

POLYFENOLY V ODRŮDÁCH JABLEK Z PĚSTITELSKÝCH REGIONŮ ČESKÉ REPUBLIKY A POLSKA

POLYPHENOLS IN APPLE VARIETIES FROM DIFFERENT FRUIT GROWING REGIONS OF THE CZECH REPUBLIC AND POLAND

Aneta Bílková^{1,2}, Pavlína Knapová¹, Dáša Jiroušová¹, Martin Mészáros¹, Jiří Sedlák¹

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

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

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

ABSTRAKT

Jablka jsou důležitým zdrojem polyfenolických látek, které jsou zodpovědné za antioxidační aktivitu ovoce. Konzumace jablek ve stravě významným způsobem přispívá k příjmu antioxidantů, které jsou spojovány s prevencí degenerativních onemocnění. Polyfenolické profily jablek z různých regionů České republiky a Polska byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Ve vzorcích jablek byly kvantifikovány kvercitrin, epikatechin, floridzin a kyselina chlorogenová. U odrůd 'Golden Delicious' a 'Idared' nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v profilech mezi regiony produkce jablek. Kyselina chlorogenová byla majoritním polyfenolem a její obsah byl spíše vyšší u jablek z Polska. Obsahy této látky byly u odrůdy 'Golden Delicious' $45,4 \pm 20,2 \mu\text{g/g}$ a u odrůdy 'Idared' $74,1 \pm 2,6 \mu\text{g/g}$, zatímco v Česku to bylo $34,2 \pm 14,0$ respektive $44,3 \pm 21,3 \mu\text{g/g}$. Naproti tomu česká jablka těchto odrůd obsahovala více epikatechinu a kvercitrinu.

Klíčová slova: *Malus domestica*, polyfenoly, kapalinová chromatografie

ABSTRACT

Apples are an important source of polyphenolic substances that contribute to the antioxidant activity of the fruit. Presence of apples in the diet significantly contributes to the intake of polyphenols. Apple consumption is associated with prevention of degenerative diseases. Polyphenolic profiles of apples from different regions of the Czech Republic and Poland were analyzed using high-performance liquid chromatography with diode array detection. Four phenolic substances quercitrin, epicatechin, phloridzin, and chlorogenic acid were determined in selected apples samples. No statistically significant differences between the regions of the given country were determined for the varieties 'Golden Delicious' and 'Idared'. Chlorogenic

acid was the major polyphenol in apples from Poland and its content tended to be higher being $45.4 \pm 20.2 \mu\text{g/g}$ for the 'Golden Delicious' and $74.1 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$ for the 'Idared' varieties, while in the Czech Republic it was 34.2 ± 14.0 , respectively $44.3 \pm 21.3 \mu\text{g/g}$. In contrast, Czech apples contained more epicatechin and quercitrin in these varieties.

Keywords: *Malus domestica*, polyphenols, liquid chromatography

ÚVOD

Jablka (*Malus domestica*) patří mezi nejoblíbenější ovoce konzumované po celém světě. Jsou také bohatým zdrojem cenných chemických složek, např. polyfenolů, pektinu a vlákniny v lidské stravě. Bioaktivní sloučeniny, jako jsou polyfenoly, reprezentují přirozeně produkované látky rostlinou nebo jsou indukovány fyzikálním či chemickým stresem. Oblast výzkumu a výroby potravin se kontinuálně soustředí na polyfenolické sloučeniny kvůli jejich potvrzeným antioxidačním vlastnostem. Hrají roli v prevenci různých patologických projevů spojených s oxidativním stresem jako je rakovina plic, trávicího traktu a prsu. Jejich příjem v potravě je rovněž dáván do souvislosti se snížením výskytu kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění.

