

ANTIOXIDAČNÍ CHARAKTERISTIKY TŘEŠNÍ Z RŮZNÝCH REGIONŮ V ČESKÉ REPUBLICE

ANTIOXIDATION CHARACTERISTICS OF SWEET CHERRIES FROM DIFFERENT REGIONS IN THE CZECH REPUBLIC

Aneta Bílková^{1,2}, Pavlína Knapová¹, Dáša Jiroušová¹

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

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

email: aneta.bilkova@vsuo.cz, ORCID ID: 0000-0002-5186-0559

ABSTRAKT

Třešně jsou velmi dobrým zdrojem fenolických sloučenin v naší stravě včetně zdravotně cenných anthokyanů, které mají protizánětlivé, antivirové a protinádorové účinky. V této studii byly měřeny chemické atributy 3 odrůd třešní: 'Regina', 'Kordia' a 'Tamara' z ekologické a integrované produkce ze čtyř regionů České republiky. Byla porovnána celková antioxidační aktivita, obsah celkových polyfenolů a obsah anthokyanů. Nejvyšší antioxidační potenciál byl stanoven u odrůdy 'Kordia' z ekologické výsadby Ostroměř díky vysoké hodnotě celkové antioxidační aktivity $179,0 \pm 14,3 \mu\text{mol Troloxu}/100 \text{ g}$ čerstvého ovoce, obsahu celkových polyfenolů $138,6 \pm 15,7 \text{ mg}$ ekvivalentu kyseliny gallové na 100 g čerstvého ovoce a obsahu anthokyanů $54,4 \pm 6,8 \text{ mg}$ na 100 mg čerstvého ovoce.

Klíčová slova: třešně, antioxidační aktivita, celkové polyfenoly, anthokyany

ABSTRACT

Sweet cherries are a very good source of phenolic compounds in our diet, including health-valuable anthocyanins, which have anti-inflammatory, antiviral and anti-tumor effects. This study concerned the determination of chemical attributes of three cherry varieties: 'Regina', 'Kordia', and 'Tamara' from organic and integrated production in four regions in the Czech Republic. The total antioxidant activity of the varieties, the content of total polyphenols, and anthocyanins were compared. The highest antioxidant potential was found for the variety 'Kordia' from the organic planting in Ostroměř thanks to the high value of the total antioxidant activity $179.0 \pm 14.3 \mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ fresh fruit, the content of total polyphenols $138.6 \pm 15.7 \text{ mg}$ gallic acid equivalent/100 g fresh fruit, and the content of anthocyanins $54.4 \pm 6.8 \text{ mg}/100 \text{ g}$ fresh fruit.

Keywords: sweet cherries, antioxidant activity, total polyphenols, anthocyanins

ÚVOD

Celosvětová produkce třešní vzrostla za posledních 16 let z 1,9 na 2,32 milionů tun, přičemž hlavními producenty byly Turecko, USA a Írán (Blando a Oomach 2019). Produkce a spotřeba třešní se v poslední době zvýšila kvůli povědomí spotřebitelů o jejich zdravotních přínosech.

Třešně jsou jedním z nejoceňovanějších plodů spotřebiteli pro svůj atraktivní vzhled, organoleptické vlastnosti a pro nutriční vlastnosti, zejména obsah bioaktivních sloučenin. Hlavními skupinami bioaktivních sloučenin přítomných v třešních jsou fenolické sloučeniny, včetně fenolových kyselin, jako jsou deriváty hydroxyskořicové kyseliny a flavonoidy zahrnující anthokyany, flavan-3-oly a flavonoly, které souvisí s jejich antioxidačním potenciálem (Gao a Mazza 1995, Chockchaisawasdee *et al.* 2016). Třešně mají nízký glykemický index (Bastos *et al.* 2014), což je výhodné především při diabetu, nadváze, ale i prevenci a léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

Anthokyany jsou skupinou přirozeně se vyskytujících pigmentů, odpovědných za červeno-modrou barvu mnoha druhů ovoce a zeleniny, patřících do polyfenolické podtřídy flavonoidů. V přírodě se vyskytuje 31 známých anthokyanidinů, přičemž pelargonidin, kyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin a malvidin jsou přítomny v 90 % anthokyanových struktur ovoce a zeleniny.

Z dostupné literatury je zřejmé, že anthokyany byly v posledním desetiletí předmětem rozsáhlých výzkumů kvůli jejich antioxidační aktivitě a přínosům pro lidské zdraví (Pojer *et al.* 2013).

Anthokyany jsou zodpovědné za červenou barvu třešní, což je nejdůležitější ukazatel zralosti a kvality jak čerstvých, tak zpracovaných třešní (Gao a Mazza 1995). U třešní určených ke zpracování má barva přímý vliv na kvalitu hotových výrobků (Drake *et al.* 1982). V plodech třešní bylo nalezeno pět anthokyanů: cyanidin 3-glukosid, cyanidin 3-rutinosid, peonidin 3-glukosid, pelargonidin 3-rutinosid a peonidin 3-rutinosid (Usenik *et al.* 2008, Kelebek a Selli 2011). Cyanidin 3-rutinosid je dominantním anthokyanem a tvoří přibližně 90 % celkového obsahu anthokyanů v třešních. Poté v klesající koncentraci následuje cyanidin 3-glukosid, pelargonidin-3-rutinosid, peonidin 3-rutinosid a peonidin 3-glukosid (Usenik *et al.* 2008, Kelebek a Selli 2011). Je však třeba poznamenat, že poměr jednotlivých anthokyanů závisí na kultivaru třešně. Podle dostupné studie Mozetič *et al.* (2006) uvedli, že anthokyany třešní 'Lambert Compact' obsahovaly 91,4 % kyanidinu 3-rutinosidu, 4,3 % kyanidinu 3-glukosidu, 3,8 % peonidinu 3-rutinosidu a 0,5 % pelargonidinu 3-rutinosidu.

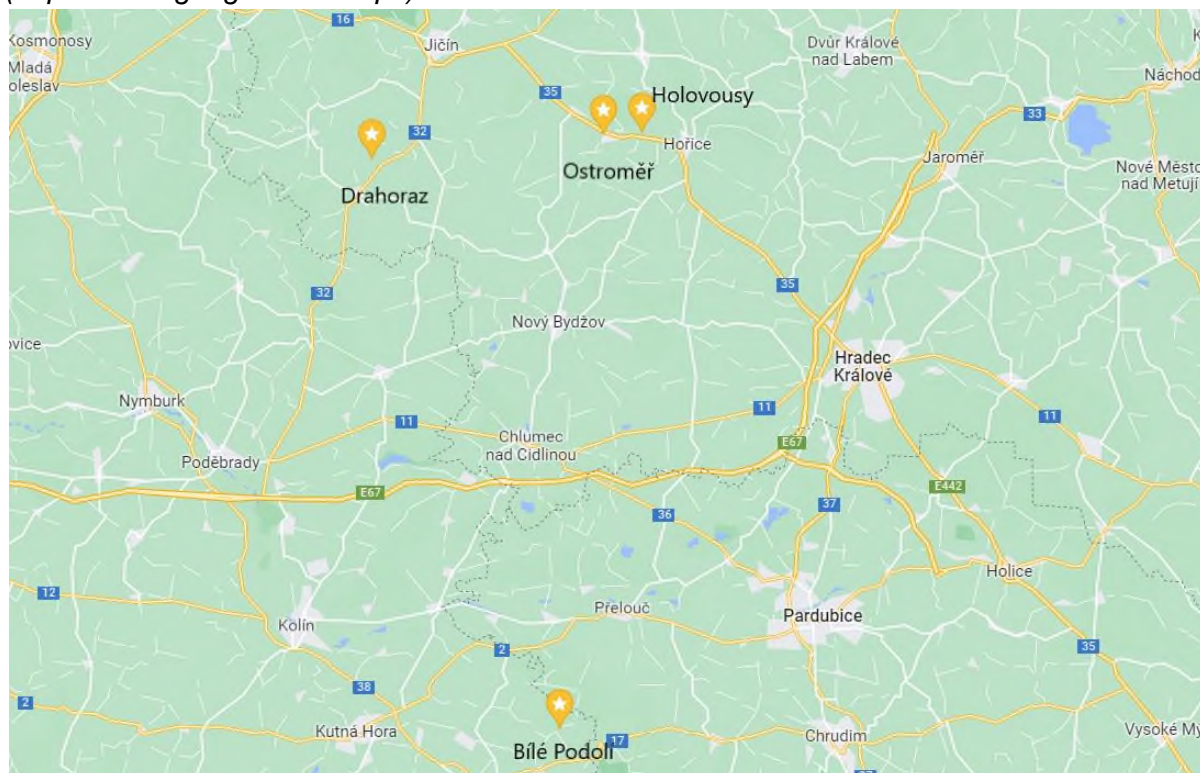
Cílem naší práce bylo kvantifikovat chemické atributy (celkový obsah polyfenolů, anthokyanů a celkovou antioxidační aktivitu) u 3 vybraných odrůd třešní pocházejících z integrované (IPM) a ekologické (BIO) produkce z různých regionů ČR.

MATERIÁL A METODY

Analyzované vzorky

Stanovení antioxidačních charakteristik bylo provedeno u 3 vybraných odrůd třešní pocházejících z integrované a ekologické produkce z různých regionů ČR: Holovousy, Ostroměř, Bílé Podolí a Drahoraz (mapa regionů viz Obrázek 1). K chemickým analýzám vybraných obsahových látek byly vybrány odrůdy 'Kordia', 'Regina' a 'Tamara' (pouze výsadba Holovousy a Drahoraz). Plody čerstvých třešní byly před vlastní chemickou analýzou odpeckovány a homogenizovány pomocí nožového mlýnu Grindomix GM200 (Verder Scientific, Haan, Německo).

Obrázek 1. Mapa regionů, z nichž byly získány vzorky třešní (<https://www.google.com/maps>)
Picture 1. Map of regions from which originated cherry samples (<https://www.google.com/maps>)



Příprava vzorku

Navážka 2 g vzorku homogenizovaného ovoce byla přenesena do 15 mL centrifugačních zkumavek a bylo přidáno 8 mL methanolu a 100 μ L koncentrované kyseliny mravenčí. Následovala extrakce za použití laboratorní třepačky po dobu 1 hod při rychlosti 340 rpm a odstředění při 4400 ot/min po dobu 10 min. Posledním krokem byla filtrace přes 0,45 μ m PTFE filtr do vialek. Takto připravené extrakty byly použity pro stanovení celkové antioxidační aktivity, stanovení celkových polyfenolů metodou Folin-Ciocalteu a pro stanovení anthokyanů metodou HPLC-DAD.

Metoda TEAC pro stanovení celkové antioxidační aktivity

Metoda TEAC pro stanovení celkové antioxidační aktivity v mikrotitrační destičce vychází z článku Bobo-García *et al.* (2014). V mikrotitrační destičce pro spektrofotometrické stanovení bylo smícháno 180 μ L pracovního roztoku 2,2-difenyl-1-picrylhydrazylu (DPPH, 150 μ mol/L) s 20 μ L extraktu ovoce. Mikrotitrační destičky s napipetovanými roztoky byly třepány na třepačce po dobu 1 min, poté byly zakryty a ponechány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 40 min. Absorbance byla poté změřena pomocí spektrofotometru EPOCH (BioTec, Winooski, Vermont, USA), upraveného pro detekci v mikrotitračních destičkách (micro UV reader) při 515 nm. Aktivita extraktů založená na vylavování DPPH radikálu byla vynesena do grafu proti měnící se koncentraci Troloxu a výsledky byly vyjádřeny v jednotkách μ mol Troloxu/100 g čerstvého ovoce. Každý extrakt byl proměřen třikrát a použit byl průměr.

Metoda Folin-Ciocalteu pro stanovení celkových polyfenolů

Metoda Folin-Ciocalteu je určena pro stanovení celkových polyfenolů v mikrotitrační destičce (Bobo-García *et al.* 2014). Reakce je založena na chemické redukci Folin-Ciocalteuova činidla obsahujícího fosfomolybdenan a fosfowolframan vedoucí ke změně zbarvení (Kähkönen *et al.* 1999). Změna zbarvení se měří spektrofotometricky a výsledek se vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny gallové (GAE), jako standardního roztoku. Celkový obsah polyfenolů byl stanoven v každém extraktu za použití činidla Folin-Ciocalteu. Kalibrace byla vytvořena s pomocí kyseliny gallové v koncentračním rozsahu 10–500 mg/L. Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo nejprve pětkrát zředěno destilovanou vodou a poté bylo do mikrotitrační destičky pipetováno 100 μL činidla a 20 μL extraktu ovoce. Mikrotitrační destička s napipetovanými roztoky byla třepána na třepačce po dobu 1 min. Poté byla ponechána stát po dobu 4 min při laboratorní teplotě. Následovalo přidání 75 μL uhličitanu sodného (100 g/L) a opět bylo s destičkou 1 min třepáno na třepačce. Poté byla destička zakryta a ponechána ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 2 hod. a následovalo měření absorbance při 750 nm. Výsledky byly vyjádřeny v mg kyseliny gallové na 100 g čerstvého ovoce. Každý extrakt byl proměřen třikrát a byl vypočítán průměr.

Metoda HPLC-DAD pro stanovení anthokyanů

Pro identifikaci a kvantifikaci anthokyanů z třešně byl použit HPLC-DAD systém Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA). Mobilní fáze byla složena z 2% kyseliny mravenčí, která tvořila složku A a methanol byl použit jako složka B v gradientové eluci. Popis gradientu je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Gradient mobilní fáze pro HPLC-DAD stanovení anthokyanů**Table 1. Gradient of mobile phase for HPLC-DAD determination of anthocyanins**

Čas (min) ¹⁾	Mobilní fáze A (%) ²⁾	Mobilní fáze B (%) ³⁾
0	95	5
4	80	20
8	75	25
10	10	90
10,15	10	90
10,3	95	5
13	95	5

1) Time (min), 2) Mobile phase A (%), 3) Mobile phase B (%)

Průtoková rychlost byla 1 mL/min. Separace probíhala na koloně Kinetex F5 100A (150 \times 4,6 mm; 2,6 μm) při teplotě 50 °C. Objem nastříkovaného vzorku byl 4 μL . Spektrofotometrická detekce probíhala při 520 nm. Identifikace jednotlivých anthokyanů byla provedena na základě porovnání retenčních časů komponent ze vzorků třešně a retenčních časů standardních látek cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu. Standardy anthokyanů pocházely od firmy Extrasynthese a byly uchovávány v mrazicím boxu při -18 °C. Z každého z těchto standardů byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mg/mL v 1% methanolicém roztoku kyseliny mravenčí. Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 5; 10; 20; 50; 100; 150 a 250 $\mu\text{g/mL}$. Obsahy analytů ve vzorcích byly vypočteny

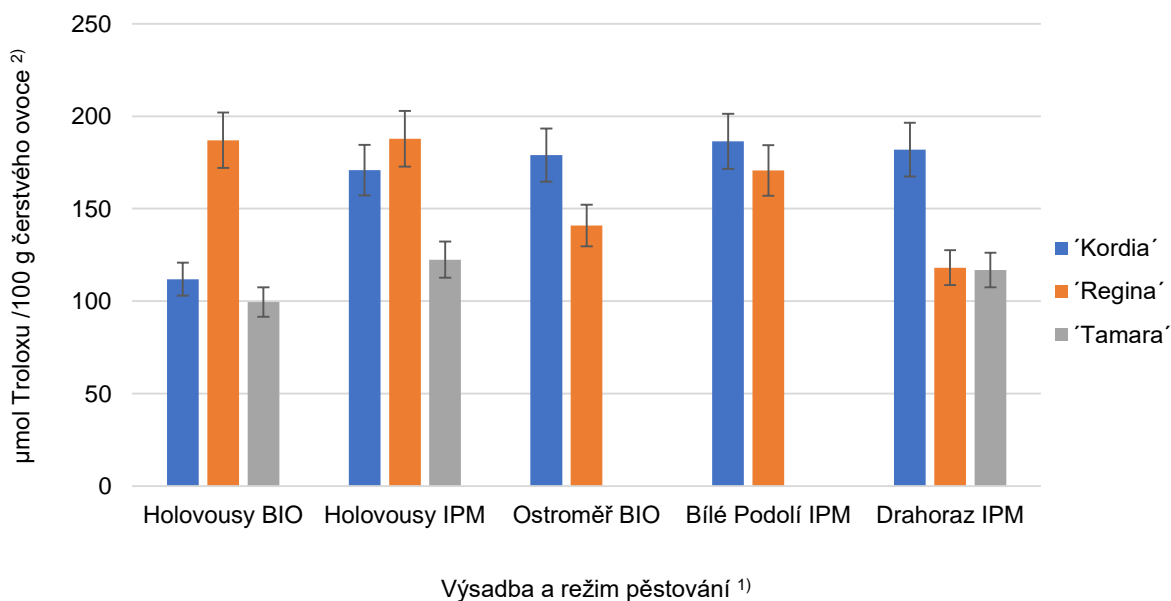
s použitím kalibrační křivky a přepočítány na množství jednotlivých anthokyanů ve 100 g čerstvého ovoce.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Hodnoty celkové antioxidační aktivity vzorků třešní jsou zobrazeny v grafu 1. Nebyly pozorovány výrazné rozdíly hodnot celkové antioxidační aktivity u odrůdy 'Kordia' z dvou regionů v režimu pěstování IPM. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od $170,9 \pm 13,7$ (IPM Holovousy) až $186,4 \pm 14,9$ $\mu\text{mol Troloxu}/100$ g čerstvého ovoce (IPM Bílé Podolí). Chybové úsečky v grafu 1 znázorňují relativní směrodatnou odchylku 8 %, která vychází z validace metody. Rozdílné hodnoty celkové antioxidační aktivity byly stanoveny u odrůdy 'Regina'. Nejnížší hodnoty byly naměřeny u odrůdy pěstované v režimu IPM Drahoraz, a to $118,1 \pm 9,4$ $\mu\text{mol Troloxu}/100$ g čerstvého ovoce, nejvyšší hodnota byla naměřena u plodů ze sadu Holovousy v režimu IPM $187,8 \pm 15,0$ $\mu\text{mol Troloxu}/100$ g čerstvého ovoce. Z grafu 1 jsou vidět rozdíly i v rámci vybraných režimů pěstování (IPM x BIO) u testovaných odrůd.

Graf 1. Celková antioxidační aktivita měřená metodou TEAC vyjádřený v $\mu\text{mol Troloxu}/100$ g čerstvého ovoce u vybraných odrůd třešní v navržených režimech pěstování

Graph 1. Total antioxidant activity determined by TEAC method expressed in $\mu\text{mol Trolox}/100$ g fresh fruit for selected varieties and cultivation regimes



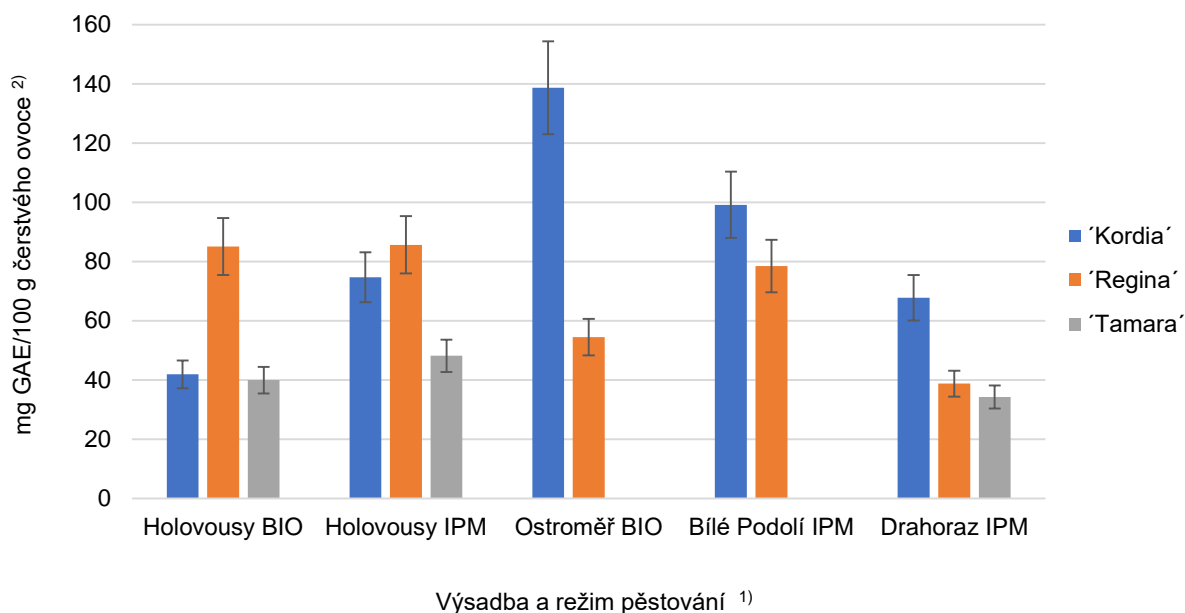
1) Planting and cultivation regime, 2) $\mu\text{mol Trolox}/100$ g fresh fruit

Celkový obsah polyfenolů v třešních se liší v závislosti na kultivarech a prostředí, tedy na lokalitě pěstování. Obsahy celkových polyfenolů odrůd 'Kordia', 'Regina' a 'Tamara' v režimu integrované a bio produkce jsou znázorněny v grafu 2. Z grafu jsou patrné rozdíly obsahů celkových polyfenolů u odrůdy 'Kordia' pěstované v režimu bio produkce. U odrůdy 'Kordia' pěstované v produkci BIO Holovousy byla stanovena hodnota $41,9 \pm 4,7$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce, zatímco u stejné odrůdy z výsadby Ostroměř byly stanoveny obsahy $138,6 \pm 15,7$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce. U odrůdy 'Regina' se obsahy polyfenolů

pohybovaly v rozmezí $38,7 \pm 4,4$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce ve výsadbě Drahoraz (režim IPM) až $85,6 \pm 9,7$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce pro vzorky z výsadby Holovousy (režim IPM). Chybové úsečky v grafu 2 znázorňují relativní směrodatnou odchylku 11,3 %, která vychází z validace metody. Hodnoty celkových polyfenolů jsou podobné i s dostupnou literaturou. Hladiny celkových polyfenolů podle Kima *et al.* (2005) byly naměřeny u odrůdy 'Regina' $104 \pm 6,6$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce. Rozdíly v hladinách celkových polyfenolů byly zaznamenány ve výsledcích studie prezentované Hallmannem a Rozparou (2017). Zde byly stanoveny obsahy celkových polyfenolů u odrůdy 'Regina' u konvenčního pěstování $197,37 \pm 11,2$ mg GAE/100 g čerstvého ovoce, což může být způsobeno např. odlišnými klimatickými podmínkami, lokalitou pěstování atd.

Graf 2. Hodnoty celkových polyfenolů v mg GAE/100 g čerstvého ovoce u vybraných odrůd třešní v navržených režimech pěstování

Graph 2. Mean of values of total polyphenols in mg GAE/100 g fresh fruit in selected varieties and cultivation regimes

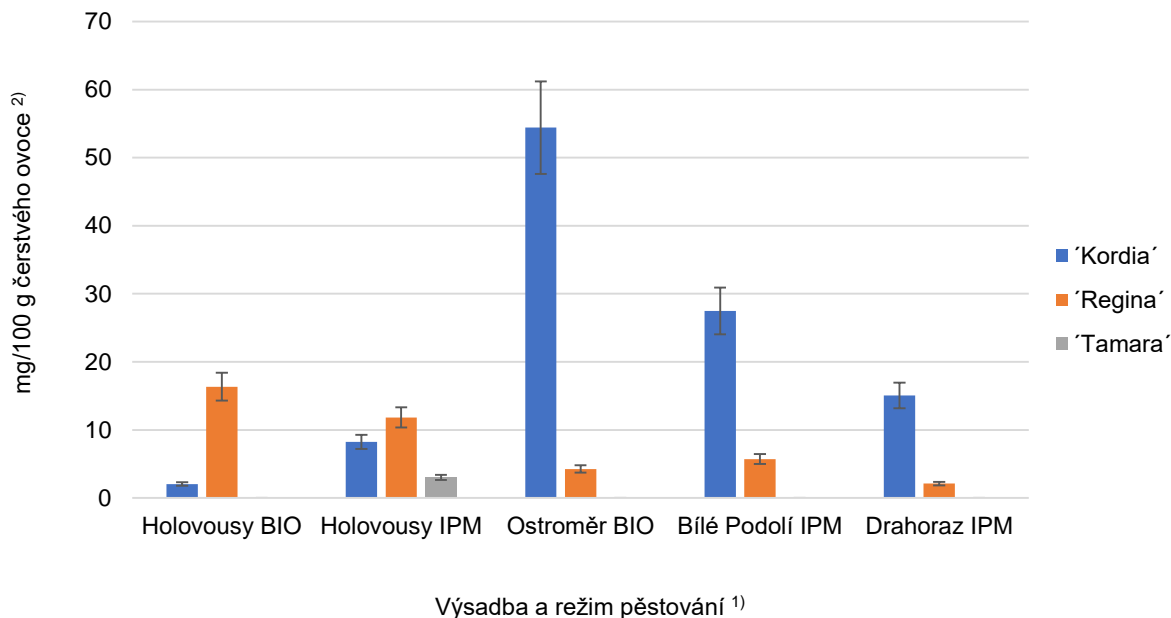


1) *Planting and cultivation regime*, 2) *mg GAE/100 g fresh fruit*

Graf 3 znázorňuje celkový obsah anthokyanů testovaných odrůd třešní. Celkové anthokyaniny jsou v grafu znázorněny jako suma dvou nejvíce se vyskytujících anthokyanů ve třešních, kterými byly cyanidin-3-rutinosid a cyanidin-3-glukosid. Limit kvantifikace byl u těchto analytů stanoven na 2 mg/100 g čerstvého ovoce. Jak je vidět z grafu 3, jsou znatelné rozdíly mezi obsahy anthokyanů v závislosti na režimu pěstování. Nejvyšší obsahy anthokyanů byly naměřeny u odrůdy 'Kordia' v režimu pěstování BIO v Ostroměři $54,4 \pm 6,8$ mg na 100 g čerstvého ovoce. Hallmann a Rozpara (2017) stanovili obsah anthokyanů u odrůdy 'Kordia' $47,43 \pm 0,7$ mg na 100 g čerstvého ovoce pěstované v režimu integrované produkce a u odrůdy 'Regina' $49,65 \pm 4,75$ mg na 100 mg čerstvého ovoce ve stejném režimu. Co se týče odrůdy 'Regina' byly hodnoty anthokyanů v rámci režimu pěstování rozdílné, pohybovaly se v rozmezí od $2,1 \pm 0,3$ do $16,4 \pm 2,1$ mg na 100 g čerstvého ovoce. Chybové úsečky v grafu 3 znázorňují relativní směrodatnou odchylku 12,5 %, která vychází z validace metody.

Graf 3. Celkový anthokyanový profil odrůd třešňí stanovený metodou HPLC-DAD vyjádřený v mg/100 g čerstvého ovoce

Graph 3. Total anthocyanin profile of cherry varieties by the HPLC-DAD method expressed in mg/100 g of fresh fruit



1) Planting and cultivation regime, 2) mg/100 g fresh fruit

ZÁVĚR

Naše studie poukázala na rozdílnost v chemických vlastnostech testovaných odrůd třešňí pěstovaných v režimech integrované a BIO produkce. Antioxidační charakteristiky vybraných odrůd odrážely hladiny stanovených látek a celkové antioxidační aktivity. Nejlepší antioxidační atributy vykazovala odrůda 'Kordia' z výsadby Ostroměř BIO, a to díky vysoké celkové antioxidační aktivitě měřené metodou TEAC, nejvyšším hladinám celkových polyfenolů a nejvyšším obsahům anthokyanů. Ze získaných výsledků je patrné, že u odrůdy 'Tamara' byly ve většině případů nižší hladiny všech stanovených antioxidačních charakteristik.

PODĚKOVÁNÍ

Článek vznikl za podpory projektu QK1910296 a zároveň byla použita infrastruktura RO1522.

LITERATURA

BASTOS, C., L. BARROS, M. DUEÑAS, R.C. CALHELHA, M.J.R.P. QUEIROZ, C. SANTOS-BUELGA a I.C.F.R. FERREIRA. Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chemistry* [online]. 2015, 173: 1045–1053 [cit. 2022-09-08]. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.145.

- BLANDO, F. a B.D. OOMAH. Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2019, 86: 517–529 [cit. 2022-09-07]. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.02.052.
- BOBO-GARCÍA, G., G. DAVIDOV-PARDO, C. ARROQUI, P. VÍRSEDA, M.R. MARÍN-ARROYO a M. NAVARRO. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2015, 95(1): 204–209 [cit. 2022-09-08]. DOI: 10.1002/jsfa.6706.
- DRAKE, S.R., E.L. PROEBSTING a S.E. SPAYD. Maturity Index for the Color Grade of Canned Dark Sweet Cherries¹. *Journal of the American Society for Horticultural Science* [online]. 1982, 107(2): 180–183 [cit. 2022-09-07]. DOI: 10.21273/JASHS.107.2.180.
- GAO, L. a G. MAZZA. Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1995, 43(2): 343–346 [cit. 2022-09-08]. DOI: 10.1021/jf00050a015.
- HALLMANN, E. a E. ROZPARA. The estimation of bioactive compounds content in organic and conventional sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* [online]. 2017, 62(3): 141–145 [cit. 2022-09-08].
- CHOCKCHASAWASDEE, S., J.B. GOLDING, Q.V. VUONG, K. PAPOUTSIS a C.E. STATHOPOULOS. Sweet cherry: Composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, 55: 72–83 [cit. 2022-09-08]. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.002.
- KÄHKÖNEN, M. P., A. I. HOPIA, H. J. VUORELA, J. RAUHA, K. PIHLAJA, T.S. KUJALA a M. HEINONEN. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47(10): 3954–3962. DOI: 10.1021/jf990146.
- KELEBEK, H. a S. SELLI. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2011, 46(12): 2530–2537 [cit. 2022-09-08]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02777.x.
- KIM, D., H.J. HEO, Y.J. KIM, H.S. YANG a C.Y. LEE. Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(26): 9921–9927 [cit. 2022-09-09]. DOI: 10.1021/jf0518599.
- MOZETIČ, B., M. SIMČIČ a P. TREBŠE. Anthocyanins and hydroxycinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatment. *Food Chemistry*, [online]. 2006, 97(2): 302–309 [cit. 2022-10-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.018.
- POJER, E., F. MATTIVI, D. JOHNSON a C.S. STOCKLEY. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2013, 12(5): 483–508 [cit. 2022-09-07]. DOI: 10.1111/1541-4337.12024.
- USENIK, V., J. FABČIČ a F. ŠTAMPAR. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* [online]. 2008, 107(1): 185–192 [cit. 2022-09-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.004.