAD s přístrojem DionexUltiMate™ 3000 RSLC systém. Každý vzorek byl proměřen třikrát a z jednotlivých hodnot byl vypočítán průměr. Fenolické látky byly detekovány spektrofotometricky při různých vlnových délkách. Rutin, kvercitrin, myricetin a kvercetin byl detekován při 254 nm, kyselina protokatechinová a kaempferol pak při 260 nm. Kyselina gallová, salicylová, o-kumarová a 4-aminobenzoová, jakož i katechin, epikatechin a vanilin byly detekovány při 280 nm a nakonec kyseliny chlorogenová, p-kumarová a ferulová při 320 nm. Získané výsledky jsou uvedeny jako množství dané polyfenolické látky v mg/g čerstvého ovoce.

Použité podmínky separace byly následující: mobilní fáze A: ultračistá voda upravená na pH 2,8 pomocí kyseliny octové, mobilní fáze B: acetonitril. Gradientová eluce s následujícím obsahem B v mobilní fázi A: 0 min 10% B, 7 min 18% B, 13,6 min 45% B, 14–17 min 10% B. Průtoková rychlost byla 0,6 ml/min a nástřikový objem vzorku 1 µl. Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Separace probíhala na koloně Luna Omega Polar C18 (150×4,6 mm; 5 µm) s předkolonou Security Guard™ Polar (4 x 2 mm; 3 µm). Detekce probíhala při výše uvedených vlnových délkách s ohledem k stanovovaným polyfenolickým látkám.

HPLC-CoulArray analýza antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byla využita CoulArray™ detekce elektro-aktivních látek. Byl zvolen 8kanálový CoulArray 5600A detektor (ESA, Chelmsford, MA, USA). Detektor byl tandemově zapojen k HPLC systému Agilent 1260 Infinity. Pro vyhodnocení získaných dat byl použit CoulArray 3.10 software. Potenciál 8kanálového detektoru byl nastaven v rozsahu 200–900 mV s pravidelným přírůstkem po 100 mV.

Hodnota 200 mV zajistila oxidaci silně redukujících interferujících látek z matrice vzorku nebo z mobilní fáze. Vysoký potenciál až do 900 mV pak zajistil oxidaci přirozeně se vyskytujících antioxidantů v extraktu meruněk.

Pro separaci látek byly použity mobilní fáze v následujícím složení: octanový pufr okyselený kyselinou mravenčí na pH 3 (mobilní fáze A) a acetonitril (mobilní fáze B) v gradientové eluci s následujícím průběhem: 0 min 5% B, 15 min 30% B, 25 min 50% B, 27 min 50% B. Poté následovala ekvilibrace kolony do původních podmínek metody (5% B). Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Separace probíhala na stejné koloně Luna Omega Polar C18 (150×4,6 mm;

5 µm) s kompatibilní předkolonou Ascentis Express C18 s rozměry 50×4,6 mm; 5 µm při teplotě 35 °C. Nástřikový objem vzorku byl 10 µl. Byly hodnoceny plochy píků získané z odezvy 8kanálového detektoru.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Polyfenolické látky kyselina chlorogenová, katechin, epikatechin a rutin byly detekovány a kvantifikovány u všech testovaných vzorků. Porovnání obsahů fenolických látek u kontrolního vzorku a u skladovaných plodů je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1. Porovnání koncentrací detekovaných látek v čerstvém a skladované vzorku s aplikací pesticidů a bez postřiků pesticidů

Table 1. Comparison of concentrations of detected substances in fresh and stored sample with application of preparations and without application of preparation

Stanovovaná látka ²⁾	Koncentrace (mg/g) ¹⁾			
	Plody s aplikací pesticidů ³⁾	Plody bez postřiku pesticidů ⁴⁾	Plody s aplikací pesticidů ³⁾	Plody bez postřiku pesticidů ⁴⁾
	Čerstvé plody ⁵⁾		Plody po 20 dnech skladování ⁶⁾	
Kyselina chlorogenová	31,45	56,09	113,42	120,55
Katechin	35,68	40,92	58,25	třené
Epikatechin	20,67	20,54	30	22,19
Rutin	29,88	51,08	44,59	62,99