Polyfenoly představují jednu z nejvýznamnějších skupin látek s antioxidační kapacitou v lidské stravě. Vyskytující se ve většině plodů klimakterického typu, u kterých ovlivňují chuť, barvu a nutriční vlastnosti ovoce (Xi *et al.* 2016). Polyfenoly tvoří hlavní podíl látek s antioxidačními účinky v plodech jabloní (Tsao *et al.* 2005). Proto jsou jablka jedním z nejdůležitějších ovocných zdrojů polyfenolických sloučenin ve stravě, neboť jsou často konzumována a dostupná po celý rok. V České republice jsou velice oblíbeným druhem ovoce s roční spotřebou 24 kg na osobu.

Polyfenoly představují skupinu sekundárních metabolitů s aromatickým kruhem nesoucím jednu nebo více hydroxylových skupin (Han *et al.* 2007). Velký počet konjugovaných dvojných vazeb a hydroxylových skupin je zodpovědný za jejich antioxidační aktivitu (Lee *et al.* 2003). V jablkách se nachází pět hlavních skupin polyfenolických sloučenin, a to flavanoly (katechin, epikatechin a prokyanidiny), fenolové kyseliny (hlavně kyselina chlorogenová), dihydrochalkony (glykosidy floretinu), flavonoly (glykosidy kvercetinu) a antokyany (kyanidin) (Wojdyło *et al.* 2008). Autoři dokazují (Burda *et al.* 1990, Khanizadeh *et al.* 2009), že polyfenolický profil a obsahy vybraných polyfenolických látek, stejně jako jejich antioxidační kapacita v plodech jabloní, jsou ovlivněny různými faktory jako je kultivar, doba sklizně, geografická poloha, klimatické podmínky a podmínky skladování a zpracování.

Dle studie Rektorisové *et al.* (2021), která byla zaměřena na analýzu zastoupení fenolických látek z povrchové vrstvy jablek pro autentikaci geografického původu vyplývá, že celkové zastoupení fenolických látek v této části plodů není efektivní pro zhodnocení geografického původu, nicméně může být využito pro hodnocení jejich biologické hodnoty díky jejich antioxidační aktivitě.

Cílem naší práce bylo stanovení a porovnání obsahů konkrétních polyfenolických sloučenin (kyselina chlorogenová, floridzin, epikatechin, rutin a kvercitrin) v celých plodech (dužnina + slupka) vybraných odrůd jabloní pocházejících z různých regionů České republiky a Polska. Cílem bylo také ověřit odrůdovou závislost v obsahu polyfenolických sloučenin v plodech jabloní.

MATERIÁL A METODY**Analyzované vzorky**

Pro stanovení obsahu polyfenolických sloučenin bylo vybráno 15 vzorků jablek z České republiky a 29 vzorků z Polska. Vzorky jablek byly sklizeny v roce 2022. Přehled analyzovaných vzorků je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled analyzovaných vzorků jablek
Table 1. Overview of analyzed samples of apples

Kód vzorku ¹⁾	Odrůda ²⁾	Země původu ³⁾	Region ⁴⁾
CH 1/22	Golden Delicious	ČR	Královéhradecký kraj
CH 2/22	Idared	ČR	Královéhradecký kraj
CH 3/22	Golden Delicious	ČR	Středočeský kraj
CH 4/22	Golden Delicious	ČR	Středočeský kraj
CH 5/22	Jonagold	ČR	Královéhradecký kraj
CH 176/22	Braeburn	ČR	Královéhradecký kraj
CH 177/22	Šampion	ČR	Královéhradecký kraj
CH 178/22	Golden Delicious	ČR	Královéhradecký kraj
CH 179/22	Topaz	ČR	Královéhradecký kraj
CH 180/22	Idared	ČR	Královéhradecký kraj
CH 181/22	Braeburn	ČR	Královéhradecký kraj
CH 182/22	Gala	ČR	Královéhradecký kraj
CH 183/22	Jonagold	ČR	Královéhradecký kraj
CH 184/22	Golden Delicious	ČR	Královéhradecký kraj
CH 185/22	Idared	ČR	Královéhradecký kraj
CH 186/22	Jonagold	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 187/22	Idared	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 188/22	Gala	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 189/22	Braeburn	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 190/22	Golden Delicious	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 191/22	Idared	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 192/22	Gala	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 193/22	Golden Delicious	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 194/22	Braeburn	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 195/22	Jonagold	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 236/22	Jonagold	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 237/22	Golden Delicious	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 238/22	Red Delicious	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 239/22	Šampion	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 240/22	Mutsu	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 241/22	Gala	Polsko	Dolnoslezské vojvodství
CH 242/22	Red Delicious	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 243/22	Gala	Polsko	Lodžské vojvodství

Kód vzorku ¹⁾	Odrůda ²⁾	Země původu ³⁾	Region ⁴⁾
CH 244/22	Jonagold	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 245/22	Honeycrunch	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 246/22	Jonagold (Pagacz)	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 247/22	Gala	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 248/22	Jonagold	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 249/22	Šampion	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 250/22	Red Delicious	Polsko	Lodžské vojvodství
CH 251/22	Gala	Polsko	Mazovské vojvodství
CH 252/22	Idared	Polsko	Mazovské vojvodství
CH 253/22	Jonagold	Polsko	Mazovské vojvodství
CH 254/22	Red Delicious	Polsko	Mazovské vojvodství

1) Sample code, 2) Variety, 3) Country of origin, 4) Region

Příprava vzorku

K přípravě jednoho analyzovaného vzorku bylo použito 3–5 plodů jablek. Ty byly před vlastní chemickou analýzou homogenizovány v nožovém mlýnu Grindomix GM200 (Retsch) a skladovány při -20 °C až do doby chemické analýzy. Extrakty byly připraveny navážením 3 g homogenátu a přidáním 15 ml 0,1% roztoku kyseliny octové v methanolu. Následovala extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 10 min a centrifugace při 9 500 ot/min po dobu 5 minut. Poté byl supernatant přefiltrován přes PTFE filtr s velikostí porů 0,22 µm.

HPLC analýza polyfenolických látek

Obsahy vybraných polyfenolických látek byly analyzovány chromatografickým systémem Agilent 1260 Infinity s detektorem diodového pole s využitím gradientové eluce popsané v předcházející publikaci (Bílková *et al.* 2018). Použité podmínky separace byly: Chromatografická kolona Kinetex Omega Polar C18 (150 × 4,6 mm; 5 µm) s předkolonou Ascentis Express C18 (50 × 4,6 mm; 5 µm) temperovaná na teplotu 30 °C. Mobilní fáze A: ultračistá voda upravená na pH 2,8 kyselinou octovou, mobilní fáze B: acetonitril. Podmínky gradientové eluce byly: 0–2,5 min – 95 % A: 5 % B; 2,5–12 min – 85 % A: 15 % B; 12–15 min – 50 % A: 50 % B; 15–18 min – 95 % A: 5 % B. Průtoková rychlost 1 mL/min a nástřikový objem vzorku 10 µL. Vlnová délka spektrofotometrické detekce: 255 nm pro rutin a kvercitrin, na 280 nm pro epikatechin a floridzin a 320 nm pro kyselinu chlorogenovou. Toto nastavení umožnilo současné monitorování všech sledovaných polyfenolických látek. Identifikace píků byla provedena pomocí retenčních časů a absorpčních spekter standardů. Pro obsahy polyfenolických sloučenin byly hodnoceny plochy pod píky. Kvantifikace byla provedena pomocí šestibodové kalibrační křivky s použitím externích standardů. Limit kvantifikace (LOQ) byl stanoven pro všechny analyty na 5 µg/g.

Statistické zpracování dat

Naměřená data byla hodnocena podle země původu a odrůdy. Při hodnocení vlivu země původu na obsah polyfenolů byly porovnány odrůdy 'Idared' a 'Golden Delicious' samostatně. Z každé oblasti byly analyzovány 4 vzorky plodů pro každou odrůdu. Pro stanovení vlivu

odrůdy na obsah fenolických látek byly do statistické analýzy zahrnuty odrůdy 'Braeburn', 'Gala', 'Jonagold', 'Red Delicious' a 'Šampion', každá s počtem 6 vzorků. Před provedením statistického zpracování dat byla provedena kontrola jejich kvality v souvislosti s podmínkami pro použití parametrického testu ANOVA. Pro tento účel byla uskutečněna kontrola normálního rozdělení dat pomocí Kolmogorov-Smirnova testu a homogenity variance pomocí Bartlettova testu. Při porovnávání plodů v závislosti na pěstitelské oblasti z hlediska obsahu jednotlivých polyfenolů byl zjištěn homogenní rozptyl a data byla normálně rozdělena. Pro porovnání rozdílů mezi hodnocenými oblastmi byl použit test analýzy variance (ANOVA). Pro porovnání rozdílů mezi odrůdami byl test ANOVA použit pouze pro zpracování obsahu floridzinu a kyseliny chlorogenové. Naproti tomu hodnoty obsahu epikatechinu v plodech jabloní nebyly normálně rozděleny. V tomto případě byla data analyzována neparametrickými postupy pomocí Wilcoxonova Mann-Whitneyho testu. Důvodem změny povahy dat je pravděpodobně jiný faktor ovlivňující hodnotu obsahu epikatechinu v plodech jabloní jehož studium by přesáhlo rozsah této studie. Pro statistické porovnání mezi jednotlivými odrůdami byl následně použit Tukeyho HSD test. Výsledky testů byly považovány za signifikantní při poklesu hodnoty $p < 0,05$. Výsledky byly statisticky zpracovány v programu „R“ (R Core Team 2023). Výsledky obsahu polyfenolů jsou vyjádřeny v $\mu\text{g/g}$ čerstvého ovoce a chybové úsečky v grafech znázorňují směrodatnou odchylku všech naměřených dat pro dané odrůdy.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Tabulka 2 dokládá, že obsah epikatechinu se u hodnocených odrůd pohyboval v rozmezí 13,71–65,54 $\mu\text{g/g}$. Nejvyšší obsah této látky byl pozorován v plodech odrůdy 'Šampion' a nejnižší u odrůdy 'Jonagold'. Obsah floridzinu byl u jablek v rozsahu 18,22–23,82 $\mu\text{g/g}$ a kyseliny chlorogenové v rozsahu 28,48–35,23 $\mu\text{g/g}$. U obou těchto polyfenolických sloučenin byl jejich obsah v porovnávaných odrůdách přibližně stejný.

Tabulka 2. Obsah epikatechinu, floridzinu a kyseliny chlorogenové v $\mu\text{g/g}$ v jablkách v závislosti na hodnocené odrůdě

Table 2. Contents of epicatechine, phloridzine, and chlorogenic acid in apples with respect to specific cultivar

Odrůda ¹⁾	Epikatechin ²⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Floridzin ³⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Kyselina chlorogenová ⁴⁾ ($\mu\text{g/g}$)
Braeburn	23,62 ab	23,56 a	28,48 a
Gala	21,32 ab	18,22 a	34,04 a
Jonagold	13,71 b	20,70 a	34,04 a
Red Delicious	33,95 ab	23,82 a	35,23 a
Šampion	65,54 a	23,33 a	29,06 a

1) Variety, 2) Epicatechin, 3) Phloridzin, 4) Chlorogenic acid, * data analyzed by Wilcoxon Mann-Whitney test

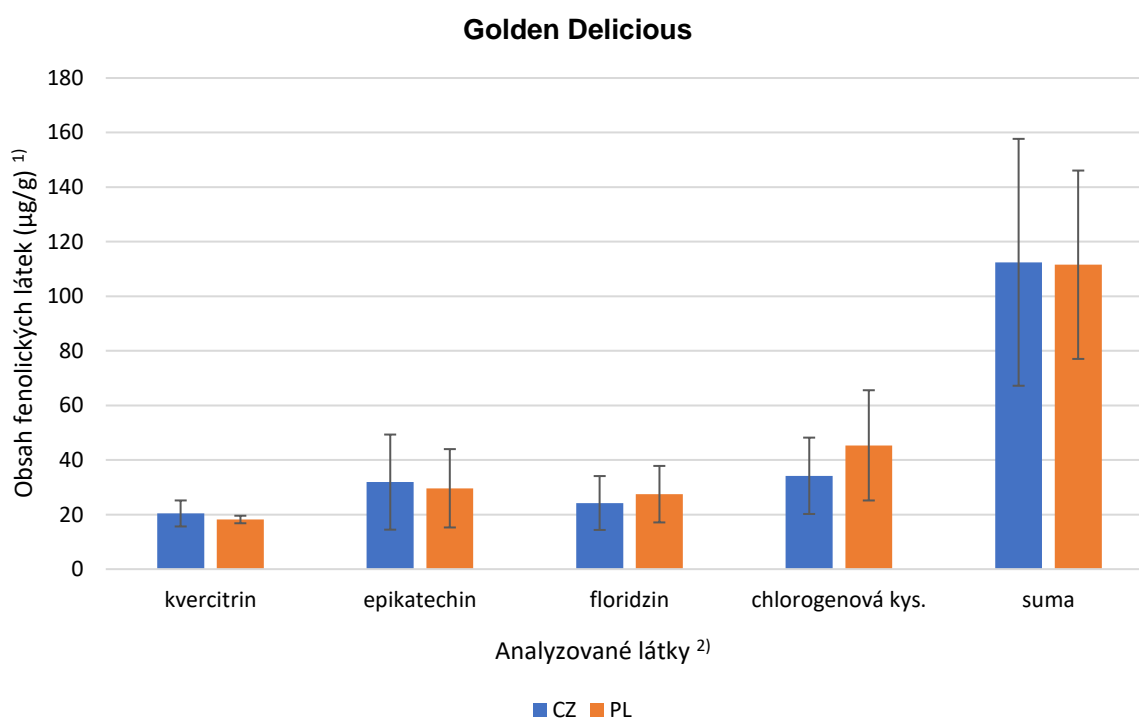
Statisticky významný rozdíl mezi odrůdami v obsahu jednotlivých fenolických látek ($p < 0,05$) je vyznačen rozdílnými písmeny.

Statistical difference among the cultivars in particular phenolic compounds ($p < 0.05$) was described by different letters.

Nejvyšší hodnoty obsahů z hodnocených polyfenolických sloučenin byly u odrůd 'Golden Delicious' a 'Idared' nalezeny pro epikatechin a kyselinu chlorogenovou (Graf 1 a 2). Průměrný obsah první látky byl u odrůdy 'Golden Delicious' z regionů ČR $31,9 \pm 17,4 \mu\text{g/g}$, zatímco u stejné odrůdy z regionů z Polska byl $9,6 \pm 14,4 \mu\text{g/g}$ (Graf 1). Tyto hodnoty lze však obecně považovat za nízké. Autoři Wojdyło *et al.* (2008) u stejné odrůdy původem z Polska naměřili vyšší obsahy epikatechinu $167,8 \pm 1,9 \mu\text{g/g}$. Je zajímavé, že Morresi *et al.* (2018) u této odrůdy původem z Itálie našli výrazně nižší obsah epikatechinu, a to pouhých $6 \mu\text{g/g}$. Obsah těchto látek tedy může v plodech jabloní výrazně kolísat. V odrůdě 'Golden Delicious' pocházejících z regionů ČR byl obsah kyseliny chlorogenové $34,2 \pm 14,0$. U jablek z Polska byly hodnoty podobné $45,4 \pm 20,2 \mu\text{g/g}$. V jiné práci byla kyselina chlorogenová majoritním polyfenolem jablečné dužniny a její obsah $54 \mu\text{g/g}$ představoval zhruba 49 % z celkového obsahu polyfenolů. (Xi *et al.* 2016). Celkově byla suma polyfenolických látek, která je součtem průměrů obsahů jednotlivých stanovovaných látek kvercitrinu, epikatechinu, floridzinu a chlorogenové kyseliny srovnatelná pro česká jablka $112,5 \pm 45,2 \mu\text{g/g}$ a jablka polská $111,6 \pm 34,5 \mu\text{g/g}$.

Graf 1. Obsahy polyfenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Golden Delicious' pocházejících z České republiky a Polska

Graph 1. Contents of polyphenolic substances in apples of variety 'Golden Delicious' originating from the Czech Republic and Poland



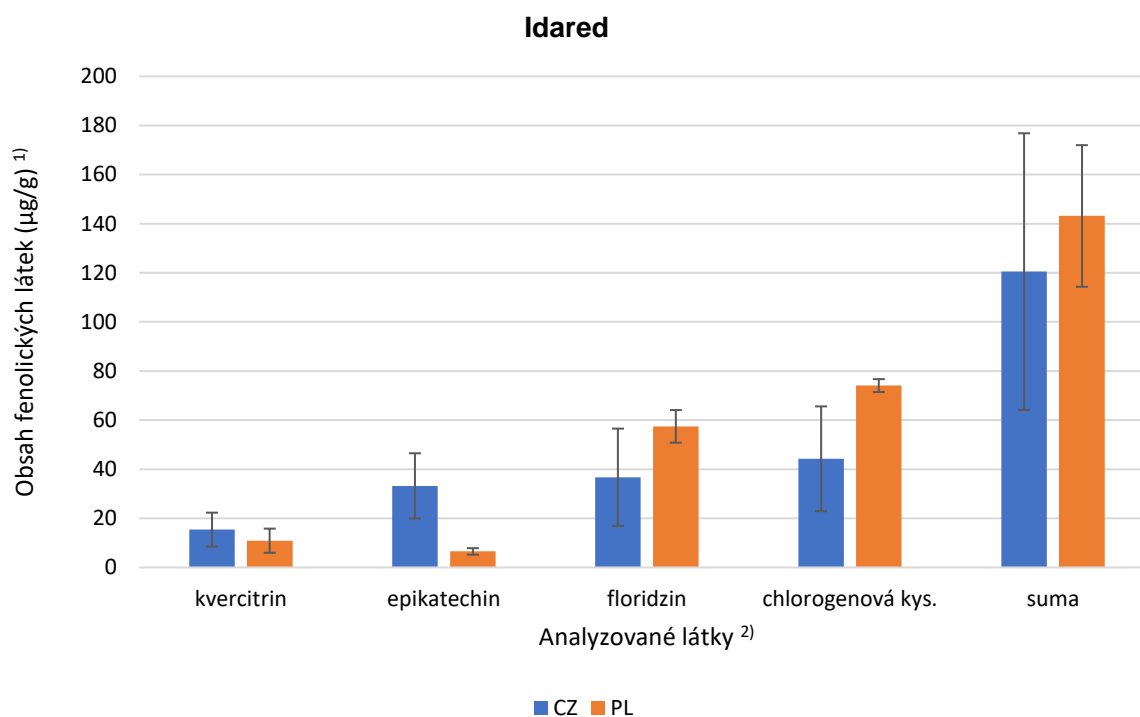
1) Content of phenolic compounds, 2) Analyzed compounds

Při porovnávání výsledků u druhé testované odrůdy 'Idared' byly hodnoty stanovovaných polyfenolických látek u jablek z ČR a Polska porovnatelné s výjimkou obsahu epikatechinu a kyseliny chlorogenové (Graf 2). U českých jablek byla zjištěna tendence k vyššímu obsahu

epikatechinu. Naopak Polská jablka měla tendenci k vyššímu obsahu kyseliny chlorogenové. Obsah všech polyfenolických látek vyjádřených jako suma průměrů byl u polských jablek odrůdy 'Idared' pouze nepatrně vyšší.

Graf 2. Obsahy polyfenolických látek ve vzorcích odrůdy 'Idared' pocházejících z České republiky a Polska

Graph 2. Contents of polyphenolic substances in apples of variety 'Idared' originating from the Czech Republic and Poland



1) Content of phenolic compounds, 2) Analyzed compounds

Vedle odrůdové odlišnosti je z našich výsledků patrný i vliv podmínek prostředí v rámci různých oblastí pěstování. Nicméně pro potvrzení těchto výsledků bude nezbytné provést další měření.

ZÁVĚR

Pravidelný příjem prospěšných polyfenolických látek ve stravě má mnohé zdravotní benefity pro lidské zdraví. Polyfenoly obsažené v potravinách úzce souvisí s antioxidační aktivitou. Poměrně vysoká variabilita a pouze nepatrná odlišnost v obsahu jednotlivých polyfenolů kvercitrin, epikatechin, floridzin a kyselinu chlorogenovou, i jejich celkového množství v plodech jabloní ukazuje na jejich špatnou využitelnost pro geografickou rozlišitelnost země/oblasti původu ovoce. Vedle odrůdové závislosti je pravděpodobným prvkem variability právě lokální průběh počasí a klimatické podmínky oblasti, jejichž vliv nebyl tématem naší práce.

PODĚKOVÁNÍ

Článek vznikl za podpory projektu RO1523 a NAZV QK1910104.

LITERATURA

- BÍLKOVÁ, A., R. VÁVRA, M. HOLLÁ, H. SKLENÁŘOVÁ, P. CHOCHOLOUŠ, R. DVOŘÁKOVÁ, A. HORNA a E. EICHLEROVÁ. *Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování*. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO, 2018. ISBN 978-80-87030-68-4.
- BURDA, S., W. OLESZEK a C.Y. LEE. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990, 38: 945–948. DOI: 10.1021/jf00094a006.
- HAN, X., T. SHEN a H. LOU. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2007, 8(9): 950–988 [cit. 2023-01-04]. DOI: 10.3390/i8090950.
- KHANIZADEH, S., L. DING, R. TSAO, D. REKIKI, R. YANG, M.T. CHARLES a H.P.V. RUPASINGHE. Phytochemical profile of selected processing apple genotypes. *Acta Horticulturae* [online]. 2009, (814): 545–550 [cit. 2023-01-04]. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.814.92.
- LEE, K.W., Y.J. KIM, D. KIM, H.J. LEE a Ch.Y. LEE. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, 51(22): 6516–6520 [cit. 2023-01-04]. DOI: 10.1021/jf034475w.
- MORRESI, C., L. CIANFRUGLIA, T. ARMENI, F. MANCINI, G.C. TENORE, E. D'URSO, A. MICHELETTI, G. FERRETTI a T. BACCETTI. Polyphenolic compounds and nutraceutical properties of old and new apple cultivars. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2018, 42(6): e12641 [cit. 2023-02-15]. DOI: 10.1111/jfbc.12641.
- REKTORISOVÁ, M., J. HAJŠLOVÁ, V. KOCOUREK, J. SEDLÁK, P. VACKOVÁ, K. NAVRÁTILOVÁ, K. HŮRKOVÁ a V. HRBEK. Využití analýzy metabolomických profilů fenolických látek jablek pro jejich autentikaci. *Vědecké práce ovocnářské* [online]. 2021, 27(2): 25–37 [cit. 2023-03-10]. ISSN: 2695-1347.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing [software]. [přístup 15. 3. 2023]. Dostupné z: <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>. TSAO, R., R. YANG, S. XIE, E. SOCKOVIE a S. KHANIZADEH. Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(12): 4989–4995 [cit. 2023-01-04]. DOI: 10.1021/jf048289h.
- WOJDYŁO, A., J. OSZMIĄSKI a P. LASKOWSKI. Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, 56(15): 6520–6530 [cit. 2023-01-04]. DOI: 10.1021/jf800510j.
- XI, Y., D. CHENG, X. ZENG, J. CAO, a W. JIANG. Evidences for chlorogenic acid — a major endogenous polyphenol involved in regulation of ripening and senescence of apple fruit. *PLOS ONE*. 2016, 11(1): e0146940. DOI: 10.1371/journal.pone.0146940.