

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Mindaugas Liaudanskas

**NAMINIŲ OBELŲ (*MALUS DOMESTICA*
BORKH.) VAISIŲ IR LAPŲ FENOLINIŲ
JUNGINIŲ SUDĖTIES TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
farmacija (08B)

Kaunas, 2015

Disertacija rengta 2011–2015 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijoje.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Valdimaras Janulis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas

prof. dr. Sonata Trumbeckaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Nariai:

prof. dr. Daiva Leskauskaitė (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05T)

prof. dr. Kristina Ramanauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

prof. dr. Malgorzata Sznitowska (Gdanskio universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

prof. dr. Mirosława Krauze-Baranowska (Gdanskio universitetas, biomedicinos mokslai, farmacija – 08B)

Disertacija bus ginama viešame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. rugsėjo 4 d. 10 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto posėdžių salėje.

Adresas: Sukilėlių pr. 17, Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Mindaugas Liaudanskas

**ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS
COMPOSITION IN FRUITS AND LEAVES
OF APPLES (*MALUS DOMESTICA* BORKH.)**

Doctoral Dissertation
Biomedical Sciences,
Pharmacy (08B)

Kaunas, 2015

Dissertation was prepared at the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2011–2015.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Habil. Valdimaras Janulis (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Members

Prof. Dr. Daiva Leskauskaitė (Kaunas University of Technology, Technology Sciences, Chemical Engineering – 05T)

Prof. Dr. Kristina Ramanauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Prof. Dr. Malgorzata Sznitowska (University of Gdansk, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Prof. Dr. Mirosława Krauze-Baranowska (University of Gdansk, Biomedical Sciences, Pharmacy – 08B)

Dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on the 4th of September, 2015 at the Conference Hall of Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 17, Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1. <i>Malus</i> genties augalų taksonominė įvairovė, paplitimas ir morfologija.....	12
1.2. <i>M. domestica</i> Borkh. vaisių ir lapų cheminės sudėties tyrimai	13
1.2.1. Obuolių flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai	13
1.2.2. Obuolių luobelių ir minkštųjų flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai	15
1.2.3. Obelių lapų flavonoidų ir fenolinių rūgščių fitocheminės sudėties tyrimai.....	18
1.3. Obuolių ir obelių lapų ekstraktų biologinis poveikis	19
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI	23
2.1. Tyrimo objektas	23
2.2. Tyrimo metodai	24
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	28
3.1. ESC metodikos <i>M. domestica</i> Borkh. vaisių ir lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimui vystymas	28
3.1.1. Obuolių ir obelių lapų flavonoidų ekstrakcijos sąlygų optimizavimas	28
3.1.2. ESC metodikos obuolių ir obelių lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimui optimizavimas ir validavimas.....	31
3.2. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties Lietuvoje auginamų veislių obuoliuose ir obelių lapuose įvairavimas	35
3.2.1. Obuolių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai.....	35
3.2.2. Obuolių veislių luobelių ir minkštųjų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas	40
3.2.2.1. Obuolių luobelių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai	40
3.2.2.2. Obuolių minkštųjų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai	44
3.2.3. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas obelių lapų ėminiuose	47
3.2.4. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas skirtingų poskiepių obuolių ėminiuose	49

3.3. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas <i>M. domestica</i> Borkh. vaisiuose ir lapuose vegetacijos periodo metu	50
3.3.1. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obuoliuose vegetacijos periodo metu	50
3.3.2. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapuose vegetacijos periodo metu	55
3.4. Obuolių ėminių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai	59
IŠVADOS.....	65
LITERATŪRA	67
DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	75
PRIEDAI	77
SUMMARY.....	126
CURRICULUM VITAE.....	137

SANTRUMPOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis) (angl. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))
AKF	Angiotenziną konvertuojantis fermentas
AR	Aptikimo riba
AV	Absorbcijos vienetai
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas (angl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DNR	Deoksiribonukleorūgštis
ESC	Efektvyioji skysčių chromatografija
FRAP	Geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)
GRE	Galo rūgšties ekvivalentai
IAA	Indėlis į antioksidacinį aktyvumą
LAMMC	Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras
NADH	Nikotinamido adenino dinukleotidas, redukuota forma
NF-κB	Branduolio transkripcijos faktorius
PVDF	Polivinilidenfluoridas
RE	Rutino ekvivalentai
RNR	Ribonukleino rūgštis
TE	Troloksio ekvivalentai
TNF-α	Navikų nekrozės faktorius α
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazinas

IVADAS

Pastaraisiais metais biomedicinos specialistų dėmesys skiriamas augalų, augalinių žaliavų cheminės įvairovės tyrimams. Tyrimų rezultatai yra svarbūs vykdant naujų augalinių žaliavų paieškas, kuriant vaistinius preparatus, augalinės kilmės maisto papildus, nustatant biologiškai aktyvius junginius maisto produktuose. Tai sudaro galimybę maisto produktus su žinoma chemine sudėtimi naudoti sveikatinimo tikslams.

Biologiškai aktyvūs junginiai augalinėse žaliavose bei iš jų pagamintuose preparatuose lemia įvairiapusių biologinį poveikį. Pasaulyje ypač didelis dėmesys skiriamas maisto produktų cheminės sudėties tyrimams. Maisto produktai, be pagrindinės funkcijos – aprūpinti organizmą reikiamomis maistinėmis ir energinėmis medžiagomis, gali būti naudojami lėtinių susirgimų rizikos mažinimui [63, 118]. Gyventojų mityboje obuoliai yra svarbus biologiškai aktyvių junginių šaltinis. Juose gausu fenolinių junginių, organinių rūgščių, vitaminų, makro- ir mikroelementų, skaidulinių medžiagų [139].

Vieni svarbiausių obuolių biologiškai aktyvių junginių yra fenoliniai junginiai, kurie priskiriami natūraliems antioksidantams. Oksidacinis stresas sukelia ląstelės metabolizmo pokyčius, susijusius su DNR ir baltymų pažeidimu, lipidų peroksidacija [29, 103]. Jis gali sukelti uždegiminius procesus, širdies, kraujagyslių ir kitas ligas [76, 111]. Fenoliniai junginiai neutralizuoja reaktyvias deguonies ir azoto formas [94], todėl yra vertingi daugelio ligų profilaktikai ir gydymui. Fenolinius junginius kaupiančių augalinių žaliavų kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai yra svarbūs ir aktualūs.

Obuoliai yra vieni labiausiai vartojamų vaisių Lietuvoje ir pasaulyje. 2013 m. duomenimis pasaulyje išauginta 80,82 milijonų tonų obuolių, Lietuvoje – apie 62,4 tūkstančių tonų obuolių. Daugiausiai obuolių užauginama Kinijoje, JAV, Turkijoje [37]. Obuoliai plačiai naudojami maisto pramonėje įvairių produktų ir gėrimų gamyboje.

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad obelų lapus galima naudoti obuolių sultims praturtinti kvercetino glikozidais ir floridzinu [62]. Obelų lapuose nustatytas dihidrochalkonų grupės junginys floridzinas pasižymi antidiabetiniu poveikiu [50, 93]. Obelų lapų flavonoidų kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimų duomenys pagrįstą galimybę panaudoti Lietuvoje auginamų veislių obelų lapus biologiniu poveikiu pasižymintiems junginiams išskirti ir maisto papildams su obelų lapų ekstraktais gaminti.

Daugelio pasaulio mokslininkų tyrimų rezultatai įrodo, kad obelų vaisiuose ir lapuose kaupiami fenoliniai junginiai lemia plataus spektro biologinį poveikį [5, 21, 94]. Aktualu vykdyti naminių obelų (*Malus domestica*

Borkh.) vaisių ir lapų fitocheminės sudėties tyrimus, nustatyti biologiškai aktyvių junginių kaupimosi dėsninumus, identifikuoti Lietuvos klimato sąlygomis auginamas obelų veisles, kurių vaisiuose ir lapuose sukaupiami didžiausi fenolinių junginių – natūralių antioksidantų kiekiai.

Darbo tikslas – ištirti naminių obelų (*Malus domestica* Borkh.) vaisių ir lapų flavonoidų, fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimą ir nustatyti obuolių ėminių ekstraktų antioksidacinį poveikį *in vitro*.

Uždaviniai:

1. Išvystyti ir optimizuoti efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodiką flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties nustatymui obuolių ir obelų lapų ėminiuose.
2. Ištirti Lietuvoje auginamų veislių obuolių ir obelų lapų flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimą.
3. Įvertinti fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimą obuolių luobelų ir minkštųjų ėminiuose.
4. Nustatyti obuolių ir obelų lapų flavonoidų ir fenolinių rūgščių kiekinės sudėties įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu.
5. Įvertinti obelų poskiepių įtaką obuolių fenolinių junginių kokybinei ir kiekiniai sudėčiai.
6. Ištirti obelų veislių obuolių ėminių flavonoidų ir fenolinių rūgščių antioksidacinį aktyvumą *in vitro*.

Mokslinio darbo naujumas. Atlikti Lietuvoje auginamų 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' ir 'Rajka' veislių obuolių ir obelų lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai. Pirmą kartą ištirtas dviejų Lietuvos Respublikoje sukurtų obelų veislių – 'Aldas' ir 'Auksis' vaisių ir lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas.

Tyrimų metu nustatyta, kad 'Aldas' veislės obuoliai išsiskiria dideliu fenolinių junginių kiekiu. Šios veislės obuolių ir obelų lapų ėminiuose nustatytas didžiausias suminis fenolinių junginių kiekis.

Flavonoidų ir fenolinių rūgščių kiekinės sudėties kitimo dinamikos nustatymas obuolių ir obelų lapų ėminiuose augalo vegetacijos periodo metu pateikė naujų žinių apie Lietuvoje auginamų obelų vaisiuose ir lapuose vykstančių fenolinių junginių biosintezės ir kaupimosi procesų dėsninumus, leido įvertinti fenologinių tarpsnių įtaką obuolių ir obelų lapų kiekinės sudėties įvairavimui.

Atlikti nykštukinių, žemaūgių ir pusiaūžemaūgių obelų poskiepių itakos obuolių fenolinių junginių kokybinei ir kiekiniai sudėčiai tyrimai. Nustatyta, kad didžiausi fenolinių junginių kiekiai sukaupiami nykštukinių poskiepių P 61 ir P 22 obuolių ėminiuose.

Pirmą kartą atlikti obuolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai, taikant ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėlinius metodus. Nustatyta, kad tarp identifikuotų junginių stipriausią antioksidacinį aktyvumą tirtų veislių obuolių ekstraktuose lėmė chlorogeno rūgštis, procianidinas B2 ir (–)-epikatechinas.

Praktinė ir teorinė reikšmė. Išvystyta, optimizuota ir validuota ESC metodika flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybiniam ir kiekiniam nustatymui Lietuvoje auginamų įvairių veislių obuolių ir lapų ėminiuose. Gauti tyrimų rezultatai praturtino mokslines žinias apie Lietuvoje auginamų veislių obelų vaisių ir lapų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį. 'Aldas' ir 'Auksis' obelų veislės yra įtrauktos į Augalų nacionalinių genetinių išteklių sąrašą [18]. Šių veislių obuolių ir obelų lapų tyrimai nebuvo atlikti. Mokslinių tyrimų duomenys vertingi vykdant obelų veislių atranką, suteikia galimybę pateikti vartotojui aukštos kokybės, žinomos fenolinių junginių sudėties produktus. Didžiausias identifikuotų fenolinių junginių kiekis sukaupiamas 'Aldas' veislės obuoliuose, todėl 'Aldas' veislės obelys yra perspektyvios auginimui Lietuvos soduose. Remiantis mūsų mokslinių tyrimų rezultatais parengtos ir LAMMC pateiktos tvirtinti rekomendacijos apie obuolių cheminės sudėties įvairavimą.

Ištyrus obelų lapų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį, nustatyta, kad obelų lapų ėminiuose sukaupiami didesni flavonoidų (rutino, izokvercitrino, hiperozido, avikuliarino, kvercitrino, floridzino) kiekiai nei obuolių ėminiuose. Atlikus išsamius obelų lapų fenolinių junginių poveikio tyrimus, ši augalinė žaliava gali būti vertinga papildant maisto produktus biologiškai aktyviais junginiais.

Atlikome obelų poskiepių įtakos fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimui obuoliuose tyrimus. Tyrimų metu nustatyta, kad nykštukiniai obelų poskiepai P 61 ir P 22 turi įtakos didžiausiam fenolinių junginių kiekio susikaupimui obuolių ėminiuose. Į šiuos poskiepius įskiepytos obelys galėtų būti dažniau auginamos Lietuvos soduose.

Ištyrus obuolių ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą ESC-pokolonėliniu metodu, nustatyti fenoliniai junginiai, kurie pasižymi stipriu antioksidaciniu poveikiu *in vitro*. Chlorogeno rūgštis, procianidinas B2 ir (–)-epikatechinas yra analitiniai žymenys obuolių, iš jų pagamintų produktų bei preparatų antioksidacinio aktyvumo vertinimui. Tyrimų metu gauti rezultatai yra vertingi prognozuojant obuolių ekstraktų bei juose identifikuotų fenolinių junginių antioksidacinį poveikį *in vivo*.

Darbo rezultatų aprobavimas. Tyrimų rezultatai pristatyti 7 mokslinėse konferencijose: 7th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2012 „Inovative and Healthy Food for Consumers“ (2012 m.

gegužės 17–18 d., Kaunas); Orchard Systems 2012 – Xth International Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems (2012 m. gruodžio 3–6 d., Stelenbosas, Pietų Afrika); Šeštoji nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ (2013 m. balandžio 5 d., Kaunas); 7th International Scientific Conference „The Vital Nature Sign“ (2013 m. gegužės 18 d., Kaunas); „International Symposium on Bioactive Compounds in Cereal Grains and Foods“ (2014 m. balandžio 24–25 d., Viena, Austrija); The 4th international conference on pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to the 75th anniversary of Lithuanian Pharmacopoeia (2013 m. lapkričio 23 d., Kaunas); 9th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2014 „Inovative and Healthy Food for Consumers“ (2014 m. gegužės 8–9 d., Jelgava, Latvija); Young Scientists Meeting „Trends in Natural Products Research“ (2014 m. birželio 23–25 d., Olomoucas, Čekijos Respublika).

Tyrimų tematika paskelbtos 5 mokslinės publikacijos.

Darbo apimtis ir struktūra: disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objektas ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas (143 šaltiniai), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, mokslinių publikacijų disertacijos tema kopijos, santrauka, gyvenimo, mokslinės ir kūrybinės veiklos aprašymas. Darbe pateikta 10 lentelių, 22 paveikslai. Disertacijos apimtis 137 puslapiai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Malus* genties augalų taksonominė įvairovė, paplitimas ir morfologija

Obels (*Malus* Mill.) gentis priklauso erškėtinių (*Rosaceae* Juss.) šeimai. Mokslinių tyrimų duomenys apie šiai genčiai priskiriamų rūšių skaičių yra skirtingi. Likhonos išskiria tik 8 *Malus* genties rūšis [71], Phipps ir kt. – 55 rūšis [101], o Ponomarenko – net 86 rūšis [105]. „Lietuvos TSR floroje“ aprašytos 25 *Malus* genties rūšys [122]. Rūšių skaičius skiriasi dėl taksonų grupavimo įvairovės ir hibridų priskyrimo atskiroms *Malus* genties rūšims [112].

Malus genties augalų arealas apima Vidurio, Rytų ir Pietų Europą, Centrinę Aziją, Šiaurės Ameriką [55]. Lietuvoje savaime auga viena genties rūšis – miškinė obelis (*M. sylvestris* Mill.). Ji paplitusi visoje Lietuvos Respublikos teritorijoje, auga pavieniui ar po kelis medžius mišriuose ar lapuočių miškuose, pamiškėse, laukuose [122].

Naminės obels (*M. domestica* Borkh.) kilmė tiksliai nėra išsiaiškinta, šiuo klausimu tarp mokslininkų tebevyksta diskusija. Taksonomiškai jai artimiausios rūšys yra azijinė obelis (*M. asiatica* Nakai), uoginė obelis (*M. baccata* (L.) Borkh.), vyšniavaisė obelis (*M. micromalus* Makino), slyvalapė obelis (*M. prunifolia* (Willd.) Borkh.), raudonoji obelis (*M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem.), miškinė obelis (*M. sylvestris* Mill.) [112]. Anksčiau buvo teigiama, kad naminė obelis kilusi iš miškinės obels, tačiau pastaraisiais metais atlikti genomo tyrimai parodė, kad naminė obelis išsivystė iš Centrinėje Azijoje natūraliai augančios raudonosios obels [51, 86, 134]. Miškinė obelis taksonomiškai artima kultūrinėms obelims, tačiau, manoma, kad jos įtaka naminės obels evoliucijai yra nedidelė. Jų genomo panašumai gali būti paaiškinami kaip vėlesnės tarprūšinės hibridizacijos ir kryžminimo rezultatai [28, 135].

Naminė obelis yra 3–10 metrų aukščio lapuotis medis. Dažniausiai auginama vidutinių platumų klimatinėje zonoje. Lapai pražanginiai, kotuoti, su nukrintančiais prielapiais, paprasti, ištisiniai arba skiautėti, dažniausiai kiaušiniški arba elipsiški, smailia viršūne, 5–10 cm ilgio ir 2–5 cm pločio. Žiedai dvilyčiai, kvapnūs, susitelkę skėtiškuose žiedynuose, vainiklapiai baltos arba rožinės spalvos, tamsėjantys į išorę, 3–5 cm skersmens.

Augalas žydi balandžio–gegužės mėnesiais. Vaisius – obuolys, turintis po 2–3 rudas sėklas. Vaisiaus luobelė labai plona, minkštimas sultingas. Obuoliai prinoksta liepos–spalio mėnesiais. Nokimo laikas priklauso nuo obels veislės. Prinokę obuoliai būna raudoni, geltoni, žalsvi ar įvairiaspal-

viai, įvairaus dydžio [72, 90, 122]. Pasaulyje žinoma virš 7500 obelių veislių, kurios tarpusavyje skiriasi derlingumu, atsparumu šalnomis ir ligoms, derėjimo laiku, vaisių forma, dydžiu, skoniu ir spalva [35, 92].

1.2. *M. domestica* Borkh. vaisių ir lapų cheminės sudėties tyrimai

Augalinės žaliavos yra daugiakomponentės matricos, kurių poveikį lemia biologiškai aktyvių junginių kompleksas. Pritaikius šiuolaikinius analizės metodus, svarbu nustatyti augalinių žaliavų kokybinę ir kiekinę sudėtį, užtikrinti jų saugumą ir kokybę, įvertinti įvairių veiksnių įtaką biologiškai aktyvių junginių sintezės procesams.

Obelių vaisiuose ir lapuose kaupiami biologiškai aktyvūs junginiai – flavonoidai ir fenolinės rūgštys [40, 127]. Šių augalinių žaliavų tyrimai yra aktualūs. Juos atlikus, galima pasiūlyti vartotojui kokybiškus, žinomos fenolinių junginių sudėties produktus, kurie galėtų būti potencialiai vertingi medicinos poreikiams – įvairių ligų prevencijai, funkcinio maisto kūrimui ir gamybai.

1.2.1. Obuolių flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai

Obuoliai užima svarbią vietą kasdienėje žmogaus mityboje – jie įtraukti į įvairių maisto produktų sudėtį, vartojami neperdirbti. Siekiant pateikti vartotojui kokybiškus, saugius, biologiškai aktyvių junginių turtingus maisto produktus, obuolių cheminės sudėties tyrimai tampa vis aktualesni. Tikslinga šiuolaikinės analizės metodais įvertinti obuolių biologiškai aktyvių junginių fitocheminę sudėtį, jų biosintezės ir kaupimosi dėsninumus, nustatyti obelių veisles, kurių vaisiuose sukaupiami didžiausi biologiškai aktyvių junginių kiekiai.

Lenkų mokslininkai nurodo, kad suminis ESC metodu identifikuotų fenolinių junginių kiekis obuoliuose įvairuoja nuo 523,02 mg/100 g iki 2723,96 mg/100 g absoliučiai sausos žaliavos [137].

Obuolių ėminiuose identifikuoti fenoliniai junginiai priskiriami dviem grupėms: flavonoidams ir fenolinėms rūgštimis. Fenolinių rūgščių grupei priklauso galo, protokatecho, alyvų, kavos, ferulo, *p*-kumaro, *trans*-cinnamono, sinapo rūgštys bei jų esteriai su chino, šikimo, vyno rūgštimis [58, 116].

Chlorogeno rūgštis, susidaranti kavos ir chino rūgščių esterifikacijos metu, yra viena labiausiai paplitusių fenolinių rūgščių augaluose [42]. Wojdyło ir kt. tyrė Lenkijoje auginamų obuolių fenolinių rūgščių kiekinę sudėtį. Šie mokslininkai nustatė, kad chlorogeno rūgšties kiekis obuolių ėminiuose

varijavo nuo 0,01 iki 2,96 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [137]. Chlorogeno rūgšties kiekis, nustatytas ištyrus obuolių ėminius, įvairavo nuo 1,44 mg/100 g iki 70,02 mg/100 g šviežių vaisių [24].

Flavonoidai yra vieni svarbiausių biologiškai aktyvių junginių, lemiančių obuolių poveikį žmogaus organizmui. Obuoliuose nustatyti įvairių grupių flavonoidai: flavonoliai, flavan-3-oliai, dihidrochalkonai ir antocianinai [3, 108].

Pagrindiniai flavonolių grupės junginių atstovai, identifikuoti obelų vaisiuose, yra kvercetino glikozidai: hiperozidas (kvercetin-3-O-galaktozidas), izokvercitrinas (kvercetin-3-O-gliukozidas), rutinas (kvercetin-3-O-rutinozidas), reinotrininas (kvercetin-3-O-ksilozidas), avikuliarinas (kvercetin-3-O-arabinozidas) ir kvercitrinas (kvercetin-3-O-ramnozidas) [128, 138]. Panzella ir kt. nustatė, kad kvercetino glikozidų kiekis obuolių ėminiuose įvairuoja nuo 0,02 mg/100 g iki 0,97 mg/100 g šviežių vaisių [95]. Duda-Chodak ir kt. nurodo, kad hiperozido kiekis Lenkijoje auginamų obuolių ėminiuose įvairuoja nuo 0,31 mg/100 g iki 3,38 mg/100 g, izokvercitrino kiekis varijuoja nuo 0,06 mg/100 g iki 1,09 mg/100 g, reinotrinino – nuo 0,26 mg/100 g iki 1,29 mg/100 g, kvercitrino – nuo 0,26 mg/100 g iki 2,38 mg/100 g, avikuliarino – nuo 0,39 mg/100 g iki 2,57 mg/100 g, rutino – nuo 0,01 mg/100 g iki 0,23 mg/100 g šviežių vaisių [33]. Nustatyti nedideli izoramnetin-3-O-galaktozido, izoramnetin-3-O-gliukozido kiekiai, kemferolio ir ramnetino glikozidų pėdsakai [3, 57, 117].

Obuolių ėminiuose identifikuoti flavan-3-olių grupės junginiai: katechinai (monomeriniai flavan-3-oliai) – (–)-epikatechinas ir (+)-katechinas bei įvairaus polimerizacijos laipsnio procianidinai (oligomeriniai flavan-3-oliai) – B1, B2, B3, B5, C1, E-B5, E4 [128]. Nyderlandų mokslininkai nustatė, kad suminis katechinų kiekis tirtuose obuolių ėminiuose įvairuoja nuo 14,3 mg/100 g iki 19,7 mg/100 g šviežių obuolių [132]. Obuoliuose nustatyti (–)-epikatechino kiekiai ženkliai didesni už (+)-katechino. Van der Sluis ir kt. nurodo, kad (–)-epikatechinas sudaro vidutiniškai 93–94 proc. visų obelų vaisiuose identifikuotų katechinų grupės junginių [132]. Ceymann ir kt. obuolių ėminiuose nustatyti (–)-epikatechino kiekiai varijavo nuo 0,51 mg/100 g iki 33,92 mg/100 g, o (+)-katechino – nuo 0,21 mg/100 g iki 9,76 mg/100 g šviežių vaisių [24]. Duda-Chodak ir kt. nurodo, kad procianidino B1 kiekis obuolių ėminiuose įvairavo nuo 0,46 mg/100 g iki 1,91 mg/100 g, procianidino B2 kiekis kito nuo 3,89 mg/100 g iki 12,50 mg/100 g, o procianidino C1 – nuo 1,26 mg/100 g iki 5,43 mg/100 g šviežių vaisių [34].

Dihidrochalkonų grupės junginiai gamtoje paplitę *Malus* genties augalų vegetatyviniuose ir generatyviniuose organuose, kitų rūšių augaluose jų beveik neaptinkama [46]. Obelų organuose nustatyti floretinas ir jo glikozidai: floridzinas (floretin-2'-gliukozidas), floretin-2'-ksilogliukozidas, 3-hidro-

ksifloridzinas (3-hidroksifloreitin-2'-gliukozidas), 3-hidroksifloreitin-2'-ksilogliukozidas [3, 127].

Wojdyło ir kt. nustatė, kad Lenkijoje užaugintų obuolių ėminiuose dihydrochalkonų grupės junginiai sudarė 0,5–4,9 proc. identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio. Šių mokslininkų nurodomi floridzino kiekiai įvairuoja nuo 0,31 mg/100 g iki 30,33 mg/100 g absoliučiai sausos žaliavos [137]. Ceymann ir kt. nustatyti floridzino kiekiai varijavo nuo 0,38 mg/100 g iki 12,77 mg/100 g šviežių vaisių [24].

Vienas dažniausiai obuolių ėminiuose nustatomų antocianinų grupės junginių yra cianidin-3-galaktozidas. Lenkijoje auginamų obuolių ėminiuose jo kiekiai įvairavo nuo 0,07 mg/100 g iki 0,85 mg/100 g šviežių vaisių [33]. Graikijos klimato sąlygomis užaugintų obuolių ėminiuose cianidin-3-galaktozido kiekiai kito nuo 0,2 mg/100 g iki 2,8 mg/100 g šviežių vaisių [131]. Kitų antocianinų grupės junginių kiekiai obuoliuose daug mažesni – nustatyti cianidin-3-O-ksilozido ir cianidin-3-arabinozido kiekiai siekė 0,06 mg/100 g šviežių vaisių [136].

Obuoliuose nustatyti ir kitų grupių biologiškai aktyvūs junginiai: triterpenoidai, organinės rūgštys, angliavandeniai, aminorūgštys, riebalų rūgštys, vitaminai, mikro- ir makroelementai [38, 125, 139].

Apibendrinant mokslinių tyrimų rezultatus, galima teigti, kad obelų vaisiai pasižymi didele biologiškai aktyvių junginių įvairove. Lietuvoje auginamų obuolių kokybinė ir kiekinė sudėtis yra mažai tyrinėta. Tikslinga atlikti išsamius obuolių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus. Ištyrus mūsų šalyje auginamų obuolių cheminę sudėtį ir jos įvairumą, gauti duomenys leis nustatyti perspektyviausias obelų veisles, tinkamas auginti Lietuvos klimato sąlygomis.

1.2.2. Obuolių luobelų ir minkštųjų flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai

Obuolių fitocheminė sudėtis nėra homogeniška, nustatyti ženklūs flavonoidų ir fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties skirtumai obuolių luobelėse ir minkštimuose [82, 129]. Jų cheminės sudėties įvairavimo tyrimai yra reikšmingi. Tai leidžia tikslingai panaudoti obuolių minkštumus ir luobelės individualių biologiškai aktyvių junginių išskyrimui, jais praturtintų maisto papildų kūrimui ir gamybai.

Wolfe ir kt. nurodo, kad obuolių luobelų ėminiuose bendras fenolinių junginių kiekis, priklausomai nuo veislės, yra 2–6 kartus didesnis nei obuolių minkštųjų ėminiuose [59, 137]. Tsao ir kt. nustatė, kad obuolių luobelų ėminiuose bendras fenolinių junginių kiekis kito nuo 78,16 mg GRE/100 g

iki 201,15 mg GRE/100 g, o minkštimų ėminiuose varijavo nuo 15,86 mg GRE/100 g iki 75,52 mg GRE/100 g šviežios žaliavos [129].

Atlikti moksliniai tyrimai, nagrinėjant obuolių minkštimų ir luobelų fenolinių junginių cheminės sudėties įvairavimą. Jakobek ir kt. nustatė, kad fenolinių rūgščių kiekis obuolių luobelų ėminiuose varijuoja nuo 3,5 mg/100 g iki 119,0 mg/100 g, minkštimų ėminiuose – nuo 25,9 mg/100 g iki 138,1 mg/100 g šviežios žaliavos [57]. Tsao ir kt. nustatytas chlorogeno rūgšties kiekis obuolių luobelų ėminiuose įvairuoja nuo 1,93 iki 23,36 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose – nuo 10,31 mg/100 g iki 30,80 mg/100 g šviežios žaliavos. Šie mokslininkai nurodo, kad chlorogeno rūgštis obuolių luobelų ėminiuose sudaro 8,5 proc., o minkštimų ėminiuose – net 36,8 proc. visų identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio [129].

Obuolių luobelėse ir minkštimuose nustatytos ir kitos fenolinės rūgštys – protokatecho, ferulo, *p*-kumaro, *p*-kumaroilchino. Obuolių luobelų ėminiuose nustatytas protokatecho rūgšties kiekis įvairavo nuo 0,01 mg/100 g iki 0,21 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose – nuo 0,01 mg/100 g iki 0,02 mg/100 g šviežios žaliavos. Kavos rūgšties kiekis obuolių luobelų ėminiuose kito nuo 0,15 iki 3,80 mg/100 g, minkštimų ėminiuose – nuo 0,04 mg/100 g iki 0,19 mg/100 g šviežios žaliavos [125]. Obuolių luobelų ėminiuose nustatytas ferulo rūgšties kiekis buvo 13,67 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose – 11,98 mg/100 šviežių vaisių [69]. *p*-kumaroilchino rūgšties kiekis obuolių luobelų ėminiuose kito nuo 0,54 mg/100 g iki 3,36 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose – nuo 0,38 mg/100 g iki 2,99 mg/100 g šviežios žaliavos [128].