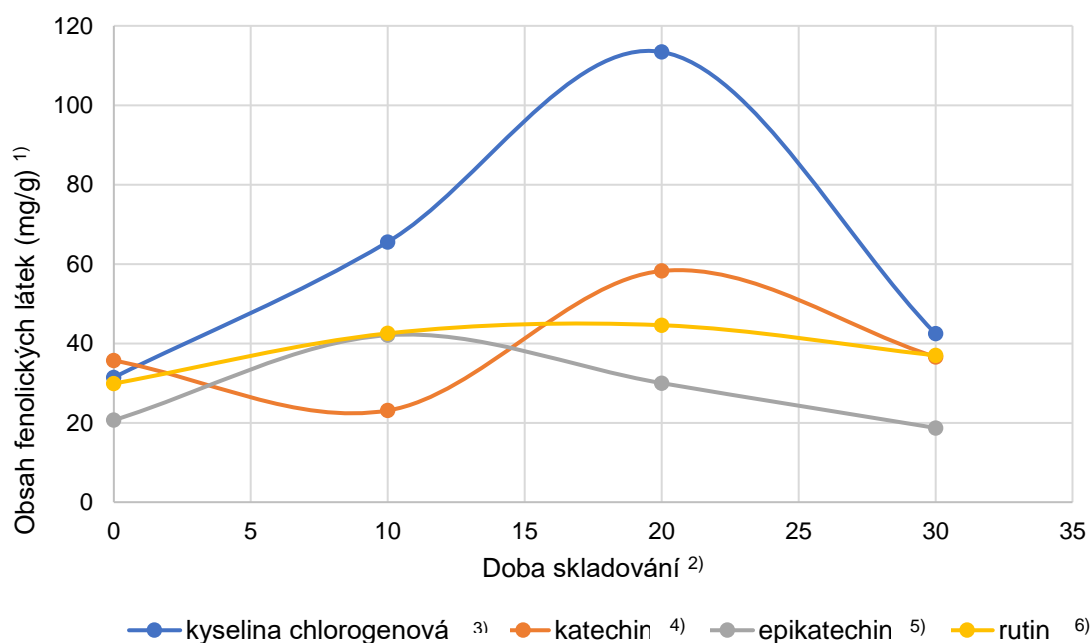
1) Concentration (mg/g), 2) Substance, 3) Fruits with application of pesticides, 4) Fruits without application of pesticides, 5) Fresh fruits, 6) Fruits after 20 days of storage

Změny obsahů fenolických sloučenin v průběhu skladování u všech kvantifikovaných látek byly způsobeny uvolňováním z jejich glykosidických forem (Majerčíková 2020). Největší kolísání hladin koncentrací bylo u kyseliny chlorogenové, kde docházelo k největšímu nárůstu a následnému postupnému poklesu obsahu. Změny obsahu fenolických látek byly způsobeny enzymatickou aktivitou ve skladovaném ovoci, při které docházelo k uvolnění aglykonů z glykosidických forem (první fáze). Při delším skladování pak může docházet i k rozkladu (druhá fáze). Nejlépe byla tato změna vidět u kontrolního vzorku bez ošetření, kde byly změny enzymatické aktivity nejvyšší. Což potvrzují výsledky stanovení jednotlivých fenolických látek metodou HPLC-DAD, ale i HPLC – Coularray (odezva detektoru 350,98 ± 47,37 µC).

Vývoj obsahu detekovaných látek stanovených metodou HPLC- DAD v průběhu skladování u vzorku s aplikací pesticidů je zdokumentován v grafu 1. Obsahy fenolických látek u čerstvých plodů a během skladování detekované metodou HPLC a detekce CoulArray jsou uvedeny v grafu 2. Plochy píků získané z odezvy 8kanálového detektoru byly hodnoceny jako suma pro porovnání celkového obsahu antioxidantů. Co se týče obsahu fenolických látek u čerstvých plodů meruněk s aplikací pesticidů byla odezva signálu 166,71 ± 7,0 µC, u skladovaných plodů

po dobu 20 dnů byla odezva signálu $342,09 \pm 54,68 \mu\text{C}$. Obsah polyfenolických látek během skladování u kontrolní varianty bez postřiku pesticidů je zdokumentován v grafu 3.

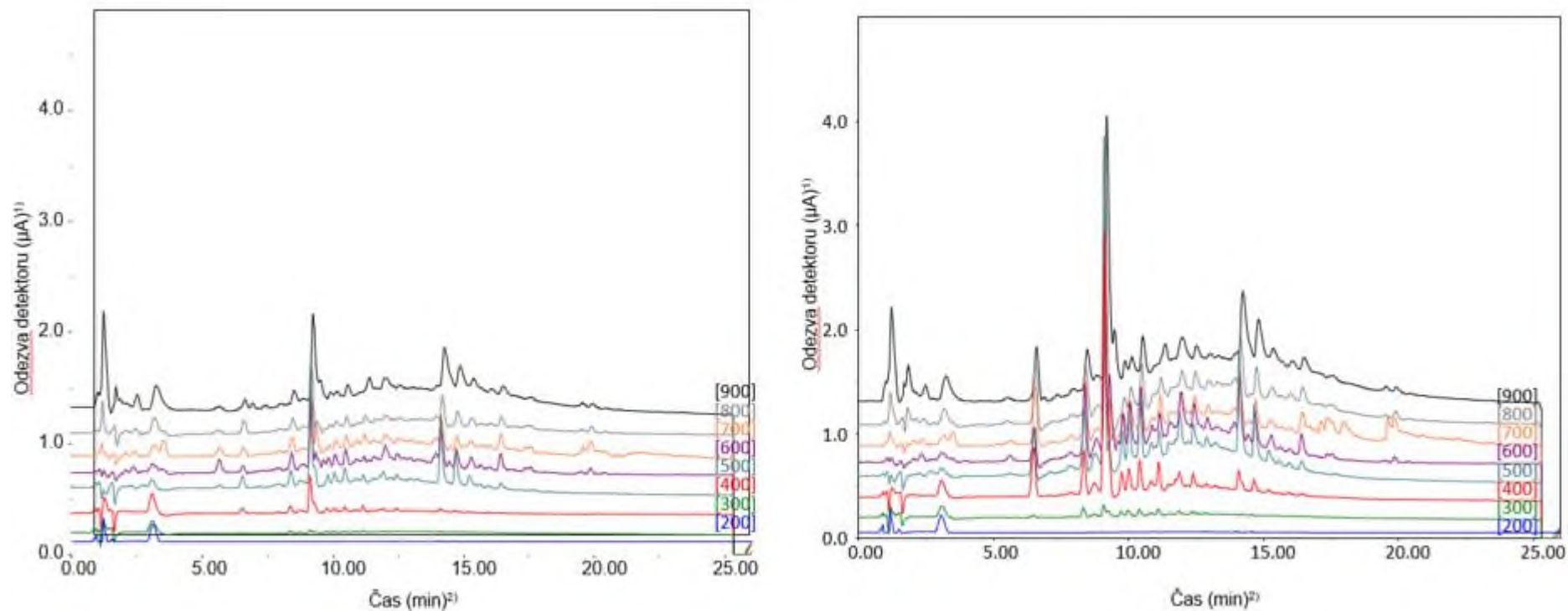
Graf 1. Vývoj obsahu detekovaných látek v průběhu skladování u vzorku s aplikací pesticidů
Graph 1. Development of the content of detected substances during storage of the sample with application of pesticides



1) Content of phenolic compounds (mg/g), 2) Days of storage, 3) Chlorogenic acid, 4) Catechin, 5) Epicatechin, 6) Rutin

Graf 2. Obsahy fenolických látek u vzorku čerstvých plodů meruněk vzorku s aplikací pesticidů (vlevo) a po vyskladnění po 20 dnech (vpravo) detekované metodou HPLC a detekce CoulArray

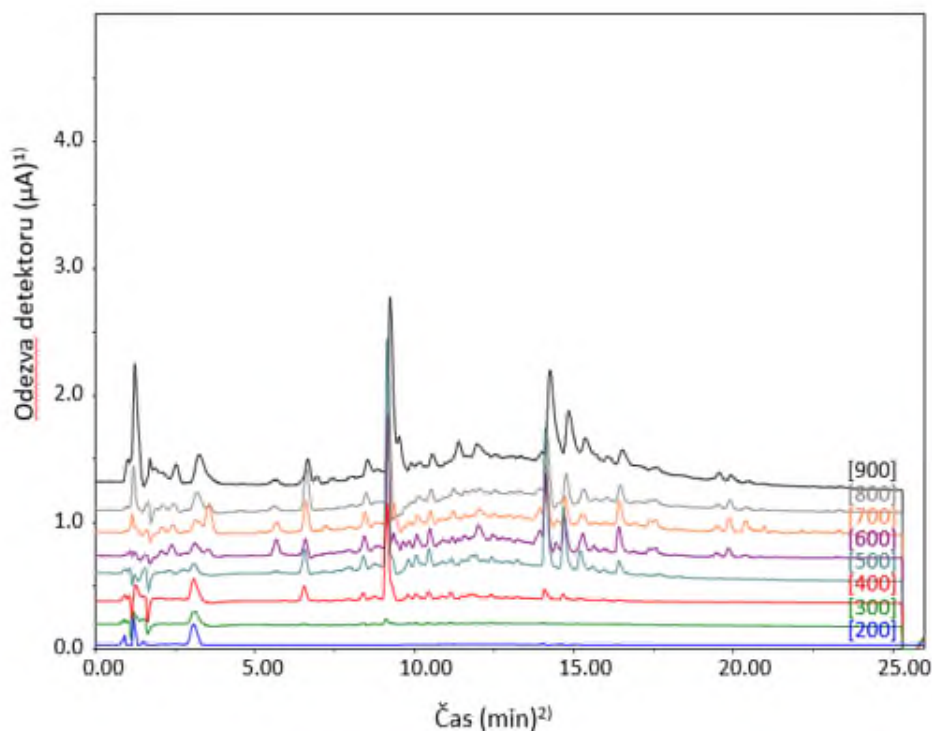
Graph 2. Phenolic contents in a sample of fresh apricot fruits of the sample with application of pesticides (left) and after removal from storage after 20 days (right) determined by HPLC and CoulArray detection



1) Detector response (µA), 2) Time (min)

Graf 3. Obsahy fenolických látek u skladovaných plodů meruněk kontrolního vzorku bez postřiku pesticidů

Graph 3. Content of phenolic substances in stored apricot fruits of the control sample without spraying pesticides



1) Detector response (μA), 2) Time (min)

ZÁVĚR

Ve vzorcích čerstvých a skladovaných plodů meruněk odrůdy 'Betinka' byly detekovány a kvantifikovány tyto fenolické sloučeniny: kyselina chlorogenová, katechin, epikatechin a rutin. Dále se ve vzorcích vyskytovaly ještě kyseliny gallová, protokatechinová, p-kumarová, salicylová, o-kumarová, a také kaempferol, obsah těchto látek byl ale pod limitem kvantifikace. V případě kyseliny gallové a kyseliny protokatechinové pod 0,2 mg/g, p-kumarové kyseliny pod 0,15 mg/g, salicylové kyseliny pod 3 mg/g, o-kumarové kyseliny pod 0,1 mg/g a kaempferolu pod 0,3 mg/g.

Co se týče stability fenolických látek v analyzovaných vzorcích, bylo u vzorku s aplikací pesticidů následně vidět, že během skladování docházelo ke kolísání koncentrace kyseliny chlorogenové, oproti tomu epikatechin a rutin byly během skladování látkami více stabilními. U katechinu docházelo nejprve k mírnému poklesu, ale pak byl trend nárůstu obsahu obdobný jako u kyseliny chlorogenové. Dříve publikované studie dokazují, že na obsah vybraných fenolických látek mohou mít vliv tyto faktory: období sklizně, odrůda, fáze sklizně a typ skladování (Awad *et al.* 2000, Rössle *et al.* 2010).

Využití vhodného typu posklizňového ošetření ukázalo, že vysoký obsah polyfenolů a antioxidantů lze udržet optimálními podmínkami skladování.

PODĚKOVÁNÍ

Při zpracování této studie bylo využito institucionální podpory DKRVO Ministerstva zemědělství České republiky RO1522.

LITERATURA

- AWAD, M.A. and A. DE JAGER. Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biology and Technology [online]*. 2000, 20(1): 15–24 [cit. 2022-03-09]. ISSN 09255214. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00116-2.
- BÍLKOVÁ, A., P. KNAPOVÁ, P. SURAN and M. SKALSKÝ. *Metodika minimalizace obsahu reziduí pesticidů u peckovin s využitím ochrany rostlin a dlouhodobého skladování*. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO, 2020. ISBN 978-80-87030-79-0.
- BOTONDI, R., A. CRISÀ, R. MASSANTINI and F. MENCARELLI. Effects of low oxygen short-term exposure at 15° C on postharvest physiology and quality of apricots harvested at two ripening stages. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology [online]*. 2015. 75(2):202–208,[cit.2022-01-26].ISSN 1462-0316. DOI:10.1080/14620316.2000.11511224.
- CAMPBELL, O. E. and O.I. PADILLA-ZAKOUR. Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International [online]*. 2013, 54(1): 448–455 [cit. 2020-03-31]. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.07.016.
- DRAGOVIC-UZELAC, V., J. POSPISIL, B. LEVAJ and K. DELONGA. The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity. *Food Chemistry [online]*. 2005, 91(2): 373–383 [cit. 2020-03-31]. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.004.
- EGEA, M.I., M. C. MARTÍNEZ-MADRID, P. SÁNCHEZ-BEL, M. A. MURCIA and F. ROMOJARO. The influence of electron-beam ionization on ethylene metabolism and quality parameters in apricot (*Prunus armeniaca* L., cv Búlida). *LWT - Food Science and Technology [online]*. 2007. 40(6): 1027–1035 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00236438. DOI:10.1016/j.lwt.2006.06.005
- GARCIA-VIGUERA, C., P. BRIDLE, F. FERRERES and F. A. TOMAS-BARBERAN. Influence of variety, maturity and processing on phenolic compounds of apricot juices and jams. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung [online]*. 1994, 199(6): 433–436 [cit. 2020-03-31]. DOI: 10.1007/BF01193268. ISSN 0044-3026.
- JIMÉNEZ, A.M., M. MARTÍNEZ-TOMÉ, I. EGEA, F. ROMOJARO and M.A. MURCIA. Effect of industrial processing and storage on antioxidant activity of apricot (*Prunus armeniaca* v. bulida). *European Food Research and Technology [online]*. 2008, 227(1): 125–134 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1438-2377. DOI: 10.1007/s00217-007-0701-1.
- KARAKAYA, S., S.N. EL and A.A. TAŞ. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International Journal Food Science Nutrition*. 2001, 52(6): 501–8. PMID: 11570016.
- MAJERČÍKOVÁ, J. *HPLC separace fenolických látek z rostlinného materiálu*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie.

- RADI, M., M. MAHROUZ, A. JAOUAD and M. J. AMIOT. Characterization and identification of some phenolic compounds in apricot fruit (*Prunus armeniaca* L.) *Sci. Aliments*. 2004, 24: 173–184. Dostupné z: https://sda.revuesonline.com/gratuit/sda24_2_173-184.pdf.
- RÖSSLE, Ch., H.H. WIJNGAARD, R.T. GORMLEY, F. BUTLER and N. BRUNTON. 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 [online]*. 2010, 58(3): 1609–1614 [cit. 2022-03-09]. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf903621y.
- ROUSSOS, P. A., V. SEFFEROU, N. K. DENAXA, E. TSANTILI and V. STATHIS. Apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit quality attributes and phytochemicals under different crop load. *Scientia Horticulturae [online]*. 2011, 129(3): 472–478 [cit. 2020-03-31]. ISSN 03044238. DOI: 10.1016/j.scienta.2011.04.021.