Kvercetino glikozidų grupės junginiai susitelkę obuolių luobelėse, minkštimuose nustatyti jų kiekiai ženkliai mažesni [82, 128]. Mokslinių tyrimų duomenys nurodo, kad vienas svarbių veiksnių, skatinančių flavonolių grupės junginių biosintezės procesus obuolių luobelėse, yra saulės šviesos poveikis [70]. Nustatyta, kad obelių, auginamų gerai apšviestose vietose, vaisių luobelėse sukaupiamas didesnis flavonolių kiekis nei pavėsyje nokstančių obuolių luobelų ėminiuose [39]. Reikšmingi šios grupės junginių kiekiniai skirtumai gali atsirasti tarp to paties medžio vaisių ar netgi tarp skirtingų vaisiaus pusių, priklausomai nuo saulės šviesos intensyvumo [81].

Šavikin ir kt. nustatė, kad obuolių luobelų ėminiuose bendras flavonolių kiekis varijavo nuo 4,09 mg/100 g iki 959,00 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose kito nuo 0,43 mg/100 g iki 7,17 mg/100 g šviežios žaliavos [126]. Jakobek ir kt. nurodo, kad flavonolių kiekis obuolių luobelų ėminiuose įvairavo nuo 8,52 mg/100 g iki 145,58 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose – nuo 0,24 mg/100 g iki 0,44 mg/100 g šviežios žaliavos [57].

Obuolių luobelėse ir minkštimuose nustatyti flavan-3-olių grupės fenoliniai junginiai – katechinai ir oligomeriniai procianidiniai. Obuolių luobelų ėminiuose (–)-epikatechino kiekis įvairavo nuo 78,1 µg/g iki 591,6 µg/g, o minkštimų ėminiuose kito nuo 27,6 µg/g iki 142,3 µg/g šviežios žaliavos. Obuolių luobelų ėminiuose nustatytas (+)-katechino kiekis varijavo nuo 38,1 µg/g iki 123,9 µg/g, o minkštimų ėminiuose – nuo 1,1 µg/g iki 55,2 µg/g šviežios žaliavos. Nustatytas procianidino B1 kiekis obuolių luobelų ėminiuose varijavo nuo 46,6 µg/g iki 254,4 µg/g, o procianidino B2 nuo 73,2 µg/g iki 468,1 µg/g. Obuolių minkštimų ėminiuose procianidino B1 kiekis įvairavo nuo 31,9 µg/g iki 172,8 µg/g, o procianidino B2 – nuo 81,9 µg/g iki 212,6 µg/g [129].

Obuolių luobelų ėminiuose nustatytas dihidrochalkonų grupei priklausančio floridzino kiekis įvairavo nuo 3,76 mg/100 g iki 17,20 mg/100 g, o minkštimų ėminiuose kito nuo 0,80 mg/100 g iki 2,46 mg/100 g šviežių vaisių [129].

Antocianinų grupės junginiai susitelkę vaisiaus luobelėje, obuolių minkštimuose nustatytas jų kiekis ženkliai mažesnis [82]. Antocianinų kiekis Kroatijoje auginamų 8 veislių obuolių luobelų ėminiuose įvairavo nuo 25,18 mg/100 g iki 76,10 mg/100 g šviežios žaliavos. Šios grupės junginių nustatyta tik 'Ljubeničarka' veislės obuolių minkštimuose, jų kiekis siekė 31,88 mg/100 g šviežios žaliavos [57]. Marks ir kt. tyrė 20 veislių obuolių luobelų ir minkštimų ėminius [82]. Šie autoriai nurodo, kad cianidin-3-galaktozido kiekiai obuolių luobelų ėminiuose varijuoja nuo 0,6 mg/100 g iki 49,4 mg/100 g šviežios žaliavos. Obuolių minkštimų ėminiuose cianidin-3-galaktozido kiekis kito nuo 0,5 mg/100 g iki 1,2 mg/100 g šviežios žaliavos, bet šis junginys identifikuotas tik 3 veislių obuolių minkštimų ėminiuose. Nustatyta tiesioginė priklausomybė tarp antocianinų kiekio ir saulės šviesios intensyvumo – apdengus obelų vaisius nuo saulės spindulių apsugančia medžiaga, cianidin-3-galaktozido biosintezė nebevyksta [124].

Išnagrinėjus mokslinių tyrimų rezultatus, galima teigti, kad obuolių luobelų ir minkštimų fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė sudėtis skiriasi. Obuolių luobelėse sukaupiami dideli flavonolių ir antocianinų kiekiai. Minkštimų ėminiuose šių grupių junginių kiekiai yra ženkliai mažesni arba jų visai neidentifikuojama.

Atskirų vaisiaus dalių tyrimai yra reikšmingi, jie leidžia geriau suprasti biologiškai aktyvių junginių biosintezės dėsninumus. Tikslinga įvertinti Lietuvoje auginamų veislių obuolių minkštimų ir luobelų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimą, nustatyti obelų veisles, kurių vaisių luobelės ir minkštimai sukaupia didžiausius fenolinių junginių kiekius ir

kurios yra potencialiai vertingos individualių fenolinių junginių išskyrimui, maisto papildų kūrimui ir gamybai.

1.2.3. Obelių lapų flavonoidų ir fenolinių rūgščių fitocheminės sudėties tyrimai

Augalo organų cheminės sudėties tyrimai leidžia geriau suprasti biologiškai aktyvių junginių biosintezės ir kaupimosi dėsninumus. Jie yra svarbūs atliekant perspektyvių augalinių žaliavų paiešką. Obelių lapų kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimai buvo pradėti, norint nustatyti obelinio raupliagybio (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) įtaką fenolinių junginių biosintzei [97, 102]. Trūksta tyrimų, įvertinančių obelių lapų antioksidacinį aktyvumą, sudarančių galimybę juos panaudoti medicinos praktikoje, farmacijos ir maisto pramonės srityse.

Kroatų mokslininkai tyrė įvairiu metu laiku surinktus sveikus ir rauplių paveiktus obelių lapų ėminius. Sveikų obelių lapų ėminių etanoliniuose ekstraktuose nustatytas bendras fenolinių junginių kiekis svyravo nuo 55,1 mg iki 133,6 mg GRE/g sausos žaliavos [100].

Atlikti fenolinių rūgščių kokybinės ir kiekinės sudėties obelių lapuose tyrimai. Suminis hidroksicinamono rūgščių kiekis obelių lapų ėminiuose įvairuoja nuo 0,17 mg/g iki 2,32 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [121]. Nustatytas chlorogeno rūgšties kiekio variavimas nuo 4,2 mg/100 g iki 85,3 mg/100 g sausos žaliavos [100]. Chlorogeno rūgštis sudarė 55–65 proc. visų obelių lapų ėminiuose identifikuotų ir kiekiškai įvertintų hidroksicinamono rūgščių kiekio [98].

Sveikų obelių lapų ėminiuose kavos rūgšties kiekis varijavo nuo 4,2 mg/g iki 40,3 mg/100 g, *p*-kumaro rūgšties kiekis kito nuo 5,8 mg/g iki 26,3 mg/100 g, o ferulo rūgšties kiekis – nuo 5,8 mg/g iki 39,5 mg/100 g sausos žaliavos [100]. Benzoinės rūgšties kiekis obelių lapų ėminiuose įvairavo nuo 0,01 mg/g iki 0,71 mg/g sausos žaliavos [102].

Kvercetino glikozidai yra gausiausia obelių lapų fenolinių junginių grupė. Obelių lapuose nustatyti šie kvercetino glikozidų grupės junginiai: hiperozidas, izokvercitrinas, reinotrininas, avikuliarinas, kvercitrinas, rutinas. Petkovsek ir kt. nustatė, kad suminis kvercetino glikozidų kiekis obelių lapų ėminiuose varijavo nuo 15 mg/g iki 22 mg/g sausos žaliavos [97]. Hiperozidas ir kvercitrinas yra vyraujantys obelių lapų kvercetino glikozidų grupės junginiai. Mayr ir kt. nustatyti hiperozido kiekiai įvairavo nuo 5,68 mg/g iki 9,10 mg/g, o kvercitrino – nuo 0,61 mg/g iki 9,01 mg/g. Kitų kvercetino grupės glikozidų kiekiai buvo mažesni [79].

Obelių lapuose identifikuoti flavan-3-olių grupės junginiai: (+)-katechinas, (–)-epikatechinas ir procianidinas B2. Nustatytas (–)-epikatechino

kiekis įvairavo nuo 22,3 mg/g iki 137,4 mg/100 g, (+)-katechino – nuo 7,9 mg/g iki 125,2 mg/100 g [100], procianidino B2 – nuo 0,07 mg/g iki 1,19 mg/g sausos žaliavos [102].

Picinelli ir kt. obelų lapų ėminiuose identifiko dihidrochalkonų grupės junginius – floridziną ir floretiną. Floridzino kiekis tirtuose ėminiuose įvairavo nuo 54,1 mg/g iki 140,0 mg/g, o floretino – nuo 0,3 mg/g iki 10,9 mg/g sausos žaliavos [102]. Gosch ir kt. nurodo, kad floridzinas sudaro daugiau kaip 90 proc. obelų lapuose nustatytų fenolinių junginių [45].

Apibendrinant obelų lapų cheminės sudėties tyrimų duomenis, galima teigti, kad obelų lapuose sukaupiami dideli floridzino ir kvercetino grupės glikozidų, ypač hiperozido ir kvercitrino, kiekiai, tačiau duomenys apie biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairumą nėra išsamūs. Ieškant perspektyvių augalinių žaliavų, vertingų savo chemine sudėtimi, kaupiančių didelius biologiškai aktyvių junginių kiekius, tikslinga vykdyti augalų fitocheminės įvairovės tyrimus. Aktualu atlikti Lietuvoje auginamų veislių obelų lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties analizę bei palyginti gautus rezultatus su kitų mokslininkų tyrimų duomenimis.

1.3. Obuolių ir obelų lapų ekstraktų biologinis poveikis

Mokslinių šaltinių duomenimis obuolių vaisių ir lapų biologiškai aktyvių junginių kompleksas lemia platų šių augalinių žaliavų biologinio poveikio spektrą [20]. Atliktų tyrimų rezultatai patvirtina obuolių ir obelų lapų ekstraktų bei juose nustatytų individualių fenolinių junginių teigiamą poveikį žmogaus sveikatai [110, 136]. Siekiant mokslškai pagrįsti obuolių ir obelų lapų vartojimą sveikatinimo tikslams, svarbu eksperimentiniais tyrimais įvertinti šių augalinių žaliavų biologinį poveikį, išsiaiškinti jų ekstraktų veikimo mechanizmus.

Obuolių antioksidacinis poveikis siejamas su fenolinių junginių kompleksu [13, 34, 73]. Bai ir kt., tyrę obuolių išspaudų fenolinių junginių antioksidacinį aktyvumą, nustatė, kad procianidino B2 antioksidacinis poveikis yra stipriausias. Silpniausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymi hiperozidas ir chlorogeno rūgštis, silpniausiu – floridzinas [11]. Lee ir kt. tyrė obuolių fenolinių junginių ir askorbo rūgšties įtaką antioksidaciniam aktyvumui, jie nustatė, kad kvercetinas, (–)-epikatechinas ir procianidinas B2 yra pagrindiniai biologiškai aktyvūs junginiai, lemiantys obuolių ekstraktų antioksidacinį poveikį *in vitro* [68].

Bonarska-Kujawa ir kt. tyrė obelų lapų ekstraktų įtaką izoliuotų kiaulės eritrocitų membranų oksidacijai. Tyrimo metu nustatyta, kad obelų lapų ekstraktas sukelia stiprų oksidaciją inhibuojantį poveikį, todėl autoriai siūlo

jį vartoti kaip natūralų antioksidantą maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje [21]. Tyrimai su žmonėmis parodė, kad senyvo amžiaus tiriamųjų, kasdien valgiusių šviežius obuolius, eritrocituose padidėjo antioksidacinių fermentų – superoksido dismutazės, glutationo peroksidazės kiekis ir bendras kraujo plazmos antioksidacinis potencialas [6].

Cholesterolio ir trigliceridų koncentraciją kraujyje mažinantis poveikis. Obuoliuose nustatyti biologiškai aktyvūs junginiai pasižymi cholesterolio ir trigliceridų koncentraciją kraujyje mažinančiu poveikiu. Thilakarathna ir kt. nustatė, kad obuolių luobelų ekstraktas inhibuoja mažo tankio lipoproteinų cholesterolio oksidaciją *in vitro*. Šį poveikį lemia chlorogeno rūgštis ir kvercetino grupės glikozidai [126]. Maitinant žiurkės maisto papildais, turinčiais liofilizuotų obuolių miltelių, nustatyta, kad cholesterolio koncentracija kraujo plazmoje ir kepenyse reikšmingai sumažėjo, o didelio tankio lipoproteinų padidėjo [4]. Panašūs tyrimų rezultatai gauti į žiurkių maitinimo racioną įtraukiant obuolius (5 g per dieną). Straipsnio autorių duomenimis (+)-katechinas, (–)-epikatechinas, procianidinas B1 ir β-karotenas yra svarbiausi obuoliuose nustatyti junginiai, lemiantys cholesterolį mažinantį poveikį [119].

Poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai. Balasuriya ir Rupasinghe tyrė obuolių luobelų poveikį angiotenziną konvertuojančio fermento (AKF) aktyvumui. Tyrimo metu nustatyta, kad obuolių luobelų ekstraktas pasižymi AKF inhibuojančiu poveikiu. Vertinant individualių kvercetino darinių įtaką AKF inhibavimui, stipriausiu poveikiu pasižymėjo kvercetin-3-gliukozidas ir kvercetino metabolitas – kvercetin-3-gliukuronidas [12].

Antivėžinis poveikis. Tirtas obuolių luobelų ekstrakto poveikis vėžio ląstelių proliferacijai *in vitro*. Nustatyta, kad obuolių luobelų ekstraktas reikšmingai mažina krūties ir prostatos vėžio ląstelių gyvybingumą ir dalijimosi potencialą, stabdo navikų augimą, skatina vėžinių ląstelių angio- genezę ir metastazavimą slopinančio baltymo maspino ekspresiją [110]. Barth ir kt. tyrinėjo obuolių sulčių poveikį žiurkių gaubtinės žarnos karcinogenezės procesams, sukeltiems naudojant 1,2-dimetilhidraziną. Nustatyta, kad obuolių sultys sumažino vėžio žymenų koncentraciją, DNR pažeidimų skaičių, slopino ląstelių proliferacijos procesus [15]. Maldonado-Celis ir kt. nustatė, kad obuolių procianidinais skatina receptorių, atsakingų už apoptozės procesus žmogaus gaubtinės žarnos ląstelėse, aktyvumą, todėl obuoliai ir jų produktai vertingi vėžinių ligų profilaktikai [80]. Įrodyta priklausomybė tarp suvartojamo obuolių kiekio ir susirgimo vėžiu rizikos [41].

Antimikrobinis poveikis. Atlikti obuolių luobelų ekstrakto poveikio *Helicobacter pylori* padermės bakterijoms tyrimai. Nustatyta, kad ekstraktas slopina *H. pylori* adheziją prie skrandžio gleivinės [96].

Tirtas obuolių luobelų ekstraktų antimikrobinis poveikis agar difuzijos metodu *in vitro*. Obuolių luobelų acetoninis ekstraktas turėjo stiprų antimikrobinį poveikį *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ir *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 padermėms. Labiau išreikštą antimikrobinį poveikį lėmė didesnį fenolinių junginių kiekį turintys ekstraktai [1].

Antivirusinis poveikis. Atlikti moksliniai tyrimai, įrodantys obuolių fenolinių junginių poveikį *Herpes simplex* ir gripo virusų padermėms. Suárez ir kt. tyrė obuolių išspaudų ekstraktų poveikį *Herpes simplex* 1 ir 2 tipo virusų padermių replikacijai beždžionių inkstų ląstelėse *in vitro*. Nustatyta, kad ekstraktai daugiau nei 50 proc. inhibavo abiejų tipų *H. simplex* virusų padermių replikaciją [123]. He ir kt. tyrė obuolių ekstrakto poveikį gripo virusu H1N1 paderme užkrėstoms pelėms Atlikti poveikio mechanizmo tyrimai parodė, kad obuolių ekstraktas sustiprino imuninės sistemos atsaką – padidino B ir T limfocitų skaičių, ląstelinio imuniteto mediatoriaus interleukino-2 sekreciją, netiesiogiai stimuliuo 1 ir 2 tipų interferono gamybą [52].

Antidiabetinis poveikis. Obelių vaisiuose ir lapuose nustatytas dihidrochalkonų grupės junginys – floridzinas, pasižymintis plačiu biologinio poveikio spektru. Atlikti moksliniai tyrimai įrodo, kad šis junginys turi poveikį vėžinių ląstelių vystymuisi [133], gerina atmintį [19, 141], yra svarbus kaulų lūžių prevencijai [107, 120].

Labiausiai mokslininkus dominantis ir medicinai svarbus yra floridzino antidiabetinis poveikis [83, 89]. Floridzinas mažina gliukozės koncentraciją plazmoje, blokuodamas gliukozės absorbciją ir resorbciją [61, 142]. Floridzino geba panaikinti gliukotoksiškumą ir sumažinti gliukozės koncentraciją kraujyje, nedidinat kūno svorio, nesukeliant hipoglikemijos ir skysčių netekimo rizikos, lemia jo naudą II tipo diabeto profilaktikai [50, 93, 104].

Kiti poveikiai. Mokslinėje literatūroje aprašyta, kad obuolių sulčių fenoliniai junginiai gali būti vertingi Alzheimerio ligos prevencijai. Nustatyta, kad obuolių sulčių koncentratas slopina padidintą presenilino-1 ekspresiją [26], mažina reaktyvių deguonies formų kaupimąsi smegenų audinyje ir lėtina atminties blogėjimą [113].

Atlikti obuolių minkštųjų ekstrakto poveikio skrandžio epitelio ląstelėms *in vitro* ir *in vivo* tyrimai. Nustatyta, kad ekstraktas apsaugo skrandžio gleivinės ląstelių membranas nuo reaktyvių deguonies formų sukeltų pažeidimų ir inhibuoja lipidų peroksidacijos procesus [47]. Carrasco-Pozo ir kt. atliko tyrimus su žiurkėmis *in vivo* ir įrodė, kad obuolių luobelų ekstraktas, mažindamas neutrofilų infiltraciją į skrandžio gleivinę, apsaugo ją nuo įvairių vaistų nuo uždegimo sukeltų mikro- ir makro- pažeidimų. Obuolių luobelų fenoliniai junginiai gali būti naudojami kaip prevencinė priemonė nesteroidinių vaistų nuo uždegimo šalutiniams poveikiams mažinti [23].

Bao ir kt., atlikę tyrimus su pelėmis, nustatė, kad obuolių fenoliniai junginiai reikšmingai mažina cigarečių dūmų sukeltus uždegiminius procesus. Obuolių fenoliniai junginiai gali būti vertingi apsaugant plaučius nuo cigarečių dūmų sukeltų pažeidimų [14].

Šiame skyriuje pateikti tyrimų duomenys įrodo, kad obuoliuose ir obelių lapuose kaupiami fenoliniai junginiai lemia įvairiapusį biologinį poveikį ir gali būti potencialiai vertingi įvairių ligų prevencijai ir gydymui. Atsižvelgiant į tai, tikslinga atlikti Lietuvos klimato sąlygomis auginamų obelių vaisių ir lapų fenolinių junginių fitocheminės sudėties ir antioksidacinio poveikio tyrimus. Gauti tyrimų rezultatai leistų pasiūlyti vartotojui žinomos fenolinių junginių sudėties obuolių ir obelių lapų ekstraktais praturtintus maisto papildus, kurie būtų vertingi sprendžiant apie šių augalinių žaliavų naudojimą funkcinio maisto kūrimui ir gamybai.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Obuolių ir obelių lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimams panaudoti 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel', 'Rajka' veislių ėminiai, užauginti Lietuvoje, Babtuose, LAMMC filiale Sodininkystės ir daržininkystės instituto eksperimentiniame sode. Obuolių ir lapų fenolinių junginių kiekinės sudėties palyginamiesiems tyrimams ėminiai rinkti 2012 m. Poskiepių įtakos obuolių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimui 'Ligol' veislės obuoliai skinti 2011–2012 m. Tyrimams naudoti obelių poskiepai: nykštukiniai (P 22, P 59, P 61 ir PB.4), žemaūgiai (M.9, P 62, P 66, P 67, B.396) ir pusiaužemaūgis M.26 poskiepis. Obuolių ir obelių lapų ėminiai fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimo tyrimams vegetacijos metu rinkti skirtingais fenologiniais tarpsniais 2013 m. (2.1.1 lentelė). Fenologiniai tarpsniai nurodyti pagal Meier [85].

2.1.1 lentelė. Tyrimo laikotarpio (gegužės–lapkričio mėnesiai) metų dienos ir fenologiniai tarpsniai.

Ėminių rinkimo data	Metų diena	Fenologinis tarpsnis	
		Lapai	Vaisiai
Gegužės 21	140	Lapų vystymasis (skleidimasis)	–
Birželio 4	154		–
Birželio 18	168	Intensyvus ūglių augimas – pirmieji lapai pilnai išsiskleidę, auga ir skleidžiasi nauji lapai	Vaisių vystymasis
Liepos 2	182		
Liepos 16	196		
Liepos 30	210		
Rugpjūčio 13	224		
Rugpjūčio 27	238	Branda – pilnai subrendę, produktyvūs lapai, intensyviai vykdančios fotosintezę.	Vaisių nokimas
Rugsėjo 9	252		
Rugsėjo 16	259		
Rugsėjo 23	266		
Rugsėjo 30	273		
Spalio 7	280		
Spalio 14	287		
Spalio 21	294	Lapų senėjimas	
Lapkričio 4	308		

2.2. Tyrimo metodai

Obuolių ėminių paruošimas. Obuoliai supjaustyti į vienodo dydžio skilteles (iki 1 cm storio), pašalinant kotelius ir sėklas. Obuolių skiltelės užšaldytos -35°C temperatūroje šaldiklyje su oro cirkuliacija ir džiovintos liofilizatoriuje „Zirbus“ („Zirbus technology GmbH“, Vokietija). Liofilizacija vykdyta 0,01 mbar slėgyje, kondensoriaus temperatūra -85°C . Liofilizuotos obuolių skiltelės susmulkintos, naudojant elektrinį malūną „Retsch 200“ („Retsch GmbH“ Vokietija). Ėminiai laikyti sandariai uždarytuose induose, tamsoje.

Obuolių luobelų ir minkštųjų ėminių paruošimas. Obuolių luobelės nuo obuolių minkštimo atskirtos, naudojant obuolių lupimo įrenginį „Kronen AS2“ („Kronen GmbH“, Vokietija). Supjaustyti obuolių luobelų ir minkštųjų ėminiai paruošti analogiškai, kaip ir obuolių ėminiai.

Obelių lapų ėminių paruošimas. Šviežiai surinkti obelių lapai džiovinti liofilizatoriuje „Zirbus“ („Zirbus technology GmbH“, Vokietija) tokiomis pačiomis sąlygomis kaip obuolių ėminiai.

Visų tiriamųjų mėginių nuodžiūvis nustatytas Europos farmakopėjos nurodytu metodu [36]. Tyrimų duomenys perskaičiuoti absoliučiai sausai liofilizuotai žaliavai.

Obuolių ėminių ekstraktų paruošimas. Atsveriamą 2,5 g (tikslus svėrinys) liofilizuotų obuolių miltelių, užpilama 30 ml 70 proc. (v/v) etanolio ir ekstrahuojama ultragarso vonelėje „Sonorex Digital 10 P“ („Bandelin electronic GmbH“, Vokietija) 20 min. 40°C temperatūroje sandariai uždarytuose stikliniuose buteliukuose. Ultragarso stipris – 480 W, dažnis – 35000 Hz. Gautas ekstraktas filtruojamas per popierinį filtrą, obuolių liofilizatas esantis ant filtro du kartus praplaunamas po 10 ml 70 proc. (v/v) etanolio į 50 ml matavimo kolbutę ir paskiedžiama 70 proc. (v/v) etanolio iki žymės. Prieš ESC analizę ekstraktai filtruojami per $0,22\ \mu\text{m}$ porų dydžio membraninius filtrus („Carl Roth GmbH“, Vokietija).

Obelių lapų ėminių ekstraktų paruošimas. Atsveriamą 0,25 g (tikslus svėrinys) liofilizuotų obelių lapų miltelių, užpilama 10 ml 70 proc. (v/v) etanolio ir ekstrahuojama ultragarso vonelėje „Sonorex Digital 10 P“ („Bandelin electronic GmbH“, Vokietija) 40 min. 60°C temperatūroje sandariai uždarytuose stikliniuose buteliukuose. Ultragarso stipris – 480 W, dažnis – 35000 Hz. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 7 min., naudojant „Hermle Z206A“ centrifugą („Denville Scientific Inc.“, JAV). Centrifugavimo greitis – 6000 apsisukimų per minutę. Po centrifugavimo supernatantas nupilamas nuo nuosėdų. Prieš ESC analizę ekstraktai filtruojami per $0,22\ \mu\text{m}$ porų dydžio membraninius filtrus („Carl Roth GmbH“, Vokietija).

Bendro flavonoidų kiekio nustatymas. Bendras flavonoidų kiekis nustatytas spektrofotometrinio metodu, veikiant tiriamąjį ekstraktą aliuminio chlorido tirpalu rūgštinėje terpėje [130]. **Tiriamąjo tirpalo paruošimas.** 0,2 ml tiriamąjo tirpalo 5 ml matavimo kolbutėje sumaišoma su 2 ml 96 proc. (v/v) etanolio, 0,1 ml 30 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalo, 0,3 ml 10 proc. aliuminio chlorido tirpalo. Po 30 min. į kolbutę įpilama 0,4 ml 5 proc. heksametilentetramino tirpalo ir praskiedžiama išgrynintu vandeniu iki žymės. **Palyginamojo tirpalo paruošimas.** 0,2 ml tiriamąjo ekstrakto 5 ml kolbutėje sumaišoma su 2 ml 96 proc. (v/v) etanolio, 0,1 ml 30 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalo ir praskiedžiama išgrynintu vandeniu iki žymės. Absorbcijos dydis matuotas UV-Vis spektrofotometru „Genesys-10“ („Thermo Spectronic“, JAV) bangos ilgiui esant 407 nm. Penkių lygmenų kalibravimo grafikas ($y=1,0258x+0,008$, $R^2=0,9994$) sudarytas, naudojant 0,1–0,85 mg/ml koncentracijos etaloninius rutino tirpalus. Bendras flavonoidų kiekis obelų vaisių ar lapų ėminiuose išreikštas rutino ekvivalentu mg/g absoliučiai sausos žaliavos.

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika. Fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė analizė atlikta atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu „Waters 2695 Alliance“ chromatografine sistema („Waters“, JAV), naudojant diodų matricos detektorių „Waters 2998“. Chromatografinio skirstymo valdymas, chromatogramų registravimas, duomenų kaupimas ir apdorojimas atliktas naudojantis „Empower® 2 Chromatography Data Software“ („Waters“, JAV) programine įranga. Skirstymui naudota kolonėlė „YMC-Pack ODS-A“ (250×4,6 mm, C₁₈, dalelių dydis 5 μm) su prieškolone „YMC-Triart“ (10×3,0, C₁₈, dalelių dydis 5 μm) („YMC Europe GmbH“, Vokietija). Optimizuotos chromatografinės metodikos eliuentų sistema sudaryta iš 2 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalo vandenyje (eliuentas A) ir 100 proc. (v/v) acetonitrilo (eliuentas B). Gradiento kitimas: 0–30 min. 3–15 proc. B, 30–45 min. 15–25 proc. B, 45–50 min. 25–50 proc. B, 50–55 min. 50–95 proc. B. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 μl. Kolonėlė termostatuota 25°C temperatūroje. Chromatografinės smailės identifikuotos lyginant analičių ir etaloninių junginių sulaikymo laikus ir UV absorbcijos spektrines charakteristikas (λ=200–400 nm). Identifikuotų junginių tapatybė patvirtinta priedo metodu į tiriamąjį ekstraktą pridėjus etaloninio junginio, vertinant chromatografinių smailių formos ir spektrinių charakteristikų pokyčius. Kiekinis obelų vaisių ir lapų ėminių ekstraktuose identifikuotų junginių nustatymas atliktas naudojantis penkių lygmenų kiekvienai analizei sudarytais etaloninių junginių kalibravimo grafikais bei remiantis analizės chromatografinės smailės ploto priklausomybe nuo analizės koncentracijos

analizuojamame ekstrakte. Dihidrochalkonų, monomerinių ir oligomerinių flavan-3-olių kiekiai tiriamuosiuose ekstraktuose apskaičiuoti bangos ilgiui esant 280 nm, fenolinių rūgščių – 320 nm, flavonolių – 360 nm.

Antioksidacinio aktyvumo nustatymas. ABTS tirpalo paruošimas. 2 mM ABTS miltelių ištirpinama 0,7 mM vandeniniame kalio persulfato tirpale. Tirpalas laikomas 16–17 val. kambario temperatūroje tamsoje, kol pasiekama reakcijos pusiausvyra. Gautas pradinis ABTS radikalo-katijono ($\text{ABTS}^{+\bullet}$) tirpalas skiedžiamas acetatiniu buferiu (0,1 M, pH 4,5) iki darbinės 110 μM $\text{ABTS}^{+\bullet}$ koncentracijos.

FRAP tirpalo paruošimas. 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazino (TPTZ) miltelių ištirpinama 40 mM vandenilio chlorido rūgšties tirpale. 20 mM geležies (III) chlorido heksahidrato ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) ištirpinama išgrynintame vandenyje. Darbinis FRAP tirpalas ruošiamas sumaišius TPTZ, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ir acetatinio buferio (300 mM, pH 3,6) tirpalus santykiu 1:1:25.

ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai metodai. Tiriamųjų ekstraktų choramtografinis skirstymas atliktas chromatografine „Waters 2695 Alliance“ sistema („Waters“, JAV) su diodų matricos detektoriumi „Waters 2998“, taikant aukščiau aprašytą ESC skirstymo metodiką. Ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymas atliktas, taikant Raudonio ir kt. straipsnyje aprašytas ESC-ABTS ir ESC-FRAP metodikas [109]. Po detekcijos eliuatas tiesiogiai sumaišomas su $\text{ABTS}^{+\bullet}$ arba FRAP reagentu, kurie į pokolonėlę tiekiami chromatografu „Beckman programmable solvent module 126“ („Beckman“, JAV) pastoviu 0,5 ml/min. tėkmės greičiu. Reakcija tarp analitės ir reagento vykdyta reakcijos kilpoje, pagamintoje iš polietere-terketono (ilgis 15 m, vidinis skersmuo 0,3 mm), 25°C temperatūroje. „Waters 2487“ detektorius naudotas registruoti absorbcijos padidėjimą po reakcijos su FRAP (esant 593 nm bangos ilgiui) arba sumažėjimą po reakcijos su $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (esant 650 nm bangos ilgiui). ABTS kalibravimo grafikas ($y=10497x+4758,1$, $R^2=0,9987$) sudarytas, naudojant 20–200 μM koncentracijos etaloninius trolokso tirpalus. FRAP kalibravimo grafiko ($y=18560x-7573,8$, $R^2=0,9995$) sudarymui naudoti 1–100 μM koncentracijos etaloniniai trolokso tirpalai.

Antioksidacinio aktyvumo apskaičiavimas. Obuolių ėminių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal trolokso kalibravimo grafiką ir išreikštas TE $\mu\text{mol/g}$ absoliučiai sausai žaliavai. TE atitinka trolokso kiekį (μmol), kuris tokiomis pat tyrimo sąlygomis turi identišką antioksidacinį aktyvumą, kaip 1 g augalinės žaliavos. TE apskaičiuojamas iš formulės:

$$\text{TE} = \frac{A - b}{a} \times \frac{V_{\text{band.}}(l)}{m_{\text{band.}}(g)}, (\mu\text{mol/g}),$$

kur: A – antioksidantiškai aktyvios analitės smailės plotas antioksidacinio aktyvumo chromatogramoje; a – nuolydis, b – nuokrypis iš trolokso kalibravimo grafiko regresijos lygties; $V_{\text{band.}}$ – tiriamos augalinės žaliavos ekstrakto bandinio tūris (l); $m_{\text{band.}}$ – tiriamo bandinio atsvertas kiekis (tiksliai masė, g). Antioksidantinis profilis leidžia įvertinti individualių komponentų įtaką antioksidaciniam aktyvumui [16]. Identifikuotų junginių indėlis į antioksidacinį aktyvumą (IAA) apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{IAA} = \frac{S_x}{S_{\text{bendras}}} \times 100,$$

kur: S_x – vertinamos smailės plotas; S_{bendras} – visų antioksidaciniame profile identifikuotų smailių plotų suma.

Naudoti reagentai. Tyrimų metu naudoti analitinio švarumo reagentai, gradientinio švarumo elientai ir ESC grynumo etaloniniai junginiai įsigyti iš šių gamintojų: „Sigma-Aldrich“ (Šveicarija), „Extrasynthese“ (Prancūzija), „Chromadex“ (JAV), AB „Stumbras“ (Lietuva), „Fluka“ (Šveicarija), „Scharlau“ (Ispanija). Išgrynintas dejonizuotas vanduo ($18,2 \text{ m}\Omega\text{cm}^{-1}$) ruoštas „Crystal E HPLC“ („Adrona“, Latvija) vandens valymo sistema.

Statistiniai duomenų apdorojimo metodai. Obelių vaisių ir lapų ėminių fitocheminių tyrimų metu gauti duomenų įvertinimas atliktas „MS Excel“ („Microsoft“, JAV) kompiuterine programa ir „SPSS 20“ („SPSS Inc.“, JAV) statistiniu paketu. Duomenys pateikiami kaip trijų pakartojimų vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis. Statistiškai patikimi skirtumai tarp skirtingų veislių ėminių nustatyti atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę (ANOVA) ir taikant daugkartinio palyginimo Tukey kriterijų. Kolmogorovo-Smirnov kriterijus taikytas hipotezei apie kintamojo skirstinio normalumą patikrinti. Livyno kriterijus naudotas hipotezės apie dispersijų lygybę tikrinimui. Skirtumai laikyti statistiškai patikimais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

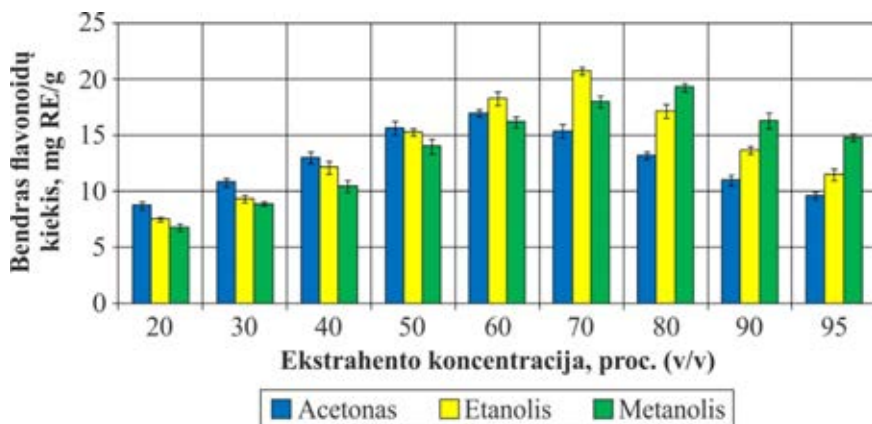
3.1. ESC metodikos *M. domestica* Borkh. vaisių ir lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimui vystymas

Norint užtikrinti augalinių žaliavų ir jų fitopreparatų efektyvumą ir kokybę, būtina taikyti ypatingai atrankius, šiuolaikinius analizės metodus, kurie įgalintų efektyviai išskirstyti antrinių metabolitų kompleksus ir atlikti biologiškai aktyvių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimą. Tai skatina kurti naujas analitines metodikas ir pritaikyti jas augalų teikiamų žaliavų cheminės sudėties tyrimams.

3.1.1. Obuolių ir obelų lapų flavonoidų ekstrakcijos sąlygų optimizavimas

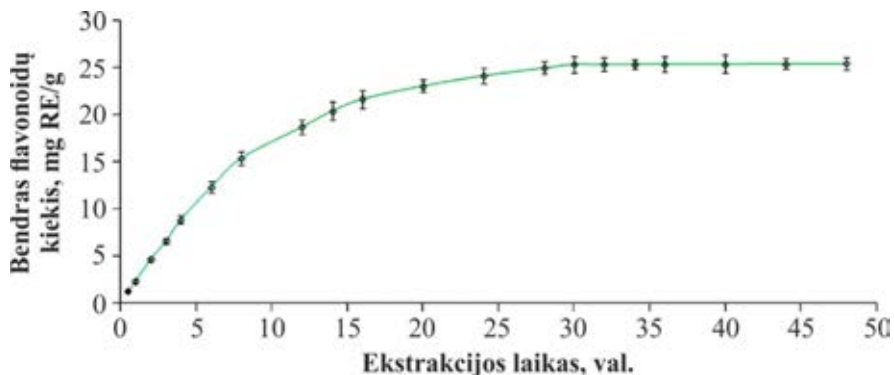
Ekstrahento ir ekstrakcijos sąlygų parinkimas yra reikšmingas analitinis žingsnis, vystant augalinių žaliavų biologiškai aktyvių junginių kokybinio ir kiekinio nustatymo metodiką. Flavonoidų glikozidams, polinėms fenolinėms rūgštims išekstrahuoti dažniausiai naudojami ekstrahentai yra metanolis, etanolis, acetonas ir įvairių koncentracijų jų mišiniai su vandeniu [49, 60].

Obelų lapų flavonoidų ekstrakcijos sąlygų optimizavimas. Vertinant ekstrahento poliškumo įtaką flavonoidų ekstrakcijai iš obelų lapų ėminių, taikytas maceracijos metodas. Flavonoidų ekstrakcijos išeiga tirta ekstrahuojant ėminius acetono, etanolio ir metanolio mišiniais su vandeniu. Tyrimams pasirinktos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 proc. (v/v) acetono, etanolio ir metanolio koncentracijos. Obelų lapų ėminių ekstrakcija vykdyta 4 val, bendrą flavonoidų kiekį nustatant spektrofotometrinio metodu [130]. Apibendrinant tyrimų rezultatus, nustatyta, kad didžiausias bendras flavonoidų kiekis ($20,74 \pm 0,36$ mg RE/g) gautas obelų lapų ėminius ekstrahuojant 70 proc. (v/v) etanolio, todėl šis ekstrahentas pasirinktas tolesniems tyrimams (3.1.1.1 pav.).



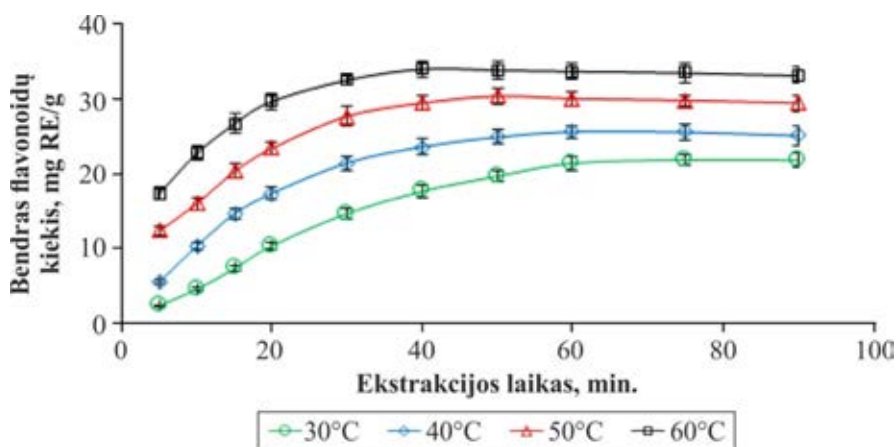
3.1.1.1 pav. Bendras flavonoidų kiekis obelų lapų ėminių ekstraktuose, ekstrahacijai naudojant skirtingus įvairių koncentracijų ekstrahentus

Kitame obelų lapų ėminių ekstrakcijos optimizavimo tyrimų etape vertinta ekstrakcijos metodo ir trukmės įtaka flavonoidų išgavai. Flavonoidų ekstrakcijos efektyvumo palyginamiesiems tyrimams pasirinkti šie ekstrakcijos metodai: maceracija ir ekstrakcija ultragarsu (sonifikacija). Ekstrahuojant obelų lapų ėminius maceracijos būdu skirtingais laiko intervalais nuo 0,5 iki 48 val., nustatyta, kad koncentracijų pusiausvyra tarp skystos ir kietos fazių pasiekama po 30 val. ekstrakcijos (3.1.1.2 pav.). Nustatytas bendras flavonoidų kiekis siekė $25,34 \pm 0,86$ mg RE/g. Toliau ilginant ekstrakcijos laiką, flavonoidų išeiga statistiškai patikimai ($p > 0,05$) nekito ir po 48 val. ekstrakcijos nustatytas flavonoidų kiekis buvo $25,41 \pm 0,69$ mg RE/g.



3.1.1.2 pav. Bendro flavonoidų kiekio kitimas obelų lapų ėminių ekstraktuose, ekstrahuojant maceracijos metodu.

Norėdami įvertinti ekstrakcijos ultragarsu metodo įtaką flavonoidų išgavai, obelų lapų ėminių ekstrahavome ultragarso vonelėje skirtingais laiko intervalais nuo 5 min. iki 90 min. 30, 40, 50 ir 60°C temperatūroje. Nustatyta, kad, didinant temperatūrą, laikas, per kurį pasiekama ekstrakcijos pusiausvyra tarp kietafazio bandinio ir skystos fazės, trumpėja. Didžiausias bendras flavonoidų kiekis ($33,93 \pm 1,02$ mg RE/g) nustatytas obelų lapų ėminių ekstrahavus 40 min. 60°C (3.1.1.3 pav.). Ilginant ekstrakcijos ultragarso vonelėje trukmę, statistiškai patikimo skirtumo tarp bendro flavonoidų kiekio nenustatyta ($p > 0,05$). Po 90 min ekstrakcijos nustatytas bendras flavonoidų kiekis siekė $33,53 \pm 1,21$ mg RE/g. Palyginus maceracijos ir ekstrakcijos ultragarso vonelėje metodų efektyvumą, nustatyta, kad, tiriamuosius bandinius veikiant ultragarsu, didesnė ekstrakcijos išeiga pasiekama per ženkliai trumpesnę laiką nei taikant maceracijos metodą.



3.1.1.3 pav. Bendro flavonoidų kiekio kitimas obelų lapų ėminių ekstraktuose ekstrahuojant ultragarso vonelėje.

Atlikus obelų lapų flavonoidų ekstrakcijos optimizavimo tyrimus, nustatyta, kad didžiausias bendras flavonoidų kiekis gautas obelų lapų ėminių ekstrahavus 70 proc. (v/v) etanoliu 40 min. 60°C temperatūroje. Šios ekstrakcijos sąlygos pasirinktos tolesniems obelų lapų fitocheminės sudėties tyrimams.

Obuolių flavonoidų ekstrakcijos sąlygų optimizavimas. Atlikti eksperimentiniai tyrimai, optimizuojant flavonoidų ekstrakciją iš obuolių ėminių. Gauti tyrimų rezultatai išsamiai išnagrinėti mūsų publikuotame straipsnyje „Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars“ (žr. Priedai).

Apibendrinant obuolių ėminių ekstrakcijos optimizavimo tyrimų rezultatus, nustatyta, kad didžiausia flavonoidų išgava pasiekta ekstrahuojant

obuolių ėminių 70 proc. (v/v) etanoliu ultragarso vonelėje 20 min. 40°C temperatūroje. Šios sąlygos pasirinktos skirtingų veislių obuolių ėminių ekstrakcijai vykdyti.

3.1.2. ESC metodikos obuolių ir obelų lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimui optimizavimas ir validavimas

Kiekinės fenolinių junginių sudėties daugiakomponentėse augalinėse matricose įvertinimui plačiausiai naudojami chromatografiniai ir UV-regimo spektro absorbcinės spektrofotometrijos metodai, rečiau kapiliarinė elektroforezė [88, 128]. UV-regimosios šviesos spektrofotometrijos metodas taikomas bendram fenolinių junginių ir jų grupių (antocianinų, proantocianidinų ir kt.) kiekiui nustatyti [25]. ESC metodas yra vienas plačiausiai taikomų analizės metodų, leidžiančių atlikti kokybinės ir kiekinės biologiškai aktyvių junginių sudėties augalinėse žaliavose ir jų preparatuose vertinimą [56, 88, 135].

Augalinių ekstraktų fenolinių junginių skirstymui ir kiekiniam nustatymui ESC metodu dažniausiai taikoma atvirkščių fazių efektyvioji skysčių chromatografija, naudojant kolonėles su C₁₈, rečiau C₈ ar kita įkrova [30, 31]. Dėl augalinių žaliavų biologinės matricos kompleksiško sudėtinga pasiekti pakankamą atrankumą ir skiriamąją gebą, todėl pradiniam ESC metodikos vystymo etape yra labai svarbu pasirinkti tinkamą kolonėlę, kuri užtikrintų analizių atskyrimą.

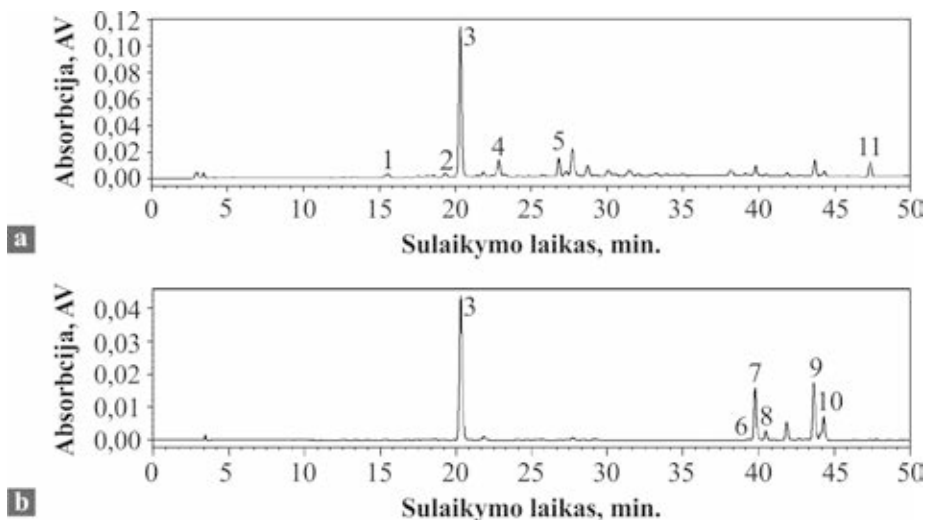
Siekiant gauti geriausią skiriamąją gebą ir obuolių bei obelų lapų ėminių ekstraktų fenolinių junginių komplekso išskirstymą, buvo įvertintas 4 skirtingų parametrų chromatografinių kolonėlių atrankumas ir skiriamoji geba. Tyrimams naudotos šios kolonėlės: „YMC-Pack ODS-A“ C₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm), „ACE“ C₁₈ (150 mm×4,6 mm, 3 μm), „ACE“ C₁₈ (250 mm×4,6 mm, 5 μm) ir „Phenomenex Luna“ C₁₈ (250 mm×4,6 mm, 5 μm). Metodikos vystymo eksperimentų metu nustatyta, kad, chromatografiniam skirstymui naudojant kolonėlę „YMC-Pack ODS-A“ C₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm) pasiekiamas geresnis analizių atskyrimas, todėl ši kolonėlė atrinkta tolesniems tyrimams.

Augalinės kilmės ekstraktų analizių skirstymui dažniausiai taikomas gradientinis eliuavimas [60]. Moksliniuose straipsniuose nurodoma, kad, ESC metodu skirstant fenolinius junginius, eliuентаis dažniausiai naudojami vanduo ir acetonitrilas arba metanolis [31, 74]. Metodikos vystymo eksperimentų metu nustatėme, kad, chromatografiniam skirstymui taikant kolonėlę „YMC-Pack ODS-A“ C₁₈ (250×4,6 mm, 5 μm), ir, kaip judrią fazę

naudojant vandens – acetonitrilo mišinį, pasiekiamas geresnis analičių atskyrimas nei naudojant mišinį vanduo – metanolis.

Eliuentų parūgštinimas sumažina fenolinių junginių hidroksilo grupių jonizaciją, o tai mažina smailių asimetriją ir pagerina analičių atskyrimą [30, 88]. Siekiant optimizuoti chromatografinį skirstymą, naudoti šie eliuantai: 2 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalas vandenyje – 100 (v/v) acetonitrilas ir 0,1 proc. (v/v) trifluoracto rūgšties tirpalas vandenyje – 100 (v/v) acetonitrilas. Atlikę eksperimentus, nustatėme, kad geresnė skiriamoji geba pasiekama kaip eliuentą naudojant 2 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalą vandenyje – 100 (v/v) acetonitrilą. Ši judri fazė pasirinkta tolesniems tyrimams.

Obuolių ir obelų lapų ėminiuose nustatyti įvairių grupių fenoliniai junginiai (kvercetino glikozidai, flavan-3-oliai, fenolinės rūgštys, dihidrochalconai). Ėminio matricos kompleksiškumas apsunkina tiriamųjų junginių atskyrimą, todėl, siekiant gauti geresnę skiriamąją gebą, optimizuotas gradientinis eliuavimas. Pritaikius 2.2 poskyryje aprašytą gradiento kitimą, pavyko efektyviai išskirti obuolių ir obelų lapų flavonoidų ir fenolinių rūgščių kompleksą. Fenolinių junginių standartų mišinio, obuolių bei obelų lapų ekstraktų pavyzdžiuose visų tiriamųjų analičių smailių skiriamoji geba buvo didesnė nei 2. Obuolių ėminio etanolinio ekstrakto chromatogramos, atskleidžiančios fenolinių junginių komplekso skirstymą, pateikiamos 3.1.2.1 pav.



1 – Procianidinas B1, 2 – (+)-katechinas, 3 – chlorogeno rūgštis, 4 – procianidinas B2, 5 – (–)-epikatechinas, 6 – rutinas, 7 – hiperozidas, 8 – izokvercitrinas, 9 – avikuliarinas, 10 – kvercitrinas, 11 – floridzinas.

3.1.2.1 pav. Obuolių ėminio etanolinio ekstrakto ESC chromatogramos (veislė 'Aldas', a) $\lambda=280$ nm, b) $\lambda=360$ nm)

ESC metodikos validacija. Metodikos validacijos žingsniai atlikti pagal Tarptautinės harmonizacijos Konferencijos rekomendacijas [10]. Vertinti šie validacijos parametrai: metodikos atrankumas (specifiškumas), rezultatų glaudumas, analičių aptikimo ir kiekinio nustatymo ribos bei tiesiškumas. ESC metodikos vystymo ir validacijos tyrimų rezultatai paskelbti straipsnyje „Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars“ (žr. Priedai).

Metodikos atrankumo (smailių identifikavimo ir grynumo) vertinimas atliktas lyginant analičių sulaikymo laikus ir UV absorbcijos spektrus su etaloninių junginių sulaikymo laikais ir spektrinėmis charakteristikomis. Identifikuotų junginių tapatybė patvirtinta priedo metodu, į analizuojamąjį ekstraktą pridėjus etaloninio junginio, stebint smailės formos ir spektrinių charakteristikų pokyčius. Apskaičiuotos tiriamųjų analičių aptikimo ribos reikšmės varijavo nuo 0,47 µg/ml iki 0,97 µg/ml, o kiekinio nustatymo ribos kito nuo 1,54 µg/ml iki 2,93 µg/ml. Visų analičių kalibravimo grafikų regresijos koeficientai (R^2) buvo didesni nei 0,999, tai patvirtina optimizuotos ESC metodikos tiesiškumą (3.1.2.1 lentelė). Gauti rezultatai įrodo, kad, naudojant šią metodiką, galima atlikti fenolinių junginių kiekinį įvertinimą.

3.1.2.1 lentelė. *Identifikuotų fenolinių junginių kalibracinių grafikų lygtys, regresijos koeficientai, nustatymo ir aptikimo ribos*

Junginys	Įrodytas tiesiškumo intervalas, µg/ml	Kalibracinio grafiko lygtis	R^{2a}	AR ^b , µg/ml	NR ^c , µg/ml
Procianidinas B1	6,25–100	$Y = 7,33 \times 10^3x + 5,49 \times 10^3$	0,9998	0,87	2,64
(+)-Katechinas	5–80	$Y = 7,00 \times 10^3x - 1,87 \times 10^3$	0,9999	0,73	2,20
Chlorogeno rūgštis	6,25–100	$Y = 2,68 \times 10^4x - 3,02 \times 10^4$	0,9999	0,97	2,93
Procianidinas B2	6,25–100	$Y = 5,58 \times 10^3x + 7,15 \times 10^3$	0,9998	0,92	2,86
Kavos rūgštis	6,25–100	$Y = 5,35 \times 10^4x - 4,55 \times 10^4$	0,9999	0,93	2,82
(-)-Epikatechinas	5–80	$Y = 7,53 \times 10^3x + 1,19 \times 10^2$	0,9999	0,73	2,22
Rutinas	3,125–50	$Y = 1,47 \times 10^4x - 7,66 \times 10^3$	0,9998	0,92	2,79
Hiperozidas	5–80	$Y = 2,23 \times 10^4x - 1,01 \times 10^4$	0,9999	0,80	2,42
Izokvercitrinas	3,125–50	$Y = 2,66 \times 10^4x - 2,10 \times 10^4$	0,9999	0,47	1,54
Avikuliarinas	3,125–50	$Y = 2,32 \times 10^4x - 1,12 \times 10^4$	0,9998	0,84	2,56
Kvercitrinas	2,5–40	$Y = 1,77 \times 10^4x - 5,57 \times 10^3$	0,9998	0,72	2,19
Floridzinas	3,125–50	$Y = 1,85 \times 10^4x - 7,09 \times 10^3$	0,9998	0,79	2,40
Floretinas	3,125–50	$Y = 3,55 \times 10^4x + 4,35 \times 10^4$	0,9997	0,84	2,54

^a R^2 – Regresijos koeficientas; ^bAR – aptikimo riba; ^cNR – nustatymo riba.

ESC metodikos glaudumas vertintas pagal du parametrus: pakartojamumą ir tarpinį preciziškumą. Rezultatų pakartojamumui įvertinti atliktos šešios trijų skirtingų koncentracijų standartų mišinio analizės. Pagal smailės plotą apskaičiuotas metodikos pakartojamumo variacijos koeficientas įvairavo nuo 1,22 proc. (chlorogeno rūgštis) iki 1,52 proc. ((-)-epikatechinas). Rezultatų tarpinis preciziškumas apskaičiuotas iš per tris skirtingas dienas atliktų analizių rezultatų (šešios vidutinės koncentracijos standartų mišinio analizės atliktos per tris skirtingas dienas, iš viso 18 analizių), jo variacijos koeficientas kito nuo 1,45 proc. (chlorogeno rūgštis) iki 2,76 proc. (floridzinas) smailės plotui. Atlikta liofilizuotų obuolių ir obelių lapų ėminių ekstrakcija po ekstrakcijos. Iš to paties liofilizuotų obuolių ar obelių lapų ėminio pagaminti šeši etanoliniai ekstraktai, kurie tirti taikant mūsų išvystytą ir optimizuotą ESC metodiką. Obuolių ėminių ekstraktų variacijos koeficientas neviršijo 3,92 proc., obelių lapų ekstraktų – 3,87 proc. smailės plotui. Gauti rezultatai, apibūdinantys mūsų išvystytos ESC metodikos glaudumą, pateikti 3.1.2.2 lentelėje.

3.1.2.2 lentelė. ESC metodikos glaudumo parametrų reikšmės

Junginys	Variacijos koeficientas (proc.) smailės plotui			
	Analizė po analizės ^a	Diena po dienos ^b	Ekstrakcija po ekstrakcijos (obuoliai)	Ekstrakcija po ekstrakcijos (obelų lapai)
Procianidinas B1	1,32	2,39	3,77	Nenustatyta
(+)-Katechinas	1,49	2,26	3,56	3,61
Chlorogeno rūgštis	1,22	1,45	3,47	3,36
Procianidinas B2	1,40	2,51	2,42	Nenustatyta
Kavos rūgštis	1,38	2,08	Nenustatyta	2,53
(-)-Epikatechinas	1,52	2,35	3,92	3,81
Rutinas	1,37	2,44	2,71	2,58
Hiperozidas	1,38	2,61	2,77	2,82
Izokvercitrinas	1,26	2,07	2,36	2,45
Avikuliarinas	1,42	2,60	2,52	2,70
Kvercitrinas	1,46	2,54	3,27	2,96
Floridzinas	1,48	2,76	3,61	3,87
Floretinas	1,45	2,56	Nenustatyta	3,42

^aPakartojamumas; ^btarpinis preciziškumas.

Apibendrinant ESC metodikos optimizavimo ir validacijos rezultatus, galima teigti, kad išvystyta metodika yra tinkama *Malus domestica* Borkh. obuolių ir obelių lapų ekstraktų bei iš jų pagamintų fitopreparatų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties analizei atlikti. Gauti validacijos parametrų (atrankumo, glaudumo, tiesiškumo) įverčiai patvirtina metodikos tinkamumą analizei. Ši metodika taikyta tolesniuose tyrimuose, tiriant Lietuvos klimato sąlygomis auginamų skirtingų veislių obuolių ir obelių lapų ekstraktų kokybinę ir kiekinę sudėtį.

3.2. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties Lietuvoje auginamų veislių obuoliuose ir obelių lapuose įvairavimas

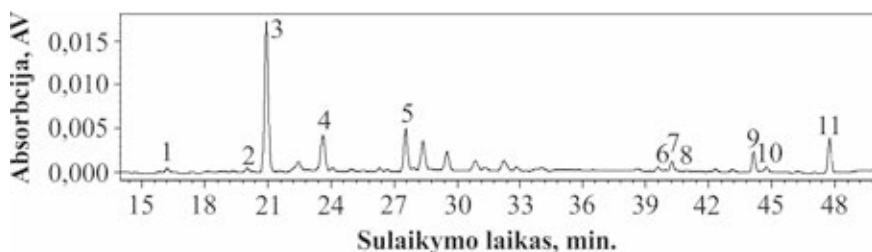
Augalų heterogeniškumas labai paplitęs ir naudojamas sodo ir vaistinių augalų atrankai bei vaistinių augalinių žaliavų kokybės vertinimui. Dauge-liui vaistinių augalų, vaismedžių, vaiskrūmių rūšių būdinga tarprūšinė ir vidurūšinė cheminė įvairovė, kurios tyrimas ir įvertinimas yra labai svarbus. Cheminės įvairovės tyrimai įrodo kokybinės ir kiekinės veikliųjų medžiagų sudėties įvairavimą tarp rūšių, veislių, augalo dalių ir tarp tos pačios rūšies skirtingų augalų.

Fitocheminė analizė leidžia nustatyti ir vertinti augalų rūšių ar veislių chemotaksonominius žymenis, o tai svarbu taksonominėje klasifikacijoje, įteisinant, apibūdinat ir atskiriant kultūrinių augalų veisles, užtikrinant svei-ko, biologiškai aktyvių junginių turtingo ir saugaus maisto kokybę bei patei-kimą vartotojui.

3.2.1. Obuolių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai

Skirtingų veislių obelių vaisių cheminė sudėtis gali labai įvairuoti [24, 67, 137], todėl svarbu nustatyti Lietuvos klimato sąlygomis auginamų veis-lių obuolių kokybinę ir kiekinę sudėtį.

Pritaikę mūsų išvystytą ir validuotą ESC metodiką, atlikome 2012 metų derliaus 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' ir 'Rajka' veislių obuolių ėminių analizę. Suminis tirtų veislių obuolių ėminių ekstraktuose nustatytų fenolinių junginių kiekis įvairavo nuo 2,209 mg/g (veislė 'Connel Red') iki 5,817 mg/g (veislė 'Aldas'). Tirtuose ekstraktuose identifikuoti ir kiekiškai įvertinti šie skirtingų grupių fenoliniai junginiai: procianidinas B1, (+)-katechinas, chlorogeno rūgštis, procianidinas B2, (–)-epikatechinas, rutinas, hiperozidas, izokvercitrinas, avikuliarinas, kvercitrinas ir floridzinas (sino-nimas florizinas). Obuolių ėminio chromatograma pateikiama 3.2.1.1 pav.



1 – Procianidinas B1, 2 – (+)-katechinas, 3 – chlorogeno rūgštis, 4 – procianidinas B2, 5 – (–)-epikatechinas, 6 – rutinas, 7 – hiperozidas, 8 – izokvercitrinas, 9 – avikuliarinas, 10 – kvercitrinas, 11 – floridzinas

3.2.1.1 pav. *Obuolių ėminio etanolinio ekstrakto chromatograma* ($\lambda=280\text{ nm}$, veislė 'Lodel')

Didžiausias suminis kvercetino glikozidų kiekis $0,731\pm0,015\text{ mg/g}$ nustatytas 'Aldas' veislės obuolių ėminiuose. Jis buvo 1,95 karto didesnis už mažiausią suminį kvercetino glikozidų kiekį ($0,375\pm0,008\text{ mg/g}$), nustatytą 'Auksis' veislės obuolių ėminiuose. Kvercetino glikozidai sudarė 7,99–23,54 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio (3.2.1.2 pav.).

Hiperozidas buvo vyraujantis kvercetino glikozidų grupės junginys 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol' ir 'Lodel' veislių obuolių ėminiuose. Jis sudarė 26,10–38,94 proc. visų identifikuotų ir kiekiškai įvertintų kvercetino glikozidų grupės junginių kiekio. Van der Sluis ir kt. nurodo panašias hiperozido kiekinės sudėties variavimosi tendencijas. Šių autorių tirtų veislių ėminiuose hiperozidas sudarė 23–33 proc. visų nustatytų kvercetino glikozidų kiekio [132]. Iš tirtų veislių savo sudėtimi išsiskyrė 'Rajka' veislės obuolių ėminiai, kuriuose dominavo kvercitrinas. Jo kiekis buvo 1,66 karto didesnis už šios veislės obuolių ėminiuose nustatytą hiperozido kiekį. Visų tirtų veislių obuolių ėminių ekstraktams būdingas kvercetino glikozidų rutino-hiperozido-izokvercitrino tripletas, kuriame visada dominuoja hiperozidas, o rutino kiekiai yra mažiausi. Šis dėsningumas nustatytas ir kitų mokslininkų darbuose [82, 106, 116].

Rutino-hiperozido-izokvercitrino kiekių santykis skirtingų veislių obuolių ėminiuose skiriasi. Jis varijuoja nuo 1:5,1:1,6 (veislė 'Connel Red') iki 1:11,9:1,2 (veislė 'Lodel'). Obuolių ėminiuose nustatytų kvercetino glikozidų grupės junginių kiekinė sudėtis pateikta 3.2.1.1 lentelėje.

Obuolių ėminiuose nustatyti katechinų grupės junginiai – (+)-katechinas ir (–)-epikatechinas. Didžiausias suminis identifikuotų katechinų kiekis ($0,970\pm0,018\text{ mg/g}$) nustatytas 'Lodel' veislės obuolių ėminiuose. Jis buvo 2,82 karto didesnis už mažiausią jų kiekį ($0,344\pm0,007\text{ mg/g}$), nustatytą 'Ligol' veislės obuolių ėminiuose. Suminis katechinų kiekis sudarė

11,21–21,54 proc. visų tirtų veislių obuolių ėminiuose nustatytų fenolinių junginių kiekio (3.2.1.2 pav.).

Literatūroje nurodoma, kad (–)-epikatechino kiekiai obuoliuose yra didesni nei (+)-katechino [33, 58, 95, 139], tai patvirtina ir mūsų atliktų tyrimų rezultatai. (–)-epikatechinas sudarė 81,26–95,64 proc. visų nustatytų katechinų grupės junginių kiekio. Panašius rezultatus pateikia Van der Sluis ir kt. Šie autoriai nurodo, kad (–)-epikatechinas sudaro 93–94 proc. visų identifikuotų katechinų grupės junginių kiekio [132]. Skirtingų veislių ėminiuose (+)-katechino ir (–)-epikatechino santykis įvairuoja nuo 1:4,3 (veislė 'Rajka') iki 1:21,9 (veislė 'Lodel'). Lenkijoje auginamų obuolių ėminiuose Wojdyło ir kt. nurodomi (+)-katechino kiekiai įvairuoja nuo 0,010 iki 0,720 mg/g, o (–)-epikatechino – nuo 0,066 iki 2,760 mg/g [137]. Obuolių kiekinės sudėties įvairavimui įtakos turi įvairūs faktoriai: dirvos geocheminė sudėtis, geografinė padėtis [9, 32, 33, 84], klimato, meteorologinės [77], obelų kultivavimo [87] ir vaisių laikymo sąlygos [54, 132].

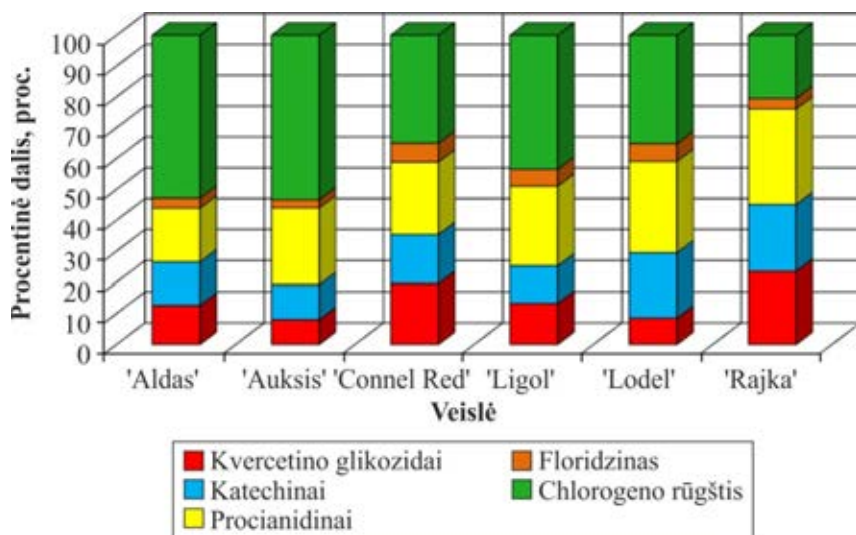
Obuolių ekstraktuose identifikuoti oligomerinių procianidinių grupės junginiai – procianidinas B1 ir procianidinas B2. Didžiausias suminis šių junginių kiekis ($1,373 \pm 0,028$ mg/g) nustatytas 'Lodel' veislės obuolių ėminiuose. Jis buvo 2,65 karto didesnis už mažiausią suminį identifikuotų procianidinių kiekį ($0,519 \pm 0,009$ mg/g), nustatytą 'Connel Red' veislės obuolių ėminiuose. Oligomerinių procianidinių grupės junginiai sudarė 17,38–31,03 proc. kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio (3.2.1.2 pav.). Visų tirtų veislių obuolių ėminiuose nustatyti procianidino B2 kiekiai buvo didesni už procianidino B1. Tokias šių junginių kiekinės sudėties variavimosi tendencijas obuoliuose nurodo ir kiti mokslininkai [34, 129]. Procianidino B1 ir B2 kiekių santykis skirtingų veislių ėminiuose kito nuo 1:5,4 (veislė 'Aldas') iki 1:13,8 (veislė 'Connel Red').

Dihidrochalkonų grupės junginių kokybinė ir kiekinė analizė yra labai svarbi, nes šios grupės junginiai gali būti pasirenkami kaip chemotaksonominiai žymenys obelų rūšių taksonomijoje, obuolių produktams identifikuoti, obuolių sulčių ir sidrų kokybei nustatyti [3, 46, 114, 116]. Tirtų veislių obuolių ėminiuose nustatyto dihidrochalkono floridzino kiekis įvairavo nuo 0,101 mg/g (veislė 'Rajka') iki 0,268 mg/g (veislė 'Lodel'). Tai sudarė 2,64–6,13 proc. visų obuolių ėminiuose identifikuotų fenolinių junginių kiekio. Panašius duomenis pateikia ir kitų autorių skelbiami tyrimų rezultatai – obelų vaisiuose nustatytas floridzino kiekis sudaro 2–6 proc. visų kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio [46, 129].

Chlorogeno rūgštis vyraavo visų tirtų veislių obuoliuose, išskyrus 'Rajka' veislės obuolių ėminius. Šios veislės obuolių ėminiuose dominavo procianidinas B2. Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis ($3,074 \pm 0,068$ mg/g) nu-

statytas 'Aldas' veislės obuolių ėminiuose. Jis buvo 4,99 kartus didesnis už mažiausią šios rūgšties kiekį ($0,616 \pm 0,011$ mg/g), nustatytą 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose. Wojdyło ir kt., tyrę Lenkijoje auginamus obuolių ėminius, nurodo panašius šios rūgšties kiekius ($0,015$ – $2,960$ mg/g) [137].

Svarbu palyginti ne tik identifikuotų fenolinių junginių kiekinę sudėtį, bet ir jų kiekių santykį tarp tirtų veislių obuolių ėminių. Šis požymis gali būti svarbus rodiklis, siekiant geriau suprasti fenolinių junginių kaupimosi dėsninumus, jų varijavimą tarp skirtingų veislių obuolių bei klasifikuojant obelų veisles. Įvertinus identifikuotų fenolinių junginių grupių procentinės dalies įvairavimą skirtingų veislių obuolių ėminiuose, gauti rezultatai pateikti 3.2.1.2 pav. Jie patvirtina Ceymann ir kt. iškeltą hipotezę, kad obelų veislės gali būti skirstomos, atsižvelgiant į tai, kokių grupių junginiai – fenolinės rūgštys ar flavan-3-oliai – dominuoja šių veislių obuolių ėminiuose [24]. 'Aldas', 'Auksis', 'Ligol' veislių obuolių ėminiuose vyraavo chlorogeno rūgštis, o 'Connel Red', 'Lodel' ir 'Rajka' obuolių ėminiuose – flavan-3-olių grupės junginiai.



3.2.1.2 pav. *Fenolinių junginių procentinės dalies įvairavimas skirtingų veislių obuolių ėminiuose*

Fenolinių junginių kiekinės sudėties varijavimo tarp skirtingų veislių obuolių ėminių įvertinimui apskaičiuoti variacijos koeficientai, atspindintys kiekvieno junginio variacijos amplitudę. Jie įvairavo nuo 31,10 proc. iki 59,41 proc. (3.2.1.1 ir 3.2.1.2 lentelės). Didžiausias variacijos koeficientas apskaičiuotas chlorogeno rūgščiai, mažiausias – hiperozidui.

3.2.1.1 lentelė. Kvercetino glikozidų kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose

Junginys	Kvercetino glikozidų kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
Hiperozidas	0,274±0,005 ^a	0,138±0,002 ^{c,d}	0,152±0,003 ^c	0,129±0,002 ^d	0,154±0,003 ^c	0,184±0,004 ^b	31,10
Izokvercitrinas	0,053±0,002 ^a	0,020±0,001 ^{c,d}	0,047±0,002 ^{a,b}	0,025±0,001 ^c	0,016±0,001 ^d	0,044±0,002 ^b	45,92
Rutinas	0,036±0,001 ^a	0,015±0,001 ^{b,c}	0,030±0,002 ^a	0,022±0,001 ^b	0,013±0,001 ^c	0,035±0,002 ^a	39,69
Avikuliarinas	0,226±0,005 ^a	0,120±0,002 ^c	0,099±0,001 ^{d,e}	0,087±0,001 ^e	0,114±0,002 ^{c,d}	0,139±0,003 ^b	38,15
Kvercitrinas	0,142±0,003 ^b	0,082±0,001 ^e	0,103±0,002 ^{c,d}	0,120±0,003 ^c	0,098±0,001 ^{d,e}	0,305±0,007 ^a	58,30

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių ėminių ($p<0,05$).

3.2.1.2 lentelė. Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose

Junginys	Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
(+)-Katechinas	0,092±0,002 ^b	0,077±0,002 ^c	0,034±0,001 ^d	0,033±0,001 ^d	0,042±0,001 ^d	0,121±0,003 ^a	54,26
(-)-Epikatechinas	0,720±0,015 ^b	0,448±0,009 ^d	0,315±0,006 ^e	0,311±0,004 ^e	0,928±0,019 ^a	0,525±0,010 ^c	44,86
Procianidinas B1	0,157±0,003 ^a	0,170±0,004 ^a	0,035±0,001 ^d	0,064±0,001 ^c	0,094±0,002 ^b	0,097±0,002 ^b	50,84
Procianidinas B2	0,854±0,017 ^c	0,990±0,021 ^b	0,484±0,007 ^e	0,676±0,014 ^d	1,279±0,023 ^a	0,834±0,015 ^c	31,81
Floridzinas	0,188±0,004 ^b	0,124±0,002 ^d	0,135±0,002 ^d	0,157±0,003 ^c	0,268±0,005 ^a	0,101±0,002 ^e	36,82
Chlorogeno rūgštis	3,074±0,068 ^a	2,498±0,052 ^b	0,773±0,013 ^e	1,249±0,020 ^d	1,629±0,035 ^c	0,616±0,011 ^e	59,41

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių ėminių ($p<0,05$).

Atlikus liofilizuotų obuolių ėminių etanolinių ekstraktų analizę nustatyta, kad fenolinių junginių kiekis skirtingų veislių obuolių ėminiuose varijuoja. Tyrimų rezultatai patvirtina kitų mokslininkų teiginius apie veislės faktoriaus įtakos svarbą obuolių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimui [24, 82, 98]. 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol' ir 'Lodel' obuolių ėminiuose tarp identifikuotų fenolinių junginių vyraujantis komponentas yra chlorogeno rūgštis, 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose – procianidinas B2. Tarp identifikuotų kvercetino glikozidų 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose dominavo kvercitrinas, kitų veislių ėminiuose – hiperozidas.

3.2.2. Obuolių veislių luobelių ir minkštimų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas

Literatūros šaltinių duomenimis, obuolių minkštimų ir luobelių fitocheminė sudėtis skiriasi [82, 129]. Siekiant nustatyti Lietuvos klimato sąlygomis auginamų veislių obuolių cheminės sudėties įvairavimą, tikslinga atlikti atskirų vaisiaus dalių – luobelių ir minkštimų – fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę analizę. Gautos žinios leis plačiau panaudoti obuolių luobeles ir minkštimus maisto pramonėje ir sveikatinimo tikslams – maisto papildų, arbatų ir kitų preparatų gamybai.

3.2.2.1. Obuolių luobelių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai

Atlikus 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' ir 'Rajka' veislių obuolių luobelių ėminių etanolinių ekstraktų kokybinės ir kiekinės sudėties analizę ESC metodu, suminis nustatytų fenolinių junginių kiekis liofilizuotų obuolių luobelių ėminiuose įvairavo nuo 2,778 mg/g (veislė 'Ligol') iki 6,055 mg/g (veislė 'Aldas'). Gausiausią identifikuotų junginių grupę sudarė kvercetino glikozidai. Obuolių luobelių ėminiuose suminis jų kiekis įvairavo nuo 0,667 mg/g (veislė 'Auksis') iki 1,775 mg/g (veislė 'Aldas'). Tai sudarė 14,38–42,71 proc. visų ESC metodu nustatytų fenolinių junginių kiekio. Panašios šios grupės junginių įvairavimo tendencijos nustatytos ir kitų mokslininkų. Marks ir kt. nurodo, kad jų tirtų įvairių veislių obuolių luobelių ėminiuose kvercetino glikozidai sudaro 9–42 proc. ESC metodu kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio [82]. Tsao ir kt. skelbia, kad kvercetino glikozidai sudarė 17,9 proc. visų obuolių luobelių ėminiuose nustatytų junginių kiekio [129].

'Aldas', 'Connel Red', 'Ligol' ir 'Lodel' tirtų veislių obuolių luobelių ėminiuose hiperozidas buvo vyraujantis kvercetino glikozidų grupės junginys. 'Auksis' veislės obuolių luobelių ėminiuose dominavo hiperozidas ir avikuliarinas. Panašias kvercetino glikozidų kiekinio įvairavimo tendencijas

nurodo ir kiti autoriai [3]. Išimtis buvo 'Rajka' veislės obuolių luobelų ėminiai, kuriuose vyraavo kvercitrinas. Jis sudarė net 55,13 proc. visų šios veislės obuolių luobelų ėminiuose kiekiškai įvertintų kvercetino glikozidų kiekio. Didžiausias hiperozido kiekis ($0,646 \pm 0,012$ mg) nustatytas 'Aldas' veislės obuolių luobelų ėminiuose ir buvo 2,79 karto didesnis už mažiausią jo kiekį ($0,231 \pm 0,004$ mg/g), nustatytą 'Auksis' veislės obuolių luobelų ėminiuose. Hiperozidas sudarė nuo 23,25 proc. (veislė 'Rajka') iki 38,22 proc. (veislė 'Ligol') visų identifikuotų ir kiekiškai įvertintų kvercetino glikozidų kiekio. Rutino-hiperozido-izokvercitrino kiekių santykis tirtų veislių obuolių luobelų ėminiuose įvairavo nuo 1,0:5,3:1,3 (veislė 'Connel Red') iki 1,0:16,0:1,1 (veislė 'Lodel'). Visų obuolių luobelų ėminiuose identifikuotų ir kiekiškai įvertintų individualių kvercetino glikozidų kiekinė sudėtis pateikta 3.2.2.1.1 lentelėje.

Obuolių luobelų ėminiuose nustatytų katechinų grupės junginių – (+)-katechino ir (–)-epikatechino – suminis kiekis varijavo nuo 0,334 mg/g (veislė 'Ligol') iki 0,915 mg/g (veislė 'Aldas'). Awad ir de Jager, tyrusių 'Jonagold' ir 'Elstar' veislių luobelų ėminius, nurodomi suminiai šios grupės junginių kiekiai panašūs į mūsų nustatytus. Šių autorių nustatyti katechinų grupės junginių kiekiai įvairuoja nuo 0,35 mg/g iki 0,81 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [8].

Tirtų veislių obuolių luobelų ėminiuose katechinų grupės junginiai sudarė 12,01–21,51 proc. visų identifikuotų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.1.1 pav.). Panašius katechinų grupės kiekinės sudėties dėsningumus nurodo Tsao ir kt. Šių autorių pateikiamais tyrimų duomenimis katechinai sudaro 22,5 proc. visų identifikuotų fenolinių junginių kiekio [129].

Obuolių luobelų ėminiuose nustatytas (–)-epikatechino kiekis buvo didesnis už (+)-katechino, jis sudarė 85,25–91,04 proc. visų kiekiškai įvertintų katechinų grupės junginių kiekio. Didžiausias (–)-epikatechino kiekis ($0,806 \pm 0,018$ mg/g) nustatytas 'Aldas' veislės obuolių luobelų ėminiuose. Jis buvo 2,84 karto didesnis už (–)-epikatechino kiekį ($0,284 \pm 0,005$ mg/g), nustatytą 'Ligol' veislės obuolių luobelų ėminiuose (3.2.2.1.2 lentelė). Priklausomai nuo veislės (+)-katechino ir (–)-epikatechino kiekių santykis obuolių luobelų ėminiuose įvairuoja nuo 1,0:5,8 (veislė 'Auksis') iki 1,0:10,2 (veislė 'Connel Red'). Alonso-Salces ir kt. nurodomi (–)-epikatechino kiekiai 4–24 kartus didesni už (+)-katechino [3].

3.2.2.1.1 lentelė. Kvercetino glikozidų kiekinės sudėties įvairavimas obuolių luobelų ėminiuose

Junginys	Kvercetino glikozidų kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
Hiperozidas	0,646±0,012 ^a	0,231±0,004 ^e	0,560±0,010 ^b	0,428±0,007 ^c	0,395±0,005 ^{c,d}	0,358±0,008 ^d	33,89
Izokvercitrinas	0,089±0,002 ^b	0,040±0,001 ^d	0,135±0,003 ^a	0,056±0,002 ^c	0,026±0,001 ^e	0,042±0,001 ^d	62,74
Rutinas	0,079±0,003 ^b	0,020±0,001 ^e	0,106±0,003 ^a	0,049±0,002 ^c	0,025±0,001 ^{d,e}	0,034±0,002 ^d	64,90
Avikuliarinas	0,584±0,012 ^a	0,227±0,005 ^d	0,373±0,008 ^b	0,255±0,005 ^d	0,329±0,006 ^c	0,257±0,004 ^d	39,22
Kvercitrinas	0,377±0,007 ^b	0,149±0,003 ^d	0,348±0,008 ^b	0,332±0,005 ^{b,c}	0,289±0,006 ^c	0,849±0,018 ^a	61,03

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių luobelų ėminių ($p<0,05$).

3.2.2.1.2 lentelė. Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino sudėties įvairavimas obuolių luobelų ėminiuose

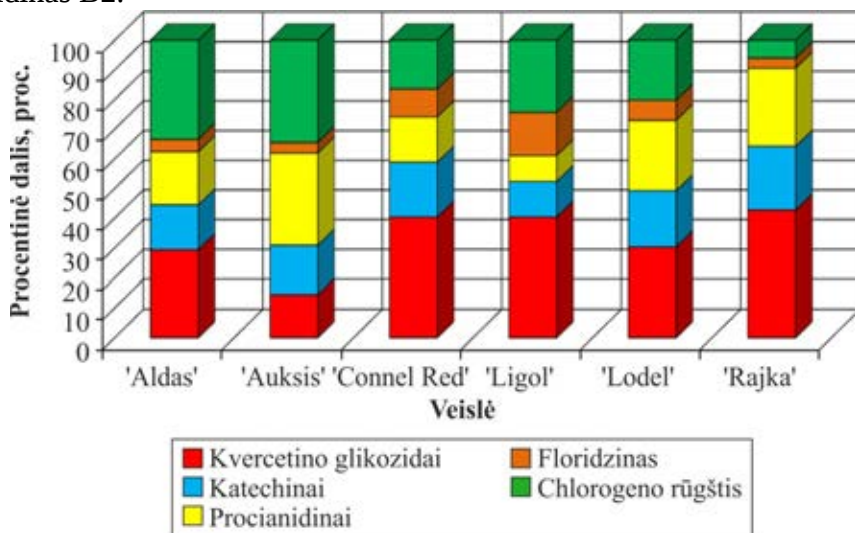
Junginys	Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
(+)-Katechinas	0,109±0,002 ^a	0,097±0,001 ^b	0,062±0,002 ^e	0,049±0,001 ^f	0,073±0,002 ^d	0,085±0,001 ^c	28,16
(-)-Epikatechinas	0,806±0,018 ^a	0,668±0,014 ^b	0,635±0,012 ^{b,c}	0,284±0,005 ^d	0,592±0,011 ^c	0,691±0,015 ^b	28,79
Procianidinas B1	0,120±0,002 ^b	0,222±0,004 ^a	0,053±0,001 ^e	0,030±0,001 ^f	0,082±0,002 ^d	0,105±0,003 ^c	66,08
Procianidinas B2	0,967±0,021 ^b	1,219±0,027 ^a	0,524±0,010 ^d	0,214±0,004 ^e	0,750±0,015 ^c	0,845±0,017 ^c	46,54
Floridzinas	0,252±0,004 ^c	0,164±0,003 ^d	0,356±0,007 ^b	0,403±0,008 ^a	0,237±0,005 ^c	0,124±0,002 ^e	33,36
Chlorogeno rūgštis	2,025±0,038 ^a	1,600±0,029 ^b	0,621±0,013 ^c	0,677±0,011 ^c	0,712±0,016 ^c	0,217±0,003 ^d	70,30

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių luobelų ėminių ($p<0,05$).

Obuolių luobelių ėminiuose nustatytas floridzino kiekis įvairavo nuo 0,124 mg/g (veislė 'Rajka') iki 0,403 mg/g (veislė 'Ligol'). Tai sudarė 3,43–14,52 proc. visų kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.1.1 pav.). Awad ir de Jager nurodomi floridzino kiekiai didesni už mūsų nustatytus. Jie varijuoja nuo 0,75 iki 1,10 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [8]. Tsao ir kt. nurodo, kad obuolių luobelių ėminiuose floridzinas sudaro 4,5 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio [127].

Chlorogeno rūgštis sudarė 6,03–34,50 proc. visų obuolių luobelių ėminiuose identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.1.1 pav.). Nustatyti šios rūgšties kiekiai įvairavo nuo 0,217 mg/g ('Rajka') iki 2,025 mg/g (veislė 'Aldas'). Awad ir de Jager, tyrę obuolių luobelių ėminius, nurodo mažesnius chlorogeno rūgšties kiekius – 0,03–0,24 mg/g [8].

Ištyrus obuolių luobelių fenolinių junginių sudėties įvairavimą, nustatyti šių junginių kiekinės sudėties skirtumai tarp tirtų veislių obuolių luobelių ėminių. Chlorogeno rūgštis dominavo 'Aldas', 'Auksis' ir 'Ligol' veislių obuolių luobelių ėminiuose. 'Lodel' veislės obuolių luobelių ėminiuose vyraavo procianidinas B2, 'Connel Red' veislės ėminiuose – (–)-epikatechinas ir chlorogeno rūgštis, 'Rajka' veislės luobelių ėminiuose – kvercitrinas ir procianidinas B2.



3.2.2.1.1 pav. Fenolinių junginių procentinės dalies įvairavimas skirtingų veislių obuolių luobelių ėminiuose

Skirtingų veislių obuolių luobelų ėminiuose nustatytų fenolinių junginių kiekiai varijavo. Gautų rezultatų sklaidą nurodo apskaičiuoti variacijos koeficientai. Didžiausias variacijos koeficientas (70,30 proc.) apskaičiuotas chlorogeno rūgščiai, mažiausias (28,16 proc.) – (+)-katechinui.

3.2.2.2. Obuolių minkštųjų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai

Suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis obuolių minkštųjų ėminiuose varijavo nuo 2,297 mg/g (veislė 'Rajka') iki 4,546 mg/g (veislė 'Aldas'). Kvercetino glikozidai sudarė tik 1,40–4,24 proc. visų kiekiškai įvertintų obuolių minkštųjų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.2.1 pav.). Suminis nustatytų kvercetino glikozidų kiekis įvairavo nuo 0,080 mg/g (veislė 'Lodel') iki 0,122 mg/g (veislė 'Aldas'). Jis buvo 11,50–17,30 kartų mažesnis už obuolių luobelų ėminiuose nustatytą šių junginių kiekį. Mūsų tyrimų rezultatai patvirtina kitų mokslininkų tyrimų duomenis, kad obuolių minkštumuose sukaupiami ženkliai mažesni kvercetino glikozidų kiekiai nei luobelėse [82, 129]. Tirtų veislių obuolių minkštųjų ėminiuose rutinas neidentifikuotas. Visų obuolių minkštųjų ėminiuose nustatytų kvercetino glikozidų kiekinė sudėtis pateikta 3.2.2.2.1 lentelėje.

Suminis identifikuotų ir kiekiškai įvertintų katechinų kiekis obuolių minkštųjų ėminiuose varijavo nuo 0,454 mg/g (veislė 'Ligol') iki 1,086 mg/g (veislė 'Lodel') (3.2.2.2.2 lentelė). Tai sudarė 12,87–24,05 proc. visų identifikuotų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.2.1 pav.). Tirtų veislių obuolių minkštųjų ėminiuose nustatyti (–)-epikatechino kiekiai buvo didesni už (+)-katechino. Šis katechinų grupės kiekinės sudėties dėsningumas nurodomas ir kitų autorių [3, 27, 48, 140]. (+)-Katechino ir (–)-epikatechino kiekių santykis priklausomai nuo veislės faktoriaus įvairavo nuo 1,0:2,90 (veislė 'Auksis') iki 1,0:13,71 (veislė 'Lodel'). Didžiausias (–)-epikatechino kiekis ($1,012 \pm 0,022$ mg/g) nustatytas 'Lodel' veislės obuolių minkštųjų ėminiuose. Jis buvo 2,32 karto didesnis už mažiausią jo kiekį ($0,436 \pm 0,008$ mg/g), nustatytą 'Auksis' veislės obuolių minkštųjų ėminiuose (3.2.2.2.2 lentelė). Alonso-Salces ir kt. obuolių minkštųjų ėminiuose nustatyti (–)-epikatechino kiekiai įvairavo nuo 0,041 mg/g iki 0,770 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [3].

3.2.2.2.1 lentelė. Kvercetino glikozidų kiekinės sudėties įvairavimas obuolių minkštimų ėminiuose

Junginys	Kvercetino glikozidų kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
Hiperozidas	0,038±0,002 ^a	0,013±0,001 ^c	0,035±0,002 ^a	0,015±0,001 ^{b,c}	0,022±0,001 ^b	0,020±0,001 ^{b,c}	43,56
Izokvercitrinas	0,020±0,002 ^a	0,006±0,001 ^c	0,017±0,002 ^{a,b}	0,007±0,001 ^c	0,012±0,001 ^{b,c}	0,010±0,001 ^{b,c}	46,25
Avikuliarinas	0,035±0,002 ^a	0,020±0,001 ^c	0,031±0,002 ^{a,b}	0,025±0,001 ^{b,c}	0,023±0,001 ^{b,c}	0,028±0,002 ^{a,b,c}	20,29
Kvercitrinas	0,028±0,001 ^{b,c}	0,019±0,001 ^d	0,037±0,002 ^a	0,034±0,002 ^{a,b}	0,022±0,001 ^{c,d}	0,031±0,002 ^{a,b}	24,39

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių minkštimų ėminių ($p < 0,05$).

3.2.2.2.2 lentelė. Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino sudėties įvairavimas obuolių minkštimų ėminiuose

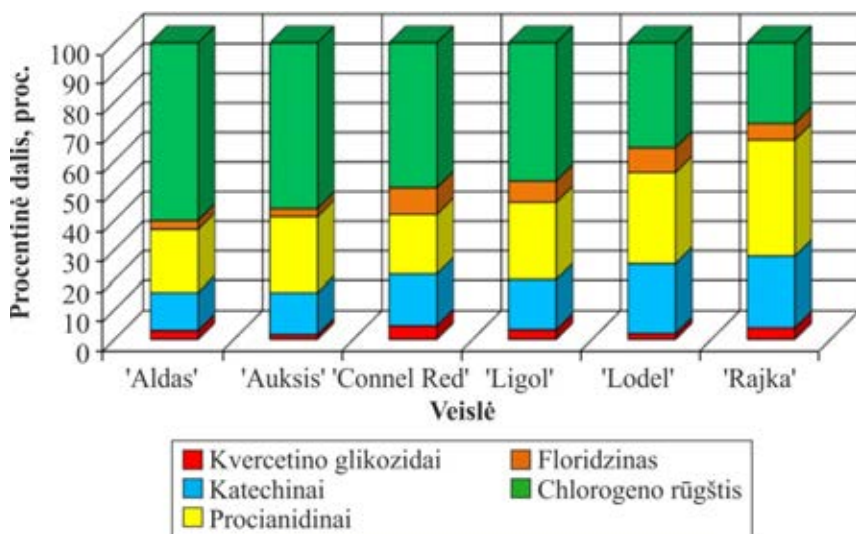
Junginys	Katechinų, procianidinų, chlorogeno rūgšties ir floridzino kiekis (mg/g, absoliučiai sausai žaliavai)						Variacijos koeficientas, proc.
	'Aldas'	'Auksis'	'Connel Red'	'Ligol'	'Lodel'	'Rajka'	
(+)-Katechinas	0,087±0,002 ^{b,c}	0,150±0,004 ^a	0,099±0,002 ^b	0,056±0,001 ^e	0,074±0,003 ^{c,d}	0,065±0,001 ^{d,e}	38,20
(-)-Epikatechinas	0,498±0,010 ^b	0,436±0,008 ^{b,c}	0,390±0,006 ^c	0,398±0,009 ^c	1,012±0,022 ^a	0,487±0,011 ^b	44,14
Procianidinas B1	0,122±0,003 ^b	0,174±0,004 ^a	0,028±0,001 ^f	0,052±0,001 ^e	0,069±0,002 ^d	0,101±0,003 ^c	57,99
Procianidinas B2	0,845±0,017 ^b	0,883±0,019 ^b	0,538±0,010 ^d	0,654±0,014 ^c	1,353±0,027 ^a	0,800±0,015 ^b	33,13
Floridzinas	0,133±0,003 ^d	0,110±0,002 ^e	0,254±0,005 ^b	0,195±0,004 ^c	0,389±0,008 ^a	0,129±0,002 ^d	52,61
Chlorogeno rūgštis	2,739±0,056 ^a	2,324±0,044 ^b	1,383±0,029 ^d	1,265±0,021 ^d	1,641±0,036 ^c	0,626±0,012 ^e	45,85

Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų veislių obuolių minkštimų ėminių ($p < 0,05$).

Oligomerinių procianidinių grupės junginiai – procianidinas B1 ir procianidinas B2 – sudarė 20,14–39,22 proc. visų obuolių minkštimų ėminiuose identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių (3.2.2.2.1 pav.). Suminis jų kiekis įvairavo nuo 0,566 mg/g iki 1,423 mg/g. Nustatyti procianidino B2 kiekiai buvo didesni už procianidino B1. Tokios šių junginių kiekinės sudėties įvairavimo tendencijos nurodomos ir kitų mokslininkų [17, 24, 129]. Zhang ir kt. pateikia skirtingus rezultatus – šių mokslininkų tirtų 'Honeycrisp' veislės prinokusių obuolių minkštimų ėminiuose nustatyti procianidino B1 kiekiai didesni už procianidino B2 [140]. Skirtumus galėjo lemti veislės, klimato, meteorologinių sąlygų ir kitų faktorių įtaka [77, 82]. Procianidino B1 ir procianidino B2 junginių kiekių santykis įvairių veislių obuolių minkštimų ėminiuose įvairavo nuo 1,0:5,1 (veislė 'Aukasis') iki 1,0:19,47 (veislė 'Lodel'). 'Lodel' veislės obuolių luobelinių ir minkštinių ėminiai išsiskiria iš kitų veislių dideliu flavan-3-olių grupės junginių kiekiu.

Didžiausias floridzino kiekis ($0,389 \pm 0,008$ mg/g) nustatytas 'Lodel' veislės obuolių minkštinių ėminiuose. Jis buvo 3,54 karto didesnis už mažiausią jo kiekį ($0,110 \pm 0,002$ mg/g), nustatytą 'Aukasis' veislės obuolių minkštinių ėminiuose (3.2.2.2.2 lentelė). Nustatytas floridzino kiekis sudarė 2,67–9,02 proc. visų identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių. Italų mokslininkai nurodo, kad floridzino kiekis obuolių minkštiniuose įvairuoja nuo 0,001 mg/g iki 0,263 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [17].

Tirtų veislių obuolių minkštinių ėminiuose chlorogeno rūgštis buvo vyraujantis komponentas. Išimtį sudarė 'Rajka' veislės obuolių minkštinių ėminiai, kuriuose dominavo procianidinas B2 (3.2.2.2.2 lentelė). Chlorogeno rūgštis sudarė 27,28–60,11 proc. visų obuolių minkštinių ėminiuose identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekio (3.2.2.2.1 pav.). Panašius rezultatus nurodo ir kiti mokslininkai [129]. Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis ($2,739 \pm 0,056$ mg/g), nustatytas 'Aldas' veislės obuolių minkštinių ėminiuose. Jis buvo 4,37 karto didesnis nei mažiausias šios rūgšties kiekis ($0,626 \pm 0,012$ mg/g), nustatytas 'Rajka' veislės obuolių minkštinių ėminiuose. Belviso ir kt. nurodomi chlorogeno rūgšties kiekiai įvairuoja nuo 0,130 mg/g iki 2,082 mg/g absoliučiai sausos žaliavos [17].



3.2.2.2.1 pav. Fenolinių junginių procentinės dalies įvairavimas obuolių minkštųjų ėminiuose

Apskaičiavus individualių junginių variacijos koeficientus nustatyta, kad tarp tirtų veislių obuolių minkštųjų ėminių labiausiai varijuoja procianidinas B1 (57,99 proc.), mažiausiai – avikuliarinas (20,29 proc.) (3.2.2.2.1 ir 3.2.2.2.2 lentelės).

Apibendrinant atliktų tyrimų duomenis, galima teigti, kad obuolių luobelių ir minkštųjų fenolinių junginių kiekinė sudėtis yra heterogeniška. Obuolių luobelių ėminiuose nustatyti ženkliai didesni kvercetino glikozidų kiekiai nei obuolių minkštumuose. Obuolių veislės faktorius turi įtakos fenolinių junginių kiekiniai sudėčiai, kuri varijuoja plačiose ribose. Didžiausi kvercetino glikozidų kiekiai sukaupiami 'Aldas' veislės obuolių luobelėse. 'Lodel' veislės obuolių minkštųjų ėminiuose nustatytas didelis katechinų ir oligomerinių procianidinų kiekis.

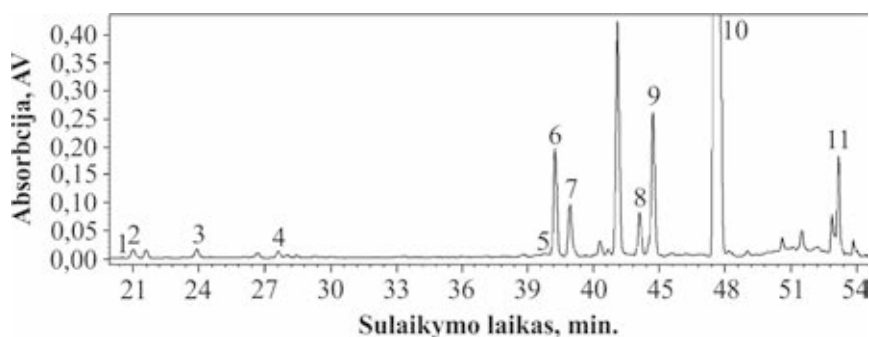
3.2.3. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas obelių lapų ėminiuose

Ištyrus obuoliuose kaupiamų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį, svarbu nustatyti ir kitų augalo organų fitocheminės sudėties įvairavimą. Fenolinių junginių cheminės sudėties tyrimai svarbūs siekiant geriau suprasti biologiškai aktyvių junginių kaupimosi dėsningumus bei įvertinti jų kokybės ir kiekio įvairavimą skirtinguose augalo organuose.

Dauguma iki šiol atliktų obelių lapų kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimų siejami su obelinio raupliagybio (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) sukeliama infekcija. Svarbu nustatyti Lietuvos klimato sąlygomis

auginamų veislių obelų lapų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį ir įvertinti galimybę panaudoti šią augalinę žaliavą praktinės medicinos poreikiams.

Pritaikę mūsų optimizuotą ir validuotą ESC metodiką, atlikome 'Aldas', 'Auksis', 'Ligol' ir 'Lodel' veislių obelų lapų ėminių ekstraktų kokybinę ir kiekinę analizę. Tirtuose ekstraktuose identifikuoti ir kiekiškai įvertinti šie fenoliniai junginiai: (+)-katechinas, chlorogeno rūgštis, kavos rūgštis, (–)-epikatechinas, rutinas, hiperozidas, izokvercitrinas, avikuliarinas, kvercitrinas, floridzinas, floretinas. Obelų lapų ėminio chromatograma pateikiama 3.2.3.1 pav.



- 1 – (+)-Katechinas, 2 – chlorogeno rūgštis, 3 – kavos rūgštis, 4 – (–)-epikatechinas,
5 – rutinas, 6 – hiperozidas, 7 – izokvercitrinas, 8 – avikuliarinas, 9 – kvercitrinas,
10 – floridzinas, 11 – floretinas.

3.2.3.1 pav. Obelų lapų ėminio etanolinio ekstrakto ESC chromatograma (veislė 'Aldas', $\lambda=280$ nm)

Tirtų veislių obelų lapų ėminiuose nustatytų fenolinių junginių kiekinės analizės rezultatai išsamiai išnagrinėti mūsų paskelbtame straipsnyje „Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves” (žr. Priedai). Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad obelų lapų ėminiuose vyrauja floridzinas. Mokslinėje literatūroje aprašytas floridzino antidiabetinis poveikis [83, 89], kuris paaiškinamas gliukozės absorbcijos ir resorbcijos blokavimu [75]. Floridzinas sudarė 76,9–84,2 proc. visų obelų lapų ėminiuose identifikuotų fenolinių junginių kiekio. Didžiausias šio junginio kiekis ($114,433 \pm 4,721$ mg/g) nustatytas 'Ligol' veislės obelų lapų ėminiuose. Tarp kvercetino glikozidų grupės junginių visų veislių obelų lapų ėminiuose dominavo kvercitrinas. Jo kiekiai tirtų veislių ėminiuose įvairavo nuo 7,770 mg/g (veislė 'Ligol') iki 13,364 mg/g (veislė 'Aldas'). Obelų lapų ėminiuose identifikuotų kvercetino glikozidų ir floridzino kiekiai didesni už nustatytus obuolių ėminiuose, chlorogeno rūgš-

ties – mažesni. Oligomerinių procianidinių grupės junginių – procianidino B1 ir procianidino B2 – obelų lapų ėminiuose neidentifikuota.

Gauti tyrimų rezultatai pateikia naujos informacijos apie Lietuvos klimato sąlygomis auginamų obelų lapų fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį. Jie galėtų būti pritaikyti planuojant individualių, savitu biologiniu poveikiu pasižyminčių fenolinių junginių, ypač floridzino, išskyrimą iš obelų lapų ėminių. Obelų lapai, floridziną kaupianti augalinė žaliava, atlikus išsamesnius mokslinius tyrimus, gali būti naudojama kuriant vaistinius preparatus ir maisto papildus. Šie produktai gali būti vertingi cukrinio diabeto profilaktikai bei mažinant kūno svorį.

3.2.4. Fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas skirtingų poskiepių obuolių ėminiuose

Pasauliniuose poskiepių tyrimuose akcentuojama jų svarba vaismedžio produktyvumui, derėjimo pradžiai, augumui, vaisių kokybei, derliui ir produktyvumui [2, 43, 44].

Trūksta tyrimų, įvertinančių poskiepio įtaką obuolių biologiškai aktyvių junginių kokybinei ir kiekiniai sudėčiai. Tikslinga atlikti išsamius Lietuvos klimatinėmis sąlygomis auginamų skirtingų poskiepių obuolių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus, nustatyti obelų poskiepius, kurie lemia didžiausią fenolinių junginių kiekį obuoliuose. Poskiepių įtakos obuolių kokybinės ir kiekinės sudėties palyginamiesiems tyrimams pasirinkti 'Ligol' veislės nykštukiniai (P 22, P 59, P 61 ir PB.4), žemaūgiai (M.9, P 62, P 66, P 67, B.396) poskiepai ir pusiaužemaūgis M.26 poskiepis. Rezultatai plačiau išnagrinėti mūsų paskelbtame straipsnyje „Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits” (žr. Priedai).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad tirtų poskiepių obuolių ėminiuose tarp identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių vyravo chlorogeno rūgštis ir procianidinas B2. Didžiausias skirtumas (apie 30 proc.) tarp 2011 ir 2012 metų derliaus obuolių suminio fenolinių junginių kiekio nustatytas M.9, Pure 1 ir P 66 poskiepių obuolių ėminiuose, mažiausias (mažiau kaip 10 proc.) – M.26 ir P 22 poskiepių obuolių ėminiuose.

Aiškių skirtumų tarp nykštukinių, žemaūgių ir pusiaužemaūgių poskiepių grupių nebuvo nustatyta. Didžiausi individualių fenolinių junginių kiekiai nustatyti nykštukinių P 61 ir P 22 poskiepių obuolių ėminiuose. Į šiuos poskiepius įskiepytos obelys yra perspektyvios platesniam auginimui Lietuvos soduose, siekiant pateikti vartotojui obuolius, kuriuose sukaupiami didžiausi fenolinių junginių kiekiai.

'Auksis' veislės poskiepių M.26, M.9, P 22, P 59, P 61, P 62, P 66, P 67, B.9, B.396, PB.4, Pure 1 obuolių ėminių askorbo rūgšties, bendro fenolinių

junginių kiekio, antiradikalinio aktyvumo ir titruojamojo rūgštingumo tyrimų rezultatai išsamiai išnagrinėti straipsnyje „Rootstocks affects apple fruit biochemical content: preliminary results“ (žr. Priedai).

3.3. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas *M. domestica* Borkh. vaisiuose ir lapuose vegetacijos periodo metu

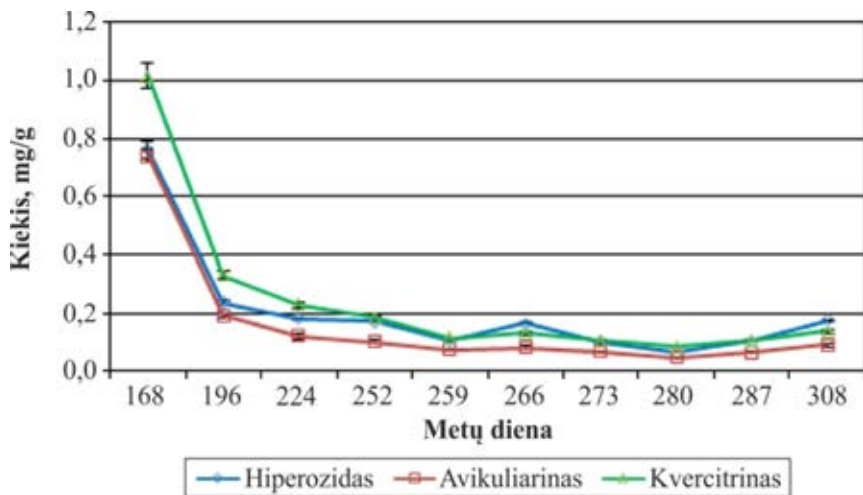
Augalo vegetacijos periodo metu antrinių metabolitų kiekinė sudėtis kinta. Priklausomai nuo fenologinio tarpsnio, klimato sąlygų šių junginių biosintezės procesai vienuose augalo organuose intensyvėja, kituose – sulėtėja. Norint geriau suprasti biologiškai aktyvių junginių kaupimosi dėsninumus, tikslinga atlikti augalų organų fitocheminės sudėties tyrimus keičiantis fenologiniams tarpsniams. Svarbu nustatyti optimalų augalinių žaliavų rinkimo laiką, išsiaiškinti kada sukaupiami didžiausi antrinių metabolitų kiekiai. Tokie tyrimai yra reikšmingi, norint gauti augalinę žaliavą su žinoma chemine sudėtimi, turtingą biologiškai aktyvių junginių, ir pateikti vartotojui geros kokybės produktus.

3.3.1. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obuoliuose vegetacijos periodo metu

Vystymosi ir nokimo metu obuoliuose vykstantys antrinių metabolitų kokybinės ir kiekinės sudėties pokyčiai lemia obuolių organoleptines savybes [140], turi įtakos jų biologiniam poveikiui. Lietuvos klimato sąlygos, lyginant su pagrindiniais obuolių auginimo regionais, pasižymi vėsesnėmis vasaromis, didesniais dienos ir nakties temperatūrų svyravimais, ankstesnėmis rudeninėmis šalnomis. Tai sąlygoja trumpesnį vegetacijos periodą, ankstyvesnį ir intensyvesnį obuolių nusipalvinimą [64, 65]. Svarbu ištirti Lietuvoje auginamų obuolių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu, palyginti gautus rezultatus su kitų mokslininkų skelbiamais tyrimų duomenimis, išsiaiškinti, kada obuoliuose sukaupiami didžiausi flavonoidų ir fenolinių rūgščių kiekiai.

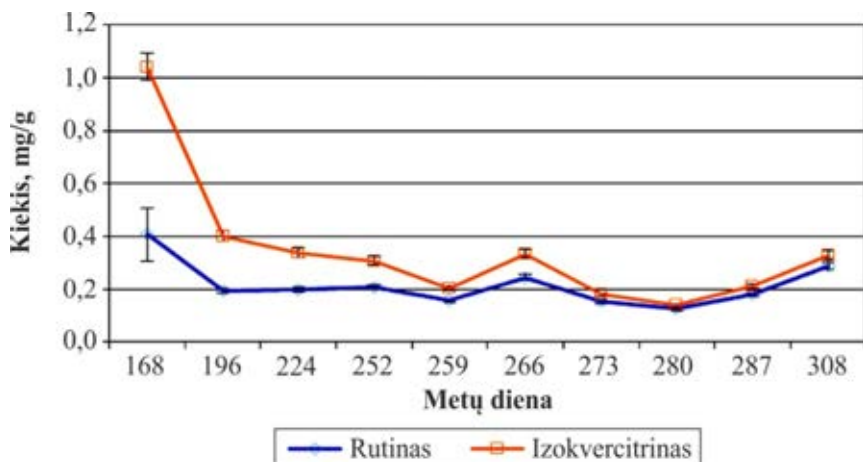
Atlikome tyrimus, siekdami ištirti fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimą obuolių ėminiuose vaisių vystymosi ir nokimo metu. Obuolių ėminiuose identifikuoti kvercetino grupės glikozidai: rutinas, izokvercitrinas, hiperozidas, avikuliarinas, kvercitrinas. Didžiausias hiperozido ($0,762 \pm 0,025$ mg/g), kvercitrino ($1,014 \pm 0,043$ mg/g) ir avikuliarino ($0,739 \pm 0,030$ mg/g) kiekis nustatytas obuolių ėminiuose, surinktuose vaisių vystymosi tarpsnio pradžioje (168 metų dieną) skintų obuolių ėminiuose. Obuoliams vystantis ir nokstant šių junginių kiekis mažėjo. Mažiausias kvercitrino ir avikuliarino kiekis nustatytas obuolių nokimo tarpsnio metu (280 metų

dieną) skintų obuolių ėminiuose (3.3.1.1 pav.). Vegetacijos periodo pabaigoje, obuoliams pasiekus vartojimo brandą (308 metų dieną), hiperozido kiekis buvo $0,177 \pm 0,006$ mg/g, kvercitrino kiekis – $0,139 \pm 0,006$ mg/g, o avikuliarino – $0,091 \pm 0,004$ mg/g (3.3.1.1 pav.).



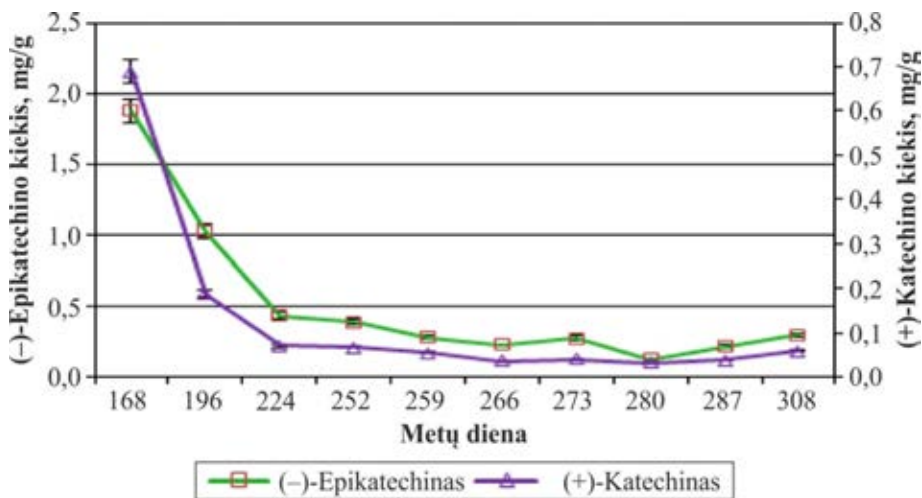
3.3.1.1 pav. Kvercitrino, hiperozido ir avikuliarino kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose vegetacijos periodo metu

Obuolių ėminiuose izokvercitrino ir rutino nustatyti mažesni kiekiai nei kitų kvercetino glikozidų. Šių junginių kiekinės sudėties įvairavimas vegetacijos periodo metu pateikiamas 3.3.1.2 pav. Didžiausias rutino ($0,041 \pm 0,002$ mg/g) ir izokvercitrino ($0,104 \pm 0,004$ mg/g) kiekis nustatytas obuolių vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje (168 metų dieną). Mažiausias šių junginių kiekis nustatytas vaisių nokimo fenologinio tarpsnio metu (280 metų dieną). Obuoliams pasiekus vartojimo brandą (308 metų dieną) nustatytas rutino kiekis buvo $0,029 \pm 0,001$ mg/g, o izokvercitrino – $0,033 \pm 0,001$ mg/g (3.3.1.2 pav.). Rutino kiekis buvo mažiausias iš identifikuotų kvercetino glikozidų grupės junginių viso vegetacijos periodo metu. Mūsų gautus kvercetino glikozidų kiekinės sudėties įvairavimo rezultatus patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimų duomenys. Sunokusių obuolių ėminiuose nustatyti mažesni kvercetino glikozidų kiekiai nei vaisių vystymosi pradžioje [7, 143].



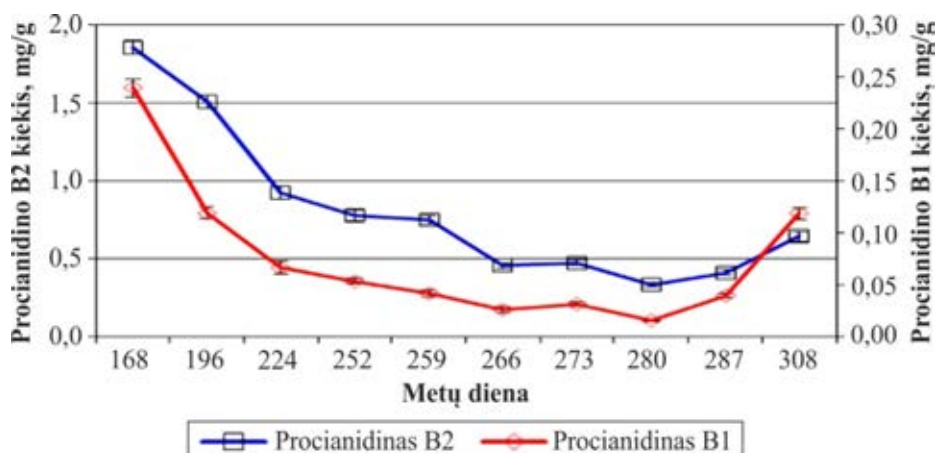
3.3.1.2 pav. Izokvercitrino ir rutino kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose vegetacijos periodo metu

Obuolių ėminiuose identifikuoti ir kiekiškai įvertinti katechinų grupės junginiai – (+)-katechinas ir (–)-epikatechinas. Didžiausi šių junginių kiekiai nustatyti vaisiaus vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje (168 metų dieną), atitinkamai $0,690 \pm 0,027$ mg/g ir $1,875 \pm 0,078$ mg/g (3.3.1.3 pav.). Vaisiams vystantis (+)-katechino ir (–)-epikatechino kiekiai mažėjo. Obuolių nokimo fenologinio tarpsnio pradžioje (266 metų diena) nustatytas (+)-katechino kiekis buvo 19 kartų, o (–)-epikatechino – 8,3 kartus mažesnis už jų kiekį, nustatytą vaisių vystymosi tarpsnio pradžioje (168 metų dieną). Obuolių nokimo metu (266–308 metų dienos) šių junginių kiekiai kito neženkiai. Mažiausi (+)-katechino ir (–)-epikatechino kiekiai nustatyti 280 metų dieną skintų obuolių ėminiuose (3.3.1.3 pav.). Panašius dėsningumus nurodo Awad ir kt., tyrę katechinų kiekinės sudėties kitimą obuolių luobelėse ėminiuose [7].



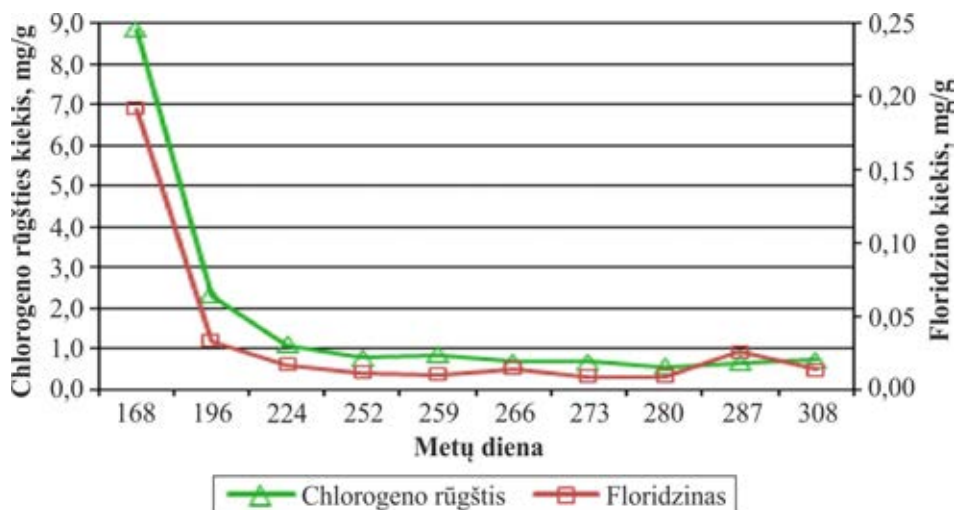
3.3.1.3 pav. (+)-Katechino ir (-)-epikatechino kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose vegetacijos periodo metu

Atlikę obuolių ėminių kiekinės sudėties tyrimus, nustatėme, kad procianidino B1 kiekis vegetacijos periodo metu įvairavo nuo 0,015 mg/g iki 0,239 mg/g, o procianidino B2 kiekis varijavo nuo 0,335 mg/g iki 1,853 mg/g (3.3.1.4 pav.). Didžiausi šių junginių kiekiai nustatyti vaisių vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje (168 metų dieną) skintų obuolių ėminiuose. Mažiausi procianidino B1 ir procianidino B2 kiekiai nustatyti vaisių nokimo metu (280 metų dieną) skintų obuolių ėminiuose. Vegetacijos periodo pabaigoje, obuoliams pasiekus vartojimo brandą, nustatytas procianidino B1 kiekis – $0,118 \pm 0,005$ mg/g, o procianidino B2 – $0,645 \pm 0,029$ mg/g.



3.3.1.4 pav. Procianidino B1 ir procianidino B2 kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose vegetacijos periodo metu

Didžiausias floridzino kiekis ($1,916 \pm 0,074$ mg/g) nustatytas vaisių vystymosi periodo pradžioje (168 metų dieną) skintų obuolių ėminiuose. Vaisiui vystantis, po obuolių užuomazgų kritimo, 196 metų dieną skintų obuolių ėminiuose nustatytas floridzino kiekis ($0,334 \pm 0,016$ mg/g) buvo 5,74 karto mažesnis už 168 metų dieną nustatytą kiekį. Mažiausi šio junginio kiekiai nustatyti 273 ir 280 metų dienomis – $0,089 \pm 0,003$ mg/g. Obuoliams pasiekus vartojimo brandą (308 metų dieną), nustatytas floridzino kiekis buvo $0,134 \pm 0,010$ mg/g (3.3.1.5 pav.).



3.3.1.5 pav. Floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekinės sudėties įvairavimas obuolių ėminiuose vegetacijos periodo metu

Didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis ($8,844 \pm 0,381$ mg/g) nustatytas vaisių vystymosi periodo pradžioje (168 metų dieną) skintų obuolių ėminiuose. 196 metų dieną, vaisiams vystantis, jis sumažėjo 3,81 karto. Vaisių nokimo fenologinio tarpsnio metu nustatytas chlorogeno rūgšties kiekis kito neženkiai. Jis varijavo nuo $0,557$ mg/g (280 metų diena) iki $0,728$ mg/g (308 metų diena) (3.3.1.5 pav.). Panašius chlorogeno rūgšties kiekinės sudėties įvairavimo dėsningumus obuolių luobelų ėminiuose vegetacijos periodo metu nustatė Awad ir kt. Šie autoriai nurodo, kad vaisių vystymosi pradžioje obuolių luobelų ėminiuose sukaupiamas didžiausias chlorogeno rūgšties kiekis [7].

Apibendrinus obuolių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimo rezultatus, nustatyta, kad didžiausi visų identifikuotų fenolinių junginių kiekiai obuolių ėminiuose sukaupiami vaisių vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje. Chlorogeno rūgštis identifikuotų fenolinių junginių komplekse vyraavo viso vegetacijos periodo metu. Tarp kvercetino grupės junginių

obuolių vystymosi pradžioje dominavo kvercitrinas, o obuoliams pasiekus vartojimo brandą nustatytas didesnis hiperozido kiekis. Tyrimų rezultatai yra reikšmingi, jie leidžia geriau suprasti obuolių vystymosi ir nokimo metu vykstančius individualių fenolinių junginių kiekinės sudėties pokyčius. Gauti duomenys svarbūs praktiniu požiūriu – jie suteikia galimybę pateikti vartotojui žinomos fenolinių junginių sudėties obuolius ir iš jų pagamintus maisto produktus.

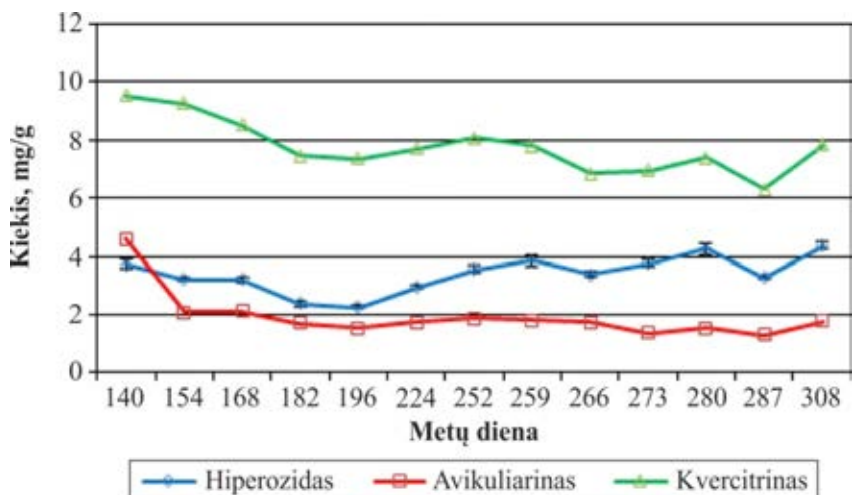
3.3.2. Fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimas obelų lapuose vegetacijos periodo metu

Įvertinus obuolių kokybinę ir kiekinę sudėtį fenologinių tarpsnių kaitoje, tikslinga atlikti obelų lapų fitocheminės sudėties analizę. Svarbu ištirti fenolinių junginių biosintezės ir kaupimosi dėsningumus vegetacijos periodo metu, palyginti obuolių ir obelų lapų kiekinės sudėties įvairavimą, nustatyti obelų lapuose kaupiamų individualių fenolinių junginių kiekio priklausomybę nuo augalo fenologinių tarpsnių ir klimato sąlygų. Išsamūs mokslinių tyrimų duomenys apie fenolinių junginių kokybinę ir kiekinę sudėtį sudarytų sąlygas panaudoti obelų lapus kaip fenolinių junginių šaltinį medicinos poreikiams, individualių, biologinių poveikiu pasižyminčių fenolinių junginių išskyrimui.

Atlikti obelų lapų kiekinės sudėties įvairavimo tyrimai augalo vegetacijos metu. Visuose fenologiniuose tarpsniuose rinktų obelų lapų ėminiuose vyravo kvercitrinas. Didžiausias jo kiekis ($9,529 \pm 0,205$ mg/g) nustatytas lapų vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje (140 metų dieną), mažiausias ($6,315 \pm 0,104$ mg/g) – lapų senėjimo tarpsnio metu (294 metų dieną) (3.3.2.1 pav.). Panašius kvercetino kiekinės sudėties varijavimo vegetacijos periodo metu dėsningumus nurodo ir kiti mokslininkai, tyrę 'Golden Delicious' ir 'Jonagold' obelų lapų ėminius [99].

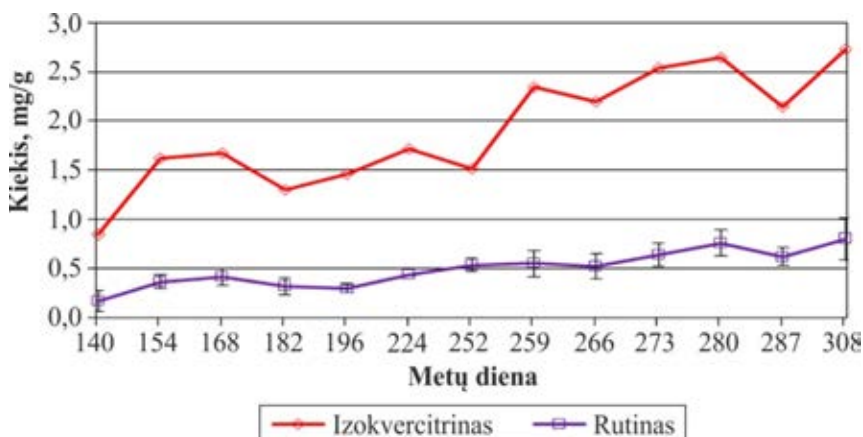
Nustatytas kvercitrino kiekis sudarė 44,48–55,88 proc. visų obelų lapų ėminiuose identifikuotų kvercetino glikozidų kiekio. Mokslinės informacijos šaltiniuose skelbiami tyrimų duomenys patvirtina mūsų gautus rezultatus – kvercitrinas vyrauja tarp obelų lapuose nustatytų kvercetino glikozidų [78, 99].

Kitų kvercetino glikozidų nustatyti mažesni kiekiai. Didžiausias hiperozido kiekis ($4,378 \pm 0,110$ mg/g) nustatytas vegetacijos periodo pabaigoje (308 metų dieną), avikuliarino ($4,616 \pm 0,189$ mg/g) – lapų vystymosi pradžioje (140 metų dieną) rinktų obelų lapų ėminiuose. Mažiausias hiperozido kiekis ($2,267 \pm 0,064$ mg/g) nustatytas intensyvaus ūglių augimo periodo metu (196 metų dieną), avikuliarino ($1,290 \pm 0,050$ mg/g) – lapų senėjimo fenologinio tarpsnio metu (294 metų dieną) rinktų obelų lapų ėminiuose (3.3.2.1 pav.).



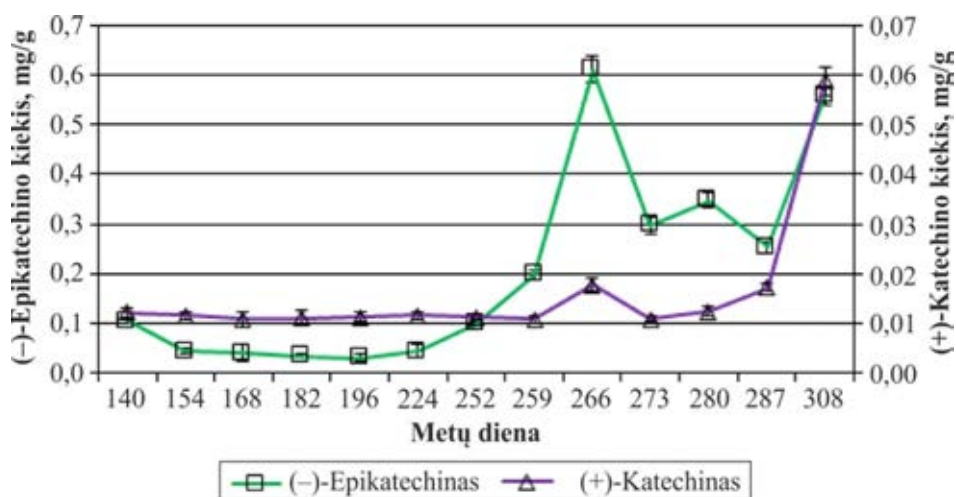
3.3.2.1 pav. Avikuliarino, hiperozido ir kvercitrino kiekinės sudėties įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu

Mažiausi rutino ir izokvercitrino kiekiai nustatyti lapų vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje (140 metų dieną), atitinkamai $0,850 \pm 0,035$ mg/g ir $0,168 \pm 0,006$ mg/g. Vegetacijos periodo metu šių junginių kiekis didėjo. Didžiausias izokvercitrino ($2,735 \pm 0,215$ mg/g) ir rutino ($0,801 \pm 0,033$ mg/g) kiekis nustatytas lapų senėjimo fenologinio tarpsnio metu (308 metų dieną), lapams gelstant (3.3.2.2 pav.). Vegetacijos periodo metu nustatytas rutino kiekis buvo mažiausias tarp visų identifikuotų kvercetrino glikozidų.



3.3.2.2 pav. Izokvercitrino ir rutino kiekinės sudėties įvairavimas obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu

Obelių lapų ėminiuose identifikuotų katechinų grupės junginių – (+)-katechino ir (–)-epikatechino kiekis lapų vystymosi ir ūglių intensyvaus augimo fenologinių tarpsnių metu kito neženkiai. Didžiausias (–)-epikatechino kiekis ($0,611 \pm 0,026$ mg/g) nustatytas lapų brandos fenologinio tarpsnio metu, 252 metų dieną, rinktų obelių lapų ėminiuose (3.3.2.3 pav.). Didžiausias (+)-katechino kiekis ($0,059 \pm 0,003$ mg/g) nustatytas lapų senėjimo fenologinio tarpsnio metu (308 metų dieną). Petkovsek ir kt., tyrę obelių lapų fenolinių junginių kiekinę sudėtį vegetacijos periodo metu, nustatė didesnius (+)-katechino ir (–)-epikatechino kiekius [99]. Skirtumams įtakos galėjo turėti skirtingos obelių veislės, klimato, meteorologinės, kultivavimo sąlygos ar kiti faktoriai [66, 77, 82].



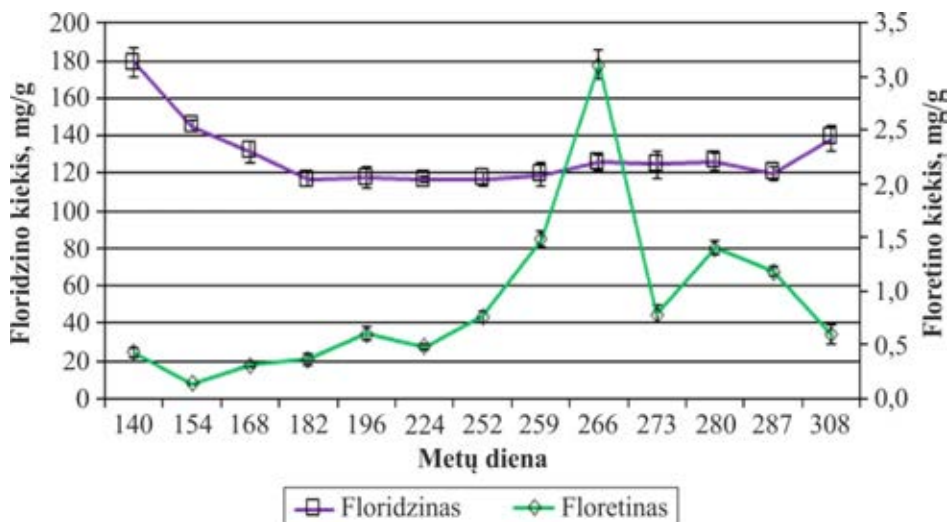
3.3.2.3 pav. Katechinų kiekinė sudėtis obelių lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu

Obelių lapų ėminiuose identifikuoti dihidrochalkonų grupės junginiai – floridzinas ir floretinas. Nustatyti floridzino kiekiai buvo didžiausi tarp visų identifikuotų obelių lapų fenolinių junginių. Vegetacijos periodo metu nustatytas šio junginio kiekis sudarė 85,07–90,08 proc. visų ESC metodu nustatytų fenolinių junginių kiekio. Šis dėsnīgumas nurodomas ir kitų mokslininkų – floridzinas obelių lapuose yra vyraujantis komponentas [46, 100, 102].

Didžiausias floridzino kiekis ($178,973 \pm 7,436$ mg/g) nustatytas lapų vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje 140 metų dieną rinktų obelių lapų ėminiuose. Intensyvaus ūglių augimo fenologinio tarpsnio antroje pusėje ir lapų brandos tarpsnio metu (182–280 metų dienomis) nustatytas floridzino kiekis varijavo neženkiai ($116,408$ – $126,427$ mg/g). Vegetacijos periodo

pabaigoje, lapams gelstant, nustatytas floridzino kiekio padidėjimas iki $138,808 \pm 5,698$ mg/g (3.3.2.4 pav.).

Išanalizavus floretino kiekinės sudėties pokyčius obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu, nustatyta, kad didžiausias šio junginio kiekis ($3,108 \pm 0,134$ mg/g) sukaupiamas lapų brandos fenologinio tarpsnio metu (252 metų dieną), mažiausias ($0,138 \pm 0,010$ mg/g) – 154 metų dieną lapų vystymosi fenologinio tarpsnio pabaigoje (3.3.2.4 pav.).

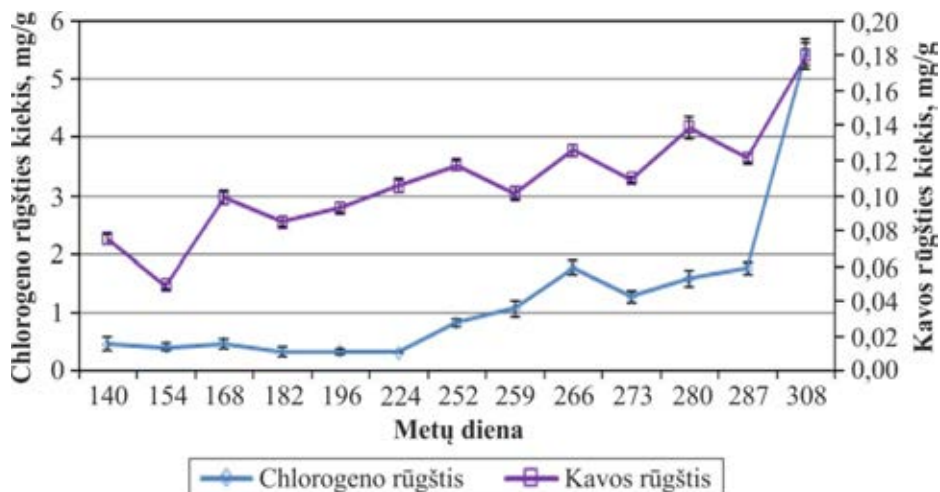


3.3.2.4 pav. Dihidrochalkonų kiekinė sudėtis obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu

Obelų lapų ėminiuose identifikuotos fenolinės rūgštys – chlorogeno rūgštis ir kavos rūgštis. Chlorogeno rūgšties kiekis lapų vystymosi ir intensyvaus ūglių augimo fenologinių tarpsnių metu kito neženkiai. Mažiausias šios rūgšties kiekis ($0,331\text{--}0,343$ mg/g) nustatytas 182–210 metų dienomis rinktų obelų lapų ėminiuose. Chlorogeno rūgšties kiekis pradėjo didėti ūglių augimo fenologinio tarpsnio pabaigoje (nuo 224 metų dienos). Didžiausias jos kiekis ($5,457 \pm 0,208$ mg/g) nustatytas vegetacijos periodo pabaigoje surinktų obelų lapų ėminiuose (3.3.2.5 pav.).

Mažiausias kavos rūgšties kiekis ($0,049 \pm 0,002$ mg/g) nustatytas lapų vystymosi fenologinio tarpsnio metu (154 metų dieną) surinktų obelų lapų ėminiuose. Intensyvaus ūgių augimo ir lapų brandos fenologinių tarpsnių metu nustatytas kavos rūgšties kiekio didėjimas. Didžiausias šios rūgšties kiekis ($0,180 \pm 0,007$ mg/g) nustatytas lapų senėjimo fenologinio tarpsnio pabaigoje (308 metų dieną) surinktų obelų lapų ėminiuose. Petkovsek ir kt. skelbiami tyrimų duomenys patvirtina mūsų tyrimų rezultatus – kavos

rūgšties kiekis obelų lapų ėminiuose augalo vegetacijos periodo metu didėja [100].



3.3.2.5 pav. Fenolinių rūgščių kiekinė sudėtis obelų lapų ėminiuose vegetacijos periodo metu

Apibendrinant gautus tyrimų rezultatus, nustatyta, kad skirtingų fenolinių junginių grupių kiekinė sudėtis augalo vegetacijos periodo metu įvairuoja. Didžiausias fenolinių rūgščių, (+)-katechino, hiperozido, izokvercitrino ir rutino kiekis sukaupiamas augalo vegetacijos periodo pabaigoje, floridzino, avikuliarino ir kvercitrino – lapų vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje, floretino ir (–)-epikatechino – lapų brandos metu.

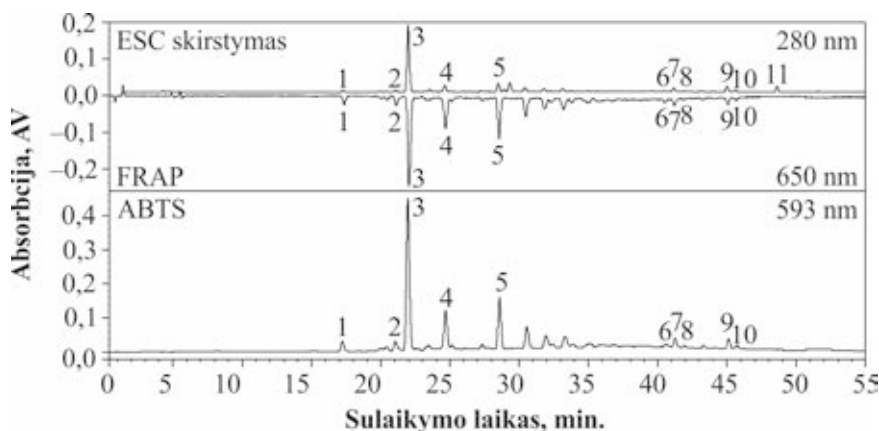
Nustatyti skirtumai tarp obuolių ir obelų lapų kiekinės sudėties. Obuolių ėminiuose viso vegetacijos periodo metu vyraujantis komponentas buvo chlorogeno rūgštis, obelų lapų ėminiuose dominavo floridzinas. Kvercetino glikozidų ir floridzino obelų lapų ėminiuose nustatyti kiekiai buvo didesni už nustatytus obuolių ėminiuose, chlorogeno rūgšties – mažesni. Skyrėsi ir kokybinė obuolių ir obelų lapų sudėtis – obelų lapuose nustatyti floretinas ir kavos rūgštis, kurie obuolių ėminiuose neidentifikuoti.

3.4. Obuolių ėminių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai

Fenolinius junginius kaupiančių augalinių žaliavų naudą žmogaus sveikatai patvirtina gausūs mokslinių tyrimų duomenys [22, 30, 53]. Nustatytas ryšys tarp šių junginių turtingo augalinio maisto vartojimo ir sergamumo onkologinėmis, širdies ir kraujagyslių bei neurodegeneracinėmis ligomis [94, 115]. Biologiškai aktyvių junginių, pasižyminčių antioksi-

dacinių poveikiu, identifikavimas yra svarbus. Jis leidžia moksliskai pagrįsti augalinių žaliavų ir iš jų pagamintų preparatų naudojimą oksidacinio streso sukeltų susirgimų profilaktikai ir gydymui. Tikslinga įvertinti Lietuvoje auginamų veislių obuolių antioksidacinį aktyvumą, nustatyti analitinius žymenis, kurie galėtų būti panaudojami obelų vaisių, iš jų pagamintų maisto papildų antioksidacinio aktyvumo vertinimui bei kokybės kontrolei.

Atlikome 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' ir 'Rajka' obuolių ėminių ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo tyrimus. Obuolių ėminių ekstrakto ESC-ABTS ir ESC-FRAP chromatogramos pateiktos 3.4.1 pav.



1 – Procianidinas B1, 2 – (+)-katechinas, 3 – chlorogeno rūgštis, 4 – procianidinas B2, 5 – (–)-epikatechinas, 6 – rutinas, 7 – hiperozidas, 8 – izokvercitrinas, 9 – avikuliarinas, 10 – kvercitrinas, 11 – floridzinas

3.4.1 pav. Obuolių ekstrakto ESC-ABTS-FRAP chromatogramos (veislė 'Aldas')

Chlorogeno rūgštis pasižymi labiausiai išreikštu antiradikaliniu ir redukciniu aktyvumu tarp obuolių ekstraktuose identifikuotų fenolinių junginių. Didžiausios chlorogeno rūgšties TE reikšmės nustatytos ištyrus 'Aldas' veislės obuolių ėminių ekstraktus ($TE_{ABTS}=6,90 \mu\text{mol/g}$, $TE_{FRAP}=7,27 \mu\text{mol/g}$), mažiausios – ištyrus 'Rajka' veislės obuolių ekstraktus ($TE_{ABTS}=0,89 \mu\text{mol/g}$, $TE_{FRAP}=0,96 \mu\text{mol/g}$) (3.4.1 lentelė). 'Aldas' veislės obuolių ėminiuose nustatytas chlorogeno rūgšties kiekis buvo 4,4 karto didesnis už jos kiekį, nustatytą 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose. Tai sąlygojo šių veislių obuolių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo skirtumus.

Chlorogeno rūgštis lėmė 7,92–31,38 proc. suminio antiradikalinio aktyvumo (3.4.2 pav.) ir 10,43–36,48 proc. redukcinio aktyvumo (3.4.3 pav.). Bandonienė ir Murkovic, pritaikę ESC-DPPH pokolonėlinės reakcijos me-

todą obuolių ekstraktų antiradikalinio aktyvumo tyrimams, pateikia panašius rezultatus – chlorogeno rūgštis yra vienas labiausiai obuolių ekstraktų antiradikalinį aktyvumą lemiančių fenolinių junginių. Šių autorių nurodomas chlorogeno rūgšties indėlis į suminį obuolių ekstraktų antiradikalinį aktyvumą yra 27–40 proc. [13].

ESC-ABTS metodu nustatytos identifikuotų oligomerinių procianidinių grupės junginių suminio TE reikšmės varijavo nuo 2,28 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Rajka') iki 3,74 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Lodel'). Tai sudarė 14,84–20,24 proc. suminio antiradikalinio aktyvumo (3.4.2 pav.). ESC-FRAP metodu nustatytos identifikuotų procianidinių grupės junginių suminio TE reikšmės įvairavo nuo 1,77 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Ligol') iki 3,31 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Lodel'). Procianidinių grupės junginiai lėmė 12,65–20,75 proc. suminio redukcinio aktyvumo (3.4.3 pav.). 'Lodel' veislės obuolių ėminiai iš tirtų veislių obuolių išsiskyrė dideliu procianidino B2 kiekiu. Tuo galima paaiškinti gautus rezultatus – stipriausias procianidinių grupės junginių antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nustatytas šios veislės obuolių ėminių ekstraktuose.

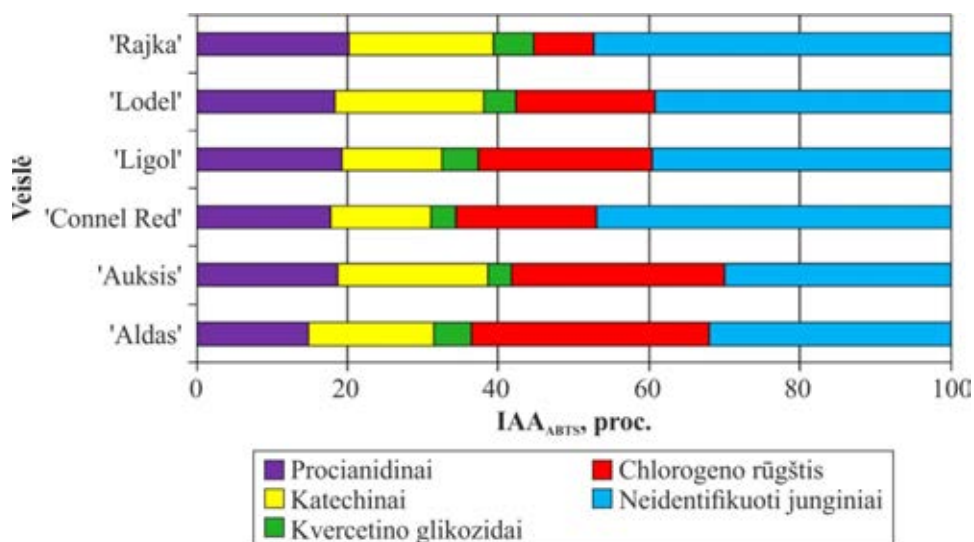
Tarp identifikuotų oligomerinių procianidinių grupės junginių didžiausią indėlį į antioksidacinį aktyvumą (IAA) turėjo procianidinas B2 ($\text{IAA}_{\text{ABTS}}=12,03\text{--}17,36$ proc., $\text{IAA}_{\text{FRAP}}=10,31\text{--}17,47$ proc.), procianidino B1 indėlis buvo mažesnis ($\text{IAA}_{\text{ABTS}}=1,02\text{--}3,67$ proc., $\text{IAA}_{\text{FRAP}}=1,74\text{--}3,46$ proc.). Ši dėsningumą lėmė obuolių ėminių procianidinių grupės junginių kiekinės sudėties skirtumai. Obuolių ekstraktuose nustatytas procianidino B2 kiekis buvo ženkliai (5,4–13,8 kartų) didesnis už procianidino B1. Bai ir kt., tyrę obuolių išspaudų fenolinių junginių antioksidacinį aktyvumą, pateikia panašius tyrimų rezultatus. Šie mokslininkai nurodo, kad procianidinas B2 pasižymi stipriausiu antioksidaciniu aktyvumu iš visų obuolių išspaudų ėminiuose nustatytų fenolinių junginių [11].

Obuolių ėminių ekstraktuose identifikuotų katechinų grupės junginių suminio TE reikšmės, nustatytos ESC-ABTS metodu, varijavo nuo 1,65 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Ligol') iki 4,05 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Lodel'), o nustatytos ESC-FRAP metodu kito nuo 1,13 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Ligol') iki 3,17 $\mu\text{mol/g}$ (veislė 'Lodel'). Katechinų grupės junginiai lėmė 13,28–19,97 proc. suminio antiradikalinio obuolių ekstraktų aktyvumo (3.4.2 pav.) ir 12,19–19,80 proc. suminio ESC-FRAP metodu įvertinto šių ekstraktų redukcinio aktyvumo (3.4.3 pav.). Tarp šios grupės junginių didžiausią indėlį į suminį antioksidacinį aktyvumą lėmė (–)-epikatechinas ($\text{IAA}_{\text{ABTS}}=11,45\text{--}18,24$ proc., $\text{IAA}_{\text{FRAP}}=8,92\text{--}17,87$ proc.). (+)-Katechino indėlis į suminį antiradikalinį aktyvumą – 1,00–2,87 proc., o indėlis į suminį redukcinį aktyvumą įvairių veislių obuolių ekstraktuose įvairavo nuo 1,76 iki 3,27 proc. Gauti rezultatai patvirtina Lee ir kt. skelbiamus duomenis, kad (–)-epikatechinas ir procia-

nidinas B2 yra vieni labiausiai obuolių ekstraktų antioksidacinį aktyvumą lemiančių fenolinių junginių [68].

Kvercetino glikozidai lėmė nuo 3,16 proc. (veislė 'Auksis') iki 5,42 proc. (veislė 'Rajka') suminio antiradikalinio (3.4.2 pav.) ir nuo 2,26 proc. (veislė 'Lodel') iki 7,23 proc. (veislė 'Rajka') suminio redukcinio aktyvumo (3.4.3 pav.). Individualių kvercetino glikozidų indėlis į suminį antioksidacinį aktyvumą skirtingų veislių obuolių ekstraktuose įvairavo. 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red' ir 'Lodel' veislių obuolių ekstraktuose tarp kvercetino grupės junginių didžiausią indėlį į suminį antioksidacinį aktyvumą turėjo avikuliarinas ($IAA_{ABTS}=1,08-1,98$ proc., $IAA_{FRAP}=0,80-2,14$ proc.) ir hiperozidas ($IAA_{ABTS}=0,92-1,57$ proc., $IAA_{FRAP}=0,96-2,11$ proc.).

Obuolių ėminių ekstraktuose, tirtuose taikant ABTS ir FRAP pokolonėlines sistemas, floridzinas neturėjo antioksidacinio aktyvumo. Bandonienė ir Murkovic nurodo panašius tyrimų duomenis – floridzinas vienintelis iš šių mokslininkų DPPH pokolonėliniu metodu analizuotų fenolinių junginių nepasižymėjo antiradikalinėmis savybėmis [13]. Bai ir kt., tyrę obuolių išspaudas, nurodo, kad floridzinas pasižymi silpniausiu antioksidaciniu aktyvumu, lyginant su kitų grupių fenoliniais junginiais [11]. Tai siejama su dihidrochalkonų grupės junginių struktūra – mažesnis hidroksilo grupių skaičius aromatinuose žieduose lemia silpną floridzino antioksidacinį aktyvumą [11, 46].

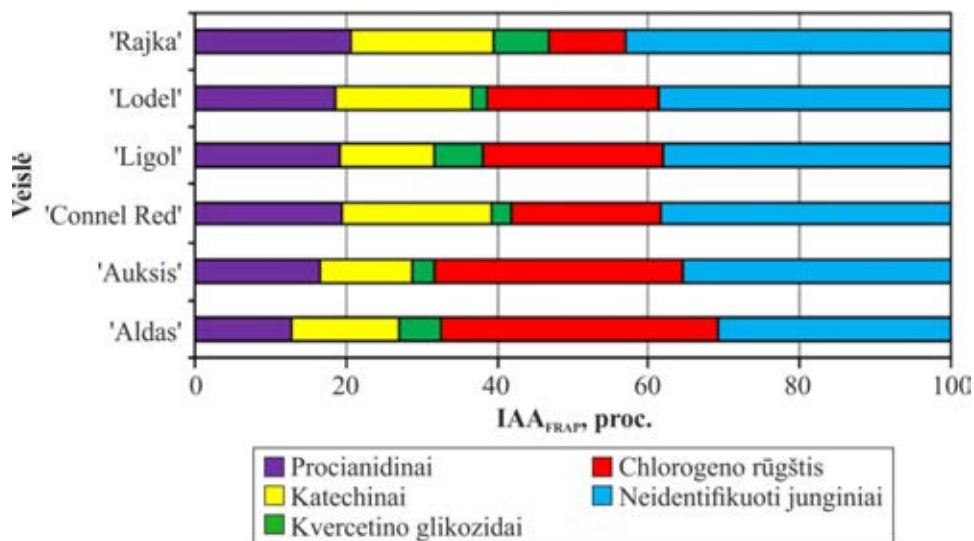


3.4.2 pav. Obuolių ėminių ekstraktuose nustatytų fenolinių junginių indėlio į suminį antiradikalinį aktyvumą įvairavimas

3.4.1 lentelė. *Obuolių ėminių ekstraktuose nustatytų junginių antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas (TE, $\mu\text{mol/g}$)*

Junginys	'Aldas'		'Auksis'		'Connel Red'		'Ligol'		'Lodel'		'Rajka'	
	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}	TE _{ABTS}	TE _{FRAP}
Hiperozidas	0,33	0,42	0,17	0,18	0,13	0,15	0,09	0,24	0,29	0,19	0,10	0,17
Izokvercitrinas	0,06	0,08	0,04	0,03	0,05	0,02	0,08	0,04	0,09	0,01	0,03	0,02
Rutinas	0,02	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,01	0,01	0,03
Avikuliarinas	0,42	0,43	0,19	0,14	0,16	0,16	0,15	0,15	0,25	0,14	0,06	0,12
Kvercitrinas	0,21	0,18	0,09	0,07	0,12	0,09	0,20	0,15	0,13	0,10	0,33	0,34
(+)-Katechinas	0,62	0,52	0,30	0,49	0,28	0,31	0,11	0,16	0,47	0,33	0,15	0,27
(-)-Epikatechinas	3,01	2,33	3,38	1,33	1,84	2,85	1,54	0,97	3,58	2,84	2,00	1,46
Procianidinas B1	0,60	0,47	0,64	0,51	0,15	0,32	0,21	0,20	0,20	0,31	0,40	0,31
Procianidinas B2	2,63	2,06	2,80	1,95	2,70	2,79	2,18	1,57	3,54	3,00	1,88	1,60
Chlorogeno rūgštis	6,90	7,27	5,24	4,86	2,99	3,12	2,89	2,18	3,77	4,02	0,89	0,96
Floridzinas	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Neidentifikuoti junginiai	6,64	6,19	5,22	5,30	6,92	6,17	4,53	3,52	7,40	6,87	4,81	3,99
Suminis TE	21,44	19,98	18,09	14,89	15,35	16,00	12,00	9,21	19,75	17,82	10,66	9,27

Tirtų veislių obuolių ėminių ekstraktuose nustatytų skirtingų grupių fenolinių junginių indėlio į antiradikalinį aktyvumą įvairavimas pateiktas 3.4.2 pav., o indėlio į redukcinį aktyvumą variavimas – 3.4.3 pav.



3.4.3 pav. *Obuolių ėminių ekstraktuose nustatytų fenolinių junginių indėlio į suminį redukcinį aktyvumą įvairavimas*

ESC-ABTS pokolonėliniu metodu įvertinus obuolių ėminių ekstraktų antiradikalinį aktyvumą nustatytos suminio TE reikšmės varijavo nuo 10,66 $\mu\text{mol/g}$ iki 21,44 $\mu\text{mol/g}$ (3.4.1 lentelė). ESC-FRAP metodu nustatytos obuolių ekstraktų redukcinio aktyvumo TE reikšmės įvairavo nuo 9,21 $\mu\text{mol/g}$ iki 19,98 $\mu\text{mol/g}$ (3.4.1 lentelė). Stipriausiu laisvųjų radikalų surišimo ir redukciniu aktyvumu pasižymėjo 'Aldas' veislės obuolių ėminių ekstraktai. Silpniausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas ištyrus 'Rajka' veislės obuolių ekstraktus. Silpniausiu redukciniu aktyvumu pasižymėjo 'Ligol' ir 'Rajka' veislės obuolių ėminių ekstraktai (3.4.1 lentelė). 'Aldas' veislės obuoliai ir jų ekstraktai galėtų būti vertingi panaudojimui medicinos poreikiams, antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių išskyrimui, maisto produktų praturtinimui natūraliais antioksidantais.

IŠVADOS

1. Išvystyta ir optimizuota ESC metodika fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties analizei obelų vaisių ir lapų ėminiuose. Gauti validacijos parametrų – atrankumo, glaudumo, tiesiškumo – įverčiai patvirtina metodikos tinkamumą analizei. Metodika panaudota atliekant obuolių ir obelų lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimus.
2. Nustatyta, kad veislės faktorius turi įtakos obuolių ėminių kiekinės sudėties įvairavimui. Suminis nustatytų fenolinių junginių kiekis liofilizuotų obuolių ėminiuose įvairavo nuo 2,209 mg/g (veislė 'Connel Red') iki 5,817 mg/g (veislė 'Aldas'). Obelų lapų ėminiuose fenolinių junginių kiekis varijavo nuo 135,021 mg/g (veislė 'Auksis') iki 137,938 mg/g (veislė 'Aldas') absoliučiai sausos žaliavos. Nustatyta, kad 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol' ir 'Lodel' obuolių ėminiuose vyraujantis komponentas yra chlorogeno rūgštis, 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose – procianidinas B2. Obelų lapų ėminiuose dominavo floridzinas, kuris sudarė 76,9–84,2 proc. visų nustatytų fenolinių junginių kiekio.
3. Atlikus obuolių luobelių ir minkštimų kiekinės sudėties įvairavimo tyrimus, suminis identifikuotų kvercetino glikozidų kiekis obuolių luobelių ėminiuose buvo 11,50–17,30 kartų didesnis už šių junginių kiekį, nustatytą obuolių minkštimuose. Didžiausias suminis identifikuotų kvercetino glikozidų kiekis ($1,726 \pm 0,037$ mg/g) nustatytas 'Aldas' veislės obuolių luobelių ėminiuose. Didžiausias identifikuotų katechinų ($1,086 \pm 0,021$ mg/g) ir oligomerinių procianidinų ($1,423 \pm 0,027$ mg/g) kiekis nustatytas 'Lodel' veislės obuolių minkštimų ėminiuose.
4. Įvertinus obelų vaisių ir lapų fenolinių junginių įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu, nustatyta, kad didžiausi jų kiekiai obuolių ėminiuose nustatyti vaisių vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje. Obelų lapuose didžiausi chlorogeno ir kavos rūgščių, (+)-katechino, hiperozido, izokvercitrino ir rutino kiekiai sukaupiami augalo vegetacijos periodo pabaigoje, floridzino, avikuliarino, kvercitrino – lapų vystymosi fenologinio tarpsnio metu, floretino ir (–)-epikatechino – lapų brandos metu.

5. Nustatyta, kad obels poskiepis turi įtakos obuolių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimui. Didžiausi individualių fenolinių junginių kiekiai nustatyti nykštukinių P 61 ir P 22 poskiepių obuolių ėminiuose, mažiausi – žemaūgių M.9 ir P 62 bei pusiauzemaūgio M.26 poskiepio obuolių ėminiuose.
6. Ištyrus obuolių, jų luobelį ir minkštimą ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą nustatyta, kad chlorogeno rūgštis, procianidinas B2 ir (–)-epikatechinas gali būti pasirenkami kaip analitiniai žymenys obuolių ir jų produktų antioksidacinio aktyvumo vertinimui.

LITERATŪRA

1. Alberto MR, Rinsdahl Canavosio MA, Manca de Nadra MC. Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens. *E J Biotechn.* 2006; 9 (3): 205–9.
2. Al-Hinai YK, Roper TR. Rootstock effects on growth, cell number, and cell size of 'Gala' apples. *J Am Soc Hortic Sci.* 2004; 129 (1): 37–41.
3. Alonso-Salces RM, Herrero C, Barranco A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. Technological classification of Basque cider apple cultivars according to their polyphenolic profiles by pattern recognition analysis. *J Agric Food Chem.* 2004; 52 (26): 8006–16.
4. Aprikian O, Levrat-Verny MA, Besson C, Busserolles J, Rémésy C, Demigné C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chem.* 2001; 75 (4): 445–52.
5. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81 (1): 317S–25S.
6. Avcı A, Atlı T, Ergüder İB, Varlı M, Devrim E, Turgay SAM ir kt. Effects of apple consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in elderly subjects. *Exp Aging Res.* 2007; 33 (4): 429–37.
7. Awad MA, de Jager A, van der Plas LH, van der Krol AR. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. *Sci Hort.* 2001; 90 (1): 69–83.
8. Awad MA, de Jager A, van Westing LM. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Sci Hort.* 2000; 83 (3): 249–63.
9. Awad MA, de Jager A. Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: influences of growth regulators and fruit maturity. *Sci Hort.* 2002; 93 (3): 257–66.
10. Baber N. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). *Br J Clin Pharmacol.* 1994; 37 (5): 401–4.
11. Bai X, Zhang H, Ren S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. *J Sci Food Agr.* 2013; 93 (10): 2502–6.
12. Balasuriya N, Rupasinghe HPV. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chem.* 2012; 135 (4): 2320–5.
13. Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J Agric Food Chem.* 2002; 50 (9): 2482–7.
14. Bao MJ, Shen J, Jia YL, Li FF, Ma WJ, Shen HJ ir kt. Apple polyphenol protects against cigarette smoke-induced acute lung injury. *Nutrition.* 2013; 29 (1): 235–43.
15. Barth SW, Fähndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F ir kt. Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis.* 2005; 26 (8): 1414–21.
16. Beekwilder J, Hall RD, De Vos CR. Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. *Biofactors.* 2005; 23 (4): 197–205.
17. Belviso S, Scursatone B, Re G, Zeppa G. Novel data on the polyphenol composition of Italian ancient apple cultivars. *Int J Food Prop.* 2013; 16 (7): 1507–15.

18. Blažytė A. Lietuvos augalų nacionaliniai genetiniai ištekliai. Senosios lietuviškos vaismedžių veislės. Akademija; 2008. p. 9.
19. Boccia MM, Kopf SR, Baratti CM. Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 1999; 71 (1): 104–12.
20. Bojer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J.* 2004; 3 (5): 12.
21. Bonarska-Kujawa D, Cyboran S, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants. *J Med Plants Res.* 2011; 5 (11): 2339–47.
22. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004; 74 (17), 2157–84.
23. Carrasco-Pozo C, Speisky H, Brunser O, Pastene E, Gotteland M. Apple peel polyphenols protect against gastrointestinal mucosa alterations induced by indomethacin in rats. *J Agric Food Chem.* 2011; 59 (12): 6459–66.
24. Ceymann M, Arrigoni E, Schärer H, Bozzi Nising A, Hurrell RF. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J Food Comp Anal.* 2012; 26 (1): 128–35.
25. Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Savatović S, Mandić, A., Tumbas, V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem.* 2008; 109 (2): 340–7.
26. Chan A, Shea TB. Supplementation with apple juice attenuates presenilin-1 over-expression during dietary and genetically-induced oxidative stress. *J Alzheimers Dis.* 2006; 10 (4): 353–8.
27. Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem.* 2004; 52 (15): 4684–9.
28. Coart E, van Glabeke S, de Loose M, Larsen AS, Roldán-Ruiz I. Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Mol Ecol.* 2006; 15 (8): 2171–82.
29. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17 (10): 1195–1214.
30. Dai J, Mumpr RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010; 15 (10): 7313–52.
31. de Rijke E, Out P, Niessen WM, Ariese F, Gooijer C, Udo AT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A.* 2006; 1112 (1–2): 31–63.
32. Delian E, Petre V, Burzo I, Bădulescu L, Hoza D. Total phenols and nutrients composition aspects of some apple cultivars and new studied breeding creations lines grown in Voinești area–Romania. *Rom Biotech Lett.* 2011; 16 (6): 6722–29.
33. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P, Tuszyński T. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *J Fruit Ornament. Plant Res.* 2010; 18 (2): 39–50.
34. Duda-Chodak A, Tarko T, Tuszyński T. Antioxidant activity of apples-an impact of maturity stage and fruit part. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2011; 10 (4), 443–54.
35. Elzebroek ATG, Wind K. Guide to Cultivated Plants. Wallingford: CAB International; 2008, p. 25–30.

36. European Pharmacopoeia, Volume 1, Council of Europe, Strasbourg, France, 7th edition, 2010. p. 51.
37. FAO. FAO Statistical Databases. 2013. [Žiūrėta 2015-02-20]. Prieiga per internetą: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>
38. Feliciano RP, Antunes C, Ramos A, Serra AT, Figueira ME, Duarte CMM ir kt. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1– Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *J Funct Foods*. 2010; 2 (1): 35–45.
39. Feng F, Li M, Ma F, Cheng L. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. *Plant Physiol Biochem*. 2013; 69: 54–61.
40. Francini A, Sebastiani L. Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants*. 2013; 2 (3): 181–93.
41. Gallus S, Talamini R, Giacosa A, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S ir kt. Does an apple a day keep the oncologist away? 2005; 16 (11): 1841–4.
42. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res*. 2011; 5 (31): 6697–703.
43. Giorgi M, Capocasa F, Scalzo J, Murri G, Battino M, Mezzetti B. The rootstock effects on plant adaptability, production, fruit quality, and nutrition in the peach (cv. ‘Suncrest’). *Sci Hort*. 2005; 107 (1): 36–42.
44. Gonçalves B, Moutinho-Pereira J, Santos A, Silva AP, Bacelar E, Correia, C ir kt. Scion–rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry. *Tree Physiol*. 2006; 26 (1): 93–104.
45. Gosch C, Halbwirth H, Kuhn J, Miosic S, Stich K. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Sci*. 2009; 176 (2): 223–31.
46. Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*. 2010; 71 (8): 838–43.
47. Graziani G, D’argenio G, Tuccillo C, Loguercio C, Ritieni A, Morisco F ir kt. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut*. 2005; 54 (2): 193–200.
48. Guyot S, Le Bourvellec C, Marnet N, Drilleau JF. Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *LWT-Food Sci Technol*. 2002; 35 (3): 289–91.
49. Haminiuk CW, Maciel GM, Plata-Oviedo MS, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits—an overview. *Int J Food Sci Tech*. 2012; 47 (10), 2023–44.
50. Hardman TC, Dubrey SW. Development and potential role of type-2 sodium-glucose transporter inhibitors for management of type 2 diabetes. *Diabetes Ther*. 2011; 2 (3): 133–45.
51. Harris SA, Robinson JP, Juniper BE. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends Genet*. 2002; 18 (8): 426–30.
52. He RR, Wang M, Wang CZ, Chen BT, Lu CN, Yao XS ir kt. Protective effect of apple polyphenols against stress-provoked influenza viral infection in restraint mice. *J Agric Food Chem*. 2011; 59 (8): 3730–7.
53. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002; 13 (10): 572–84.
54. Hoang NT, Golding JB, Wilkes MA. The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on ‘Cripps Pink’ apple phenolics and antioxidant activity. *Food Chem*. 2011; 127 (3): 1249–56.

55. Hokanson SC, Lamboy WF, Szewc-McFadden AK, McFerson JR. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica*. 2011; 118 (3), 281–94.
56. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chem*. 2011; 126: 1821–35.
57. Jakobek L, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *J Food Comp Anal*. 2013; 31 (2): 199–211.
58. Kahle K, Kraus M, Richling E. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49 (8): 797–806.
59. Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol Biochem*. 2014, 84: 169–88.
60. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013; 18 (2): 2328–75.
61. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Phloridzin reduces blood glucose levels and alters hepatic gene expression in normal BALB/c mice. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50 (7): 2547–53.
62. Kolniak-Ostek J, Oszmiański J, Wojdyło A. Effect of apple leaves addition on physicochemical properties of cloudy beverages. *Ind Crop Prod*. 2013; 44: 413–20.
63. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert K ir kt. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. 2002; 113 (9): 71–88.
64. Kviklys D, Kviklienė N, Bielicki P, Bite A, Lepsis J, Univer T ir kt. Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of apple (*Malus domestica* Borkh.) new rootstocks. *Zemdirbyste*. 2013; 100 (4): 441–6.
65. Kviklys D, Kviklienė N, Bite A, Lepsis J, Univer T, Univer N ir kt. Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of 12 apple rootstocks in North-East Europe. *HORTSCI*. 2012; 39 (1): 1–7.
66. Lampíř L, Pavloušek P. Influence of locality on content of phenolic compounds in white wines. *Czech J Food Sci*. 2013; 31 (6): 619–26.
67. Łata B, Przeradzka M, Binkowska M. Great differences in antioxidant properties exist between 56 apple cultivars and vegetation seasons. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (23): 8970–8.
68. Lee KT, Jung YS, Oh SM. Synthesis of tin-encapsulated spherical hollow carbon for anode material in lithium secondary batteries. *J Am Chem Soc*. 2003; 125 (19): 5652–3.
69. Leontowicz M, Gorinstein S, Leontowicz H, Krzeminski R, Lojek A, Katrich E ir kt. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *J Agric Food Chem*. 2003; 51 (19): 5780–5.
70. Li P, Ma F, Cheng L. Primary and secondary metabolism in the sun-exposed peel and the shaded peel of apple fruit. *Physiol Plant*. 2013; 148 (1): 9–24.
71. Likhonos A. A survey of the species in the genus *Malus* Mill. *Tr Prikl Bot Genet Sel*. 1974; 52: 16–32.
72. Lim TK. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*. Springer; 2012. p. 413–37.

73. Liu RH, Eberhardt MV, Lee CY. Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. *NYFQ*. 2001; 9 (2): 15–7.
74. Liu M, Qiu B, Jin X, Zhang L, Chen X, Chen G. Determination of estrogens in wastewater using three-phase hollow fiber-mediated liquid-phase microextraction followed by HPLC. *J Sep Sci*. 2008; 31 (4): 622–8.
75. Lu WD, Li BY, YuF, Cai Q, Zhang Z, Yin M ir kt. Quantitative proteomics study on the protective mechanism of phlorizin on hepatic damage in diabetic db/db mice. *Mol Med Rep*. 2012; 5 (5): 1285–94.
76. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (1): 29–38.
77. Mainla L, Moor U, Karp K, Püssa T. The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia. *Zemdirbystē*. 2011; 98 (1): 63–70.
78. Mayr U, Michalek S, Treutter D, Feucht W. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *J Phytopathol*. 1997; 145: (2–3): 69–75.
79. Mayr U, Treutter D, Santos-Buelga C, Bauer H, Feucht W. Developmental changes in the phenol concentrations of ‘Golden Delicious’ apple fruits and leaves. *Phytochemistry*. 1995; 38 (5): 1151–5.
80. Maldonado-Celis ME, Bousserouel S, Gossé F, Lobstein A, Raul F. Apple procyanidins activate apoptotic signaling pathway in human colon adenocarcinoma cells by a lipid-raft independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 388 (2): 372–6.
81. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79 (5): 727–47.
82. Marks SC, Mullen W, Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *J Sci Food Agr*. 2007; 87 (4): 719–28.
83. Masumoto S, Akimoto Y, Oike H, Kobori M. Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Agric Food Chem*. 2009; 57 (11): 4651–6.
84. McGhie TK, Hunt M, Barnett LE. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (8): 3065–70.
85. Meier U, editor. Growth stages of mono and dicotyledonous plants. *BBCH Monograph*. BBCH Monograph. German federal biological research centre for agriculture and forestry, Berlin. 2001, p. 52–53.
86. Micheletti D, Troggio M, Salamini F, Viola R, Velasco R, Salvi S. On the evolutionary history of the domesticated apple. *Nat Genet*. 2011; 43 (11): 1044–5.
87. Murtić S, Čivić H, Đurić M, Paunović G, Šekularac, G., Behmen F ir kt. The content of some antioxidants in apple depends on the type of fertilization. *Pol J Environ Stud*. 2013; 22 (2): 475–80.
88. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 2004; 1054 (1): 95–111.
89. Najafian M, Jahromi MZ, Nowroznejhad MJ, Khajeaian P, Kargar MM, Sadeghi, M ir kt. Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Biol Rep*. 2012; 39 (5): 5299–5306.
90. Navasaitis M. *Dendrologija*. Vilnius. Margi raštai: 2008. p. 538–9.

91. Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 418–25.
92. Noiton DAM, Peter AA. Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. *J Am Soc Hortic Sci.* 1996; 121 (5): 773–82.
93. Ohta T, Morinaga H, Yamamoto T, Yamada T. Effect of phlorizin on metabolic abnormalities in Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *OJAS.* 2012; 2 (2): 113–8.
94. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2 (5): 270–78.
95. Panzella L, Petriccione M, Rega P, Scortichini M, Napolitano A. A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity. *Food Chem.* 2013; 140 (4): 672–9.
96. Pastene E, Speisky H, García A, Moreno J, Troncoso M, Figueroa G. In vitro and in vivo effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem.* 2010; 58 (12): 7172–9.
97. Petkovsek MM, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biol Plant.* 2011; 55 (4): 725–30.
98. Petkovsek MM, Slatnar A, Stampar F, Veberic R. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *J Sci Food Agr.* 2010; 90 (14): 2366–78.
99. Petkovšek MM, Stampar F, Veberic R. Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *J Plant Pathol.* 2008; 90 (1): 49–55.
100. Petkovšek MM, Štampar F, Veberič R. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2009; 74 (1): 60–7.
101. Phipps JB, Robertson KR, Smith PG, Rohrer JR. A checklist of the subfamily *Maloideae* (*Rosaceae*). *Can. J. Bot.* 1990; 68 (10): 2209–69.
102. Picinelli A, Dapena E, Mangas JJ. Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. *J Agric Food Chem.* 1995; 43 (8): 2273–8.
103. Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, Barrera G. The "two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers.* 2010; 2 (2): 338–63.
104. Poitout V, Robertson RP. Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *J Endocrinol* 2002; 143 (2): 339–42.
105. Ponomarenko VV. Review of the species comprised in the genus *Malus* Mill. *Sborn Nauch Tr Prikl Bot Genet Selekt.* 1986; 106: 3–27.
106. Price KR, Prosser T, Richetin AM, Rhodes MJC. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem.* 1999; 66 (4): 489–94.
107. Puel C, Quintin A, Mathey J, Obled C, Davicco MJ, Lebecque P, Kati-Coulibaly S, Horcjada MN, Coxam V. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77 (5): 311–8.
108. Ramirez-Ambrosi M, Abad-Garcia B, Viloria-Bernal M, Garmon-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B. A new ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry analytical strategy for fast analysis and improved characterization of phenolic compounds in apple products. *J Chromatogr A.* 2013; 1316: 78–91.

109. Raudonis R, Raudonė L, Jakštas V, Janulis V. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. *J Chromatogr A*. 2012; 1233: 8–15.
110. Reagan-Shaw S, Eggert D, Mukhtar H, Ahmad N. Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells. *Nutr Cancer*. 2010; 62 (4): 517–24.
111. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010; 49 (11): 1603–16.
112. Robinson JP, Harris SA, Juniper BE. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Syst Evol*. 2001; 226 (1–2): 35–8.
113. Rogers EJ, Mihalik S, Ortiz D, Shea T. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *J Nutr Health Aging*. 2004; 8 (2): 92–7.
114. Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau JF. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J Agric Food Chem*. 1999; 47 (12): 4847–53.
115. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81 (1): 215S–17S.
116. Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2001; 910 (2): 265–73.
117. Schieber A, Keller P, Streker P, Klaiber I, Carle R. Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. “Bretacher”) by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. *Phytochem Anal*. 2002; 13 (2): 87–94.
118. Sekmokiėnė D, Liutkevičius A, Malakauskas M. Funkcionalusis maistas ir jo veikliosios dalys. *Vet Zootech Lith*. 2007; 37 (59): 72–78.
119. Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, de Carvalho A ir kt. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties–Correlation of response with composition. *Food Chem*. 2012; 135 (4): 2378–86.
120. Shen CL, von Bergen V, Chyu MC, Jenkins MR, Mo H, Chen ir kt. Fruits and dietary phytochemicals in bone protection. *Nutr Res*. 2012; 32 (12): 897–910.
121. Slatnar A, Stampar F, Veberic R. Influence of bicarbonate salts, used against apple scab, on selected primary and secondary metabolites in apple fruit and leaves. *Sci Hort*. 2012; 143: 197–204.
122. Snarskis P. Obelis – *Malus* Miller. In: Lietuvos TSR flora, 4. Vilnius: Lietuvos TSR Mokslų Akademija, Botanikos institutas; 1971. p. 232–45.
123. Suárez B, Álvarez ÁL, García YD, del Barrio G, Lobo AP, Parra F. Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace. *Food Chem*. 2010; 120 (1), 339–42.
124. Sun S, Xin L, Gao H, Wang J, Li P. Response of phenolic compounds in ‘Golden Delicious’ and ‘Red Delicious’ apples peel to fruit bagging and subsequent sunlight re-exposure. *Sci Hortic*. 2014; 168: 161–7.
125. Šavikin K, Živković J, Zdunić G, Gođevac D, Đorđević B, Dojčinović B ir kt. *J Food Compos Anal*. 2014; 35 (2): 101–11.
126. Thilakarathna SH, Rupasinghe HPV, Needs PW. Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit *in vitro* human LDL cholesterol oxidation. *Food Chem*. 2013; 138 (1): 463–70.

127. Treutter D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* 2001; 34 (1): 71–89.
128. Tsao R, Deng Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B.* 2004; 812 (1): 85–99.
129. Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem.* 2003; 51 (21): 6347–53.
130. Urbonavičiūtė A, Jakštas V, Kornysšova O, Janulis V, Maruška A. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *J Chromatogr A.* 2006; 1112 (1–2): 339–44.
131. Valavanidis A, Vlachogianni T, Psomas A, Zovoili A, Siatas V. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *Int J Food Sci Tech.* 2009; 44 (6): 1167–75.
132. Van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WMF. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agric Food Chem.* 2001; 48 (8): 3606–13.
133. Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F ir kt. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog.* 2006; 45 (3): 164–74.
134. Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A ir kt. The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nat Genet.* 2010; 42 (10): 833–39.
135. Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J Agric Food Chem.* 2004; 52 (21): 6532–38.
136. Weichselbaum E, Wyness L, Stanner S. Apple polyphenols and cardiovascular disease—a review of the evidence. *Nutrition Bulletin.* 2010; 35 (2): 92–101.
137. Wojdyło A, Oszmiański J, Laskowski P. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J Agric Food Chem.* 2008; 56 (15): 6520–30.
138. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.* 2003; 51 (3): 609–14.
139. Wu J, Gao H, Zhao L, Liao X, Chen F, Wang Z. ir kt. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.* 2007; 103 (1): 88–93.
140. Zhang Y, Li P, Cheng L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh. *Food Chem.* 2010; 123 (4): 1013–8.
141. Zhang SY, Li BY, Li XL, Cheng M, Cai Q, Yu F ir kt. Effects of phlorizin on diabetic retinopathy according to isobaric tags for relative and absolute quantification–based proteomics in db/db mice. *Mol Vis.* 2013; 19: 812–21.
142. Zhao H, Yakar S, Gavriloova O, Sun H, Zhang Y, Kim H. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53 (11): 2901–9.
143. Zheng HZ, Kim YI, Chung SK. A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. *Food Chem.* 2012; 131 (1): 106–10.

DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje „Tomson Reuters Web of Knowledge“ ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. M. Liaudanskas, P. Viškelis, V. Jakštas, R. Raudonis, D. Kviklys, A. Milašius, V. Janulis. Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. E-Journal of Chemistry. 2014; 2014, ID 542121.
2. D. Kviklys, M. Liaudanskas, V. Janulis, P. Viškelis, M. Rubinskienė, J. Lanauskas, N. Uselis. Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. Plant, soil and environment. 2014; 60 (5): 234–240.
3. M. Liaudanskas, P. Viškelis, R. Raudonis, D. Kviklys, N. Uselis, V. Janulis. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. The Scientific World Journal. 2014; 2014: 1–10.

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse:

1. M. Liaudanskas, P. Viškelis, V. Janulis. Polifenoliniai junginiai obuoliuose: cheminė sudėtis, struktūros ypatumai, biologinis poveikis (apžvalga). Sodininkystė ir daržininkystė. 2012, 31 (1–2): 3–17.

Straipsniai recenzuojamoje tarptautinės konferencijos medžiagoje:

1. D. Kviklys, P. Viškelis, M. Rubinskienė, N. Kviklienė, J. Lanauskas, V. Janulis. Rootstock affects apple fruit biochemical content: preliminary results. Acta Horticulturae 1058: „Xth International Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems” Stellenbosch, Pietų Afrika; 2014; 87 (1): 595–598.

Konferencijų tezės:

1. M. Liaudanskas, R. Raudonis, V. Jakštas, P. Viškelis, D. Kviklys, J. Lanauskas, N. Kviklienė, V. Janulis. Determination of polyphenolic composition in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. 7th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2012 „Inovative and Healthy Food for Consumers“. 2012 m. gegužės 17 d. Kaunas.
2. D. Kviklys, J. Lanauskas, P. Viškelis, M. Rubinskienė, N. Kviklienė, M. Liaudanskas, V. Janulis. Rootstock affects apple fruit biochemical content: preliminary results. Orchard Systems 2012 – Xth International

- Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems. 2012 m. gruodžio 3–6 d. Stelenbosas, Pietų Afrika.
3. J. Lanauskas, D. Kviklys, N. Kviklienė, N. Uselis, P. Viškelis, M. Liaudanskas, J. Viškelis. Effect of soil maintenance on apple tree nutrition and productivity in organic orchard. Orchard Systems 2012 – Xth International Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems. 2012 m. gruodžio 3–6 d. Stelenbosas, Pietų Afrika.
 4. M. Liaudanskas, V. Žvikas, P. Viškelis, V. Janulis. Obelių (*Malus domestica* Borkh.) lapų ėminių flavonoidų ekstrakcijos sąlygų optimizavimas. VI nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija "Mokslas – sveikatai". 2013 m. balandžio 5 d. Kaunas.
 5. M. Liaudanskas, R. Raudonis, V. Jakštas, P. Viškelis, D. Kviklys, J. Lanauskas, N. Kviklienė, V. Janulis. Evaluation of Phenolic Compounds in Apple (*Malus domestica* Borkh.) Fruits. 2013 m. gegužės 18 d. Kaunas.
 6. M. Liaudanskas, P. Viškelis, D. Kviklys, R. Raudonis, J. Lanauskas, J. Viškelis, V. Janulis. Determination of chlorogenic acid and flavonoids of selected apple cultivars grown in Lithuania. 2014 m. balandžio 24–25 d. Viena, Austrija.
 7. M. Liaudanskas, P. Viškelis, D. Kviklys, R. Raudonis, J. Lanauskas, J. Viškelis, V. Janulis. Determination of chlorogenic acid and flavonoids of selected apple cultivars grown in Lithuania. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2014 „Inovative and Healthy Food for Consumers“. 2014 m. gegužės 8–9 d. Jelgava, Latvija.
 8. M. Liaudanskas. Composition of phenolic compounds in apple fruits grown in Lithuania. Young Scientists Meeting "Trends in Natural Products Research". 2014 m. birželio 23–25 d. Olomoucas, Čekijos Respublika.

Research Article

Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars

Mindaugas Liaudanskas,¹ Pranas Viškelis,² Valdas Jakštas,¹ Raimondas Raudonis,¹ Darius Kviklys,² Arvydas Milašius,¹ and Valdimaras Janulis¹

¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickevičiaus Street 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania

² Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno Street 30, Babtai, LT-54333 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Mindaugas Liaudanskas; m.liaudanskas@yahoo.com

Received 23 January 2014; Revised 19 March 2014; Accepted 2 April 2014; Published 24 April 2014

Academic Editor: Maria Luisa Serralheiro

Copyright © 2014 Mindaugas Liaudanskas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A specific analytical procedure including sample preparation and HPLC analysis was developed and validated for the detection of phenolic compounds in the samples of different apples from popular Lithuanian cultivars "Aldas," "Auksis," "Ligol," and "Šampion." The conditions for phenol extraction were optimized: the solvent of the extraction was 70% (v/v) ethanol, and the extraction was performed in an ultrasound bath for 20 min at the temperature of 40°C. The HPLC mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water and 100% (v/v) acetonitrile. Using the HPLC technique, 11 analytes were identified, and their specificity was confirmed: procyanidin B1, (+)-catechin, chlorogenic acid, procyanidin B2, (–)-epicatechin, rutin, hyperoside, isoquercitrin, avicularin, quercitrin, and phloridzin. Chlorogenic acid was the major component in "Aldas," "Auksis," and "Ligol" and procyanidin B2 in "Šampion." Hyperoside and avicularin were the dominant compounds of all the identified quercetin derivatives in "Aldas" and "Auksis;" hyperoside in "Šampion;" and quercitrin in "Ligol." The total content of phenolic compounds varied from 1641.0 ± 47.9 µg/g (cv. "Ligol") to 4291.3 ± 154.2 µg/g (cv. "Aldas").

1. Introduction

In Lithuania—like in the whole Eastern European region—apples are among the main vegetal food sources rich in phenolic compounds. The Lithuanian Health Program indicates that the nutrition of school-age children should be supplemented with such local vegetal products as apples, carrots, and pears [1]. Using more variable cultivars of fruit in the nutrition of adult and children population is advised. A greater variety of biologically active compounds in fruit is associated with lower mortality [2].

Numerous studies have confirmed the benefit of phenolic compounds for human health. Studies have shown that different groups of phenolic compounds as well as their individual components have a specific effect on different physiological systems. Phenolic compounds in apples have an

antiviral effect against *Herpes simplex* strains and the flu virus [3, 4], and they suppress cell proliferation [5], reduce blood levels of triglycerides and low density lipoproteins [6], and thus are useful in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. Polyphenolic compounds protect the gastrointestinal mucosa and may be used as a preventive measure against adverse effects of anti-inflammatory drugs [7]. Phenolic compounds in apples may be potentially useful in protecting the lungs against damage from cigarette smoke [8] as well as for the prevention of Alzheimer's disease [9]. Based on these results of scientific studies, it is expedient to concretize the available knowledge about the distribution of phenolic compounds in apples from popular Lithuanian cultivars.

A reliable analytical instrument is required in order to obtain detailed results in the analysis of the phytochemical composition of the apples. The techniques of the qualitative

and quantitative analyses of the content of phenolic compounds in apples described in literature sources may not always be suitable for implementation in other laboratories. Because of possible differences in the phytochemical composition of the apples, these techniques may be unsuitable for the analysis of local cultivars. Because of this, a detailed scientific analysis requires the redevelopment of sample preparation and mobile phase gradients of the techniques designed in other laboratories. The need for the development of a novel technique was confirmed by our preliminary attempts to adapt the techniques found in scientific literature sources; these attempts did not yield the desired results. For this reason, the aim was set to develop, optimize, and validate the suitable HPLC technique for the detection of phenolic compounds in the lyophilized apple samples of the cultivars "Aldas," "Auksis," "Ligol," and "Šampion" grown in Lithuania.

2. Materials and Methods

2.1. Apples. The following apple cultivars were included in the study: "Aldas," "Auksis," "Ligol," and "Šampion;" the apples were harvested in 2011. The apples were supplied by the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania (55°60'N, 23°48'E). The altitude of Babtai town is 57 m above sea level. The year 2011 was warmer than usual higher; the mean monthly temperatures were higher than the long-term average. The summer of 2011 was distinguished by more rainfall in July and especially in August when double the normal monthly rainfall was recorded. Trees were trained as slender spindle. Pest and disease management was carried out according to the rules of the integrated plant protection. The experimental orchard was not irrigated. Tree fertilization was performed according to soil and leaf analysis. Nitrogen was applied before flowering at the rate of 80 kg/ha, and potassium was applied after harvest at the rate of 90 kg/ha. Soil conditions of the experimental orchard were the following: clay loam, pH: 7.3, humus: 2.8%, P_2O_5 : 255 mg/kg, and K_2O : 230 mg/kg. The apple cultivars "Auksis" (early winter cv., bred in Lithuania), "Šampion" (winter cv., bred in Czech Republic), and "Ligol" (winter cv., bred in Poland) are the main cultivars in Lithuanian commercial orchards. The cv. "Aldas" (early winter cv., bred in Lithuania) is recommended for ecological orchards. Apples were harvested at the optimal harvest time individually established for every cultivar: "Aldas": 128 DAFB, "Auksis": 114 DAFB, "Ligol": 168 DAFB, and "Šampion": 132 DAFB. The sample size comprised 20 ripe apples of each cultivar.

Each apple was cut into the slices of equal size (up to 1 cm in thickness), and the stalks and the seeds were removed. The apple slices were immediately frozen in a freezer (at -35°C) with air circulation and then lyophilized with a ZIRBUS sublimator 3 $\times$ 4 $\times$ 5/20 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany) at the pressure of 0.01 mbar (condenser temperature, -85°C). The lyophilized apple slices were ground to fine powder by using a Retsch 200 mill (Haan, Germany).

Loss on drying before analysis was determined by drying the apple lyophilizate in a laboratory drying oven to complete

evaporation of water and volatile compounds (temperature: 105°C ; the difference in weight between measurements: up to 0.01 g) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying [10]. The data were recalculated for absolute dry lyophilizate weight.

2.2. Chemicals. All the solvents, reagents, and standards used were of analytical grade. Aluminum trichloride hexahydrate, hexamethylenetetramine, acetonitrile, acetone, methanol, and acetic and trifluoroacetic acids were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland), and ethanol from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Hyperoside, rutin, quercitrin, phloridzin, procyanidinB1 and procyanidin B2, and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France), (+)-catechin and (-)-epicatechin from Fluka (Buchs, Switzerland), and avicularin and isoquercitrin from Chromadex (Santa Ana, USA). In the study, we used deionized water produced by the Crystal E HPLC (Adrona SIA, Riga, Latvia) water purification system.

2.3. Extraction. An amount of 2.5 g of lyophilized apple powder (exact weight) was weighed, added to 30 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) for 20 minutes at 40°C . The conditions of extraction (the type of the extraction, its duration, temperature, and the solvent and its concentration) were chosen considering the results of the optimization of the extraction. The extract obtained was filtered through a paper filter; the apple lyophilizate on the filter was washed twice with 10 mL of ethanol (70%, v/v) in a 50 mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of $0.22\ \mu\text{m}$ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

2.4. Determination of the Total Flavonoid Content. The total flavonoid content in the extracts of lyophilized apple samples was determined by applying the technique described by Urbonavičiute et al. [11], was calculated using the rutin calibration curve, and was expressed as its equivalent (mg RE/g) for absolute dry lyophilizate weight.

2.5. Instrumentation and Chromatographic Conditions. A Waters 2695 chromatograph equipped with a Waters 2998 PDA detector (Waters, Milford, USA) was used for HPLC analysis. Chromatographic separation was managed, chromatograms were recorded, and data were processed with the Empower v.2.0 software (Waters, Milford, USA). Chromatographic separations were carried out by using a YMC-Pack ODS-A ($5\ \mu\text{m}$, C_{18} , $250 \times 4.6\ \text{mm i.d.}$) column equipped with a YMC-Triart ($5\ \mu\text{m}$, C_{18} , $10 \times 3.0\ \text{mm i.d.}$) precolumn (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Germany). The column was operated at a constant temperature of 25°C . The volume of the extract being investigated was $10\ \mu\text{L}$. The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 minutes, 3–15% B; 30–45 minutes, 15–25% B; 45–50 minutes, 25–50% B; and

50–55 minutes, 50–95% B. The total duration of the analysis, including washing and reconditioning of the column, was 70 minutes. The identification of the chromatographic peaks was achieved by comparing the retention times and spectral characteristics ($\lambda = 200\text{--}600\text{ nm}$) of the eluting peaks with those of the reference compounds. The compounds identified were confirmed by spiking the sample with the standard compound and monitoring the changes in the peak shape and spectral characteristics. For quantitative analysis, a calibration curve was obtained by the injection of known concentrations of different standard compounds. The concentrations of phenolic compounds identified in the apple extracts were within the limits of the calibration curves. Dihydrochalcones and flavan-3-ols were quantified at 280 nm, phenolic acids at 320 nm, and flavonols at 360 nm.

2.6. Statistical Data Analysis. All the experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations were calculated with SPSS 20.0 software (Chicago, USA). A single factor analysis of variance (ANOVA) along with the post-hoc Tukey's test was employed for statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to examine the normality of the distribution. To verify the hypothesis about the equality of variances, Levene's test was employed. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of the Extraction Method. The selection of the solvent and the conditions of extraction is an important analytical step in the development of the technique for the qualitative and quantitative analysis of the biologically active compounds in raw plant material. The solvent of the extraction is the main factor in the prognosis of the qualitative and quantitative composition of the isolated phenolic compounds. The extractants most commonly used for the extraction of flavonoid glycosides, their more polar aglycones, and polar phenolic acids are methanol, ethanol, acetone, and their various aqueous mixtures of various concentrations [12, 13].

To evaluate the effect of the extractant on the extraction of flavonoids, the lyophilized apple samples were macerated for 4 hours in the dark, and the total content of flavonoids was determined by using spectrophotometry [11]. The extractants selected for the study were methanol, ethanol, and acetone, used at various concentrations. The study showed that 70% (v/v) ethanol ensured the highest flavonoid output ($2.7 \pm 0.1\text{ mg RE/g}$) (Figure 1). This extractant was selected for further analysis.

Two techniques ensuring selective extraction of the phenolic compounds from solid-phase samples were chosen for comparative studies of the effectiveness of the extraction techniques: maceration and ultrasound extraction (sonication). During the maceration of the samples at room temperature in dark environment at different time intervals (0.5–24 hours), the highest total flavonoid content ($3.2 \pm 0.1\text{ mg RE/g}$) was registered after 24-hour extraction (Figure 2). To evaluate the effectiveness of sonification, apple samples were extracted in an ultrasound bath for 5–90 min at different temperatures

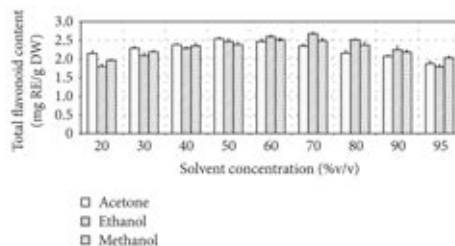


FIGURE 1: The total content of flavonoids in apple samples, using extractants at various concentrations.

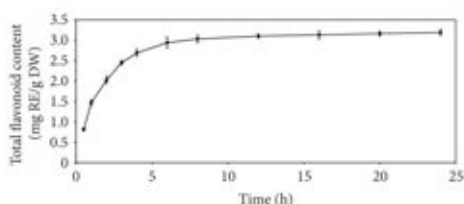


FIGURE 2: The total extracted flavonoid content when macerating apple samples at different time intervals.

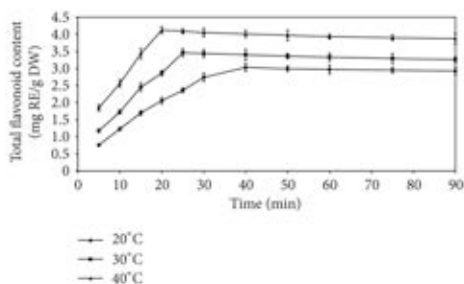


FIGURE 3: The total extracted flavonoid content when extracting apple samples in an ultrasound bath at different time intervals at the temperature of 20–40°C.

(20–40°C). The greatest extraction output ($4.1 \pm 0.2\text{ mg RE/g}$) was observed after extraction of the apple samples for 20 min at the temperature of 40°C (Figure 3).

The analysis showed that the greatest amount of flavonoids ($4.1 \pm 0.2\text{ mg RE/g}$) from lyophilized apple samples was extracted with 70% (v/v) ethanol in an ultrasound bath after 20 minutes of extraction at the temperature of 40°C. These conditions were selected for further analysis, the extraction from lyophilized samples of different apple cultivars.

TABLE I: Characteristics of the quantitative evaluation of phenolic compounds.

Compound	Retention time (min) ^a	Wavelength (nm)	Confirmed linearity range (µg/mL)	Calibration equation ^b	Determined quantitation limit (µg/mL)	R ²
Procyanidin B1	15.6	280	6.25–100	$y = 7.33 \times 10^3 x + 5.49 \times 10^3$	2.64	0.9998
(+)-Catechin	19.7	280	5–80	$y = 7.00 \times 10^3 x - 1.87 \times 10^3$	2.20	0.9999
Chlorogenic acid	20.7	320	6.25–100	$y = 2.68 \times 10^4 x - 3.02 \times 10^4$	2.93	0.9999
Procyanidin B2	22.9	280	6.25–100	$y = 5.58 \times 10^3 x + 7.15 \times 10^3$	2.86	0.9998
(-)-Epicatechin	27.3	280	5–80	$y = 7.53 \times 10^3 x + 1.19 \times 10^3$	2.22	0.9999
Hyperoside	40.0	360	5–80	$y = 2.23 \times 10^4 x - 1.01 \times 10^4$	2.42	0.9999
Isoquercitrin	40.1	360	3.125–50	$y = 2.66 \times 10^4 x - 2.10 \times 10^4$	1.54	0.9999
Rutin	39.5	360	3.125–50	$y = 1.47 \times 10^4 x - 7.66 \times 10^3$	2.79	0.9998
Quercitrin	44.5	360	2.5–40	$y = 1.77 \times 10^4 x - 5.57 \times 10^3$	2.19	0.9998
Avicularin	43.9	360	3.125–50	$y = 2.32 \times 10^4 x - 1.12 \times 10^4$	2.56	0.9998
Phloridzin	47.6	280	3.125–50	$y = 1.85 \times 10^4 x - 7.09 \times 10^3$	2.40	0.9998

^aThe mean was calculated from 6 replicates.^b x in the calibration equation indicates the concentration of a compound, and y indicates a peak area.

3.2. Development and Optimization of Chromatographic Separation. A broad variety of analytical methods have been employed for the detection of phenolics in raw plant materials and their products. Thin-layer and high-performance thin-layer chromatography, mass, infrared, and ultraviolet spectroscopy, and other analytical methods have been applied for the qualitative analysis of phenolics [14, 15]. For the quantitative evaluation of phenolic compounds in plant matrices, HPLC and UV-visible absorption spectrophotometry are the most widely used methods; capillary zone electrophoresis is applied less frequently [16].

Experiments during the development stage showed that a better chromatographic separation was achieved by using the YMC-Pack ODS-A column (5 µm, C₁₈, 250 × 4.6 mm i.d.) and selecting acetonitrile rather than methanol as an organic component. For acidification (solvent A), two organic acids were selected: 2% acetic acid and 0.1% trifluoroacetic acid. A better separation of the analytes was achieved by using 2% acetic acid rather than 0.1% trifluoroacetic acid; therefore, 2% acetic acid was used for further experiments. The application of acetic acid to acidify the mobile phase has been reported in other studies that investigated phenolic compounds in apples [3, 17, 18].

The method of gradient elution for the separation of phenolic compounds (quercetin derivatives, flavan-3-ols, phenolic acids, and dihydrochalcones) in ethanol extracts of lyophilized apple samples was optimized. This method allows for an effective separation of phenolic compounds present in lyophilized apple extracts. The elution order of quercetin-3-O-glycosides—also reported in other studies [17, 19, 20]—was as follows: quercetin-3-O-rutinoside (rutin), quercetin-3-O-galactoside (hyperoside), quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin), quercetin-3-O-arabinoside (avicularin), and quercetin-3-O-rhamnoside (quercitrin). The values of resolution ($R_s > 2$) were achieved in all the samples of standard solutions and extracts. Optimization of the HPLC method allowed for an effective separation of quercetin glycosides:

the separation of rutin and hyperoside in ethanol extracts of lyophilized apple samples with the resolution of 2.59; the separation of hyperoside and isoquercitrin with the resolution of 3.12; and the separation of avicularin and quercitrin with the resolution of 2.83.

The chromatograms of ethanol extracts of apple samples at different wavelengths (280, 320, and 360 nm) are depicted in Figure 4.

3.3. Validation of the Method. The validation of the method was performed on the basis of the ICH recommendations [21]. The following characteristics of validation were evaluated: the selectivity of the method (specificity), the repeatability of the results (precision), the quantitation limit of the analytes, and linearity.

The evaluation of the selectivity of the method for peak identification and purity was based on the comparison of the retention times and UV spectra of the analytes with those of the standard compounds. The compounds identified were confirmed by adding the standard compound into the analyzed extract and monitoring the changes in the peak shape and spectral characteristics.

The quantitation limit of the analytes was assessed by comparing the peak height to the baseline noise. The ratio of the peak height to baseline noise (signal-to-noise ratio) used for the estimation of the quantitation limit was 10:1. The determined quantitation limit varied from 1.54 µg/mL to 2.93 µg/mL. The obtained results confirm that this method can be used for the quantitative analysis of phenolic compounds. The estimated determination coefficients (R^2) of calibration curves were greater than 0.999, and this proves the linearity of the quantitative determination method (Table I).

The precision of the HPLC method was assessed on the basis of two parameters: repeatability and intermediate precision. The repeatability of the results was evaluated on the basis of the results of consecutive analyses performed

TABLE 2: Precision of the HPLC method for the quantitative evaluation of phenolic compounds.

Compound	Relative standard deviation (%) for the peak area		
	Intraday ^a	Interday ^b	Extraction after extraction
Procyanidin B1	1.32	2.39	3.77
(+)-Catechin	1.49	2.26	3.56
Chlorogenic acid	1.22	1.45	3.47
(-)-Epicatechin	1.52	2.35	3.92
Procyanidin B2	1.40	2.51	2.42
Hyperoside	1.38	2.61	2.77
Isoquercitrin	1.26	2.07	2.36
Rutin	1.37	2.44	2.71
Quercitrin	1.46	2.54	3.27
Avicularin	1.42	2.60	2.52
Phloridzin	1.48	2.76	3.61

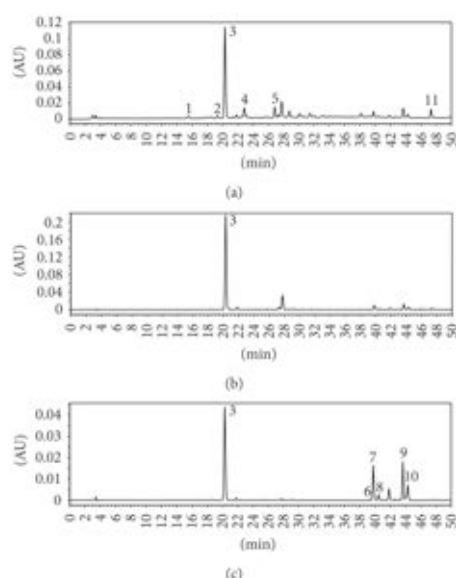
^aRepeatability.^bIntermediate precision.

FIGURE 4: Chromatograms of ethanol extracts of the investigated apple samples (cv. "Aldas"): (a) $\lambda = 280$ nm; (b) $\lambda = 320$ nm; (c) $\lambda = 360$ nm. Numbers indicate the peaks of analytes: 1: procyanidin B1; 2: (+)-catechin; 3: chlorogenic acid; 4: procyanidin B2; 5: (-)-epicatechin; 6: rutin; 7: hyperoside; 8: isoquercitrin; 9: avicularin; 10: quercitrin; and 11: phloridzin.

within the same day (6 consecutive analyses of a mixture of standards at 3 different concentrations performed within the same day). The percent relative standard deviation (%RSD) of the repeatability of the method, determined according to

the peak area, varied from 1.22% (chlorogenic acid) to 1.52% ((-)-epicatechin). The intermediate precision of the results was assessed based on the results of analyses performed within 3 different days (6 consecutive analyses of a mixture of standards at the mean concentration performed within the same day; 18 analyses in total), and its %RSD for the peak area varied from 1.45% (chlorogenic acid) to 2.76% (phloridzin). Extraction after the extraction of the lyophilized apple sample was performed. A set of 6 ethanol extracts was produced from the same lyophilized apple sample and was analyzed by applying the developed and optimized HPLC method. The estimated %RSD for the peak area did not exceed 3.92%. The obtained results describing the precision of developed HPLC method are summarized in Table 2.

3.4. Identification of Phenolic Compounds in Lyophilized Apple Samples. Apples are among the most popular fruits consumed worldwide [22]. They are a source of various biologically active substances, especially vitamins and phenolic compounds [23]. Apples contain phenolic compounds of different classes: flavonols (quercetin and isorhamnetin glycosides), dihydrochalcones (phloretin glycosides), flavan-3-ols (catechins [monomeric flavan-3-ols] and procyanidins [polymeric flavan-3-ols]), anthocyanins (cyanidin glycosides, especially cyanidin galactoside), and phenolic acids (mostly, chlorogenic acid) [24–26].

Considering the dietary habits of apple consumption, it is relevant to analyze apples without separating their peel from the flesh. As the chemical composition of the apples of different cultivars can vary considerably [26, 27], it is very important to compare and assess the chemical composition of the unpeeled apples of different cultivars and to evaluate their quality, as apples are used in diet, prevention of various diseases, preparation of safe and healthy foods, and development and production of dietary supplements. The above-mentioned circumstances allow for the development of analytical methods and the analysis of apples.

TABLE 3: Content of phenolic compounds in ethanol extracts obtained from the apples of cultivars grown in Lithuania (expressed for absolute dry lyophilizate weight).

Compound	Amount of phenolic compounds in different cultivars ^a , µg/g			
	"Aldas"	"Auksis"	"Ligol"	"Šampion"
Procyanidin B1	95.7 ^a	108.1 ^b	39.6 ^c	83.2 ^d
(+)-Catechin	145.7 ^a	148.2 ^b	50.1 ^c	129.7 ^d
Chlorogenic acid	2228.4 ^a	1618.8 ^b	687.2 ^c	341.3 ^d
Procyanidin B2	658.8 ^a	454.5 ^b	320.9 ^c	931.2 ^d
(-)-Epicatechin	447.6 ^a	299.1 ^b	236.5 ^c	684.0 ^d
Rutin	16.4 ^a	12.6 ^b	14.8 ^c	12.8 ^d
Hyperoside	191.2 ^a	52.4 ^b	68.3 ^c	137.3 ^d
Isoquercitrin	40.3 ^a	26.2 ^b	25.7 ^c	34.1 ^d
Avicularin	194.2 ^a	58.8 ^b	52.7 ^c	81.2 ^d
Quercitrin	130.6 ^a	44.6 ^b	76.7 ^c	70.0 ^d
Phloridzin	142.4 ^a	90.7 ^b	68.5 ^c	63.8 ^d
Total	4291.3	2914.0	1641.0	2568.6

^aValues are mean ($n = 3$). The different letters indicate significant differences between the values ($P < 0.05$).

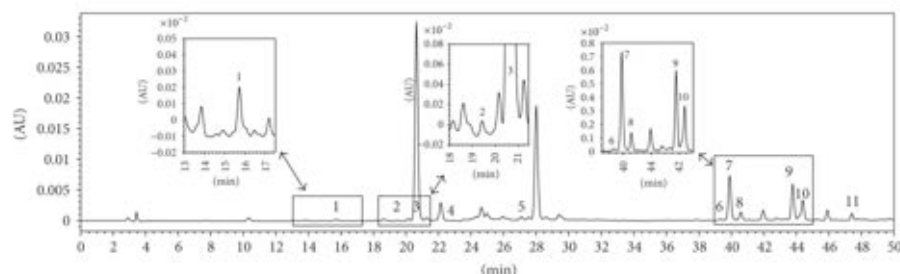


FIGURE 5: Chromatogram of the ethanol extract of the investigated apple fruit sample ($\lambda = 320$ nm, cv. "Šampion"). Numbers indicate the peaks of analytes: 1: procyanidin B1; 2: (+)-catechin; 3: chlorogenic acid; 4: procyanidin B2; 5: (-)-epicatechin; 6: rutin; 7: hyperoside; 8: isoquercitrin; 9: avicularin; 10: quercitrin; and 11: phloridzin.

In this study, the developed, optimized, and validated HPLC method was applied to investigate ethanol extracts of lyophilized apple samples. The content of phenolic compounds in the apples of cultivars "Aldas," "Auksis," "Ligol," and "Šampion" was qualitatively and quantitatively analyzed and determined. An example of the chromatogram of the ethanol extract of the apple fruit sample is shown in Figure 5, and Table 3 summarizes the characteristics of the quantitative content.

The following compounds of different phenolic groups were identified in the investigated ethanol extracts: procyanidin B1, (+)-catechin, chlorogenic acid, procyanidin B2, (-)-epicatechin, rutin, hyperoside, isoquercitrin, avicularin, quercitrin, and phloridzin. Neochlorogenic acid, gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, sinapic acid, isorhamnetin-3-O-glucoside, rosmarinic acid, transcinnamic acid, eupatorin-5-methyl ether, sinensetin, and protocatechuic acid in apples or

their products were detected by other authors [17, 28–30], but they were not found in the analyzed extracts.

Chlorogenic acid was the major component in the apples of the cultivars "Aldas," "Auksis," and "Ligol." This acid has properties important for human health: antioxidant activity [31], anti-inflammatory activity [32], the reduction of the risk of type 2 diabetes [33], the improvement of cardiovascular function [34], and the inhibition of the processes of carcinogenesis [35, 36]. The apples of the cv. "Aldas" contained the highest concentration of chlorogenic acid, and it was by 6.5-fold greater than that in the apples of the cv. "Šampion" (Table 3). The results confirm the findings of other studies indicating that chlorogenic acid in apples is one of the most common phenolic compounds [26, 27].

In the studied extracts of apple samples, we detected and quantitatively evaluated monomeric flavan-3-ols: (+)-catechin and (-)-epicatechin (Table 3), which together with

procyanidins may be responsible for the cholesterol lowering [37] and vasodilating [38] effect of the apples; they also inhibit sulfotransferases, thus can regulate the biological activity of hydroxysteroids, and can act as natural chemopreventive agents [39].

The amount of the identified monomeric flavan-3-ols varied from $286.6 \pm 11.4 \mu\text{g/g}$ (cv. "Ligol") to $813.7 \pm 36.0 \mu\text{g/g}$ (cv. "Šampion"). The highest concentration of (-)-epicatechin was identified in the apple fruits of the cv. "Šampion." It was by 2.9-fold greater than its lowest concentration in the apple fruits of the cv. "Ligol." The concentration of (+)-catechin in the apples of the cv. "Aukis" was by 3-fold greater than its lowest concentration in the apples of the cv. "Ligol." Literature reports that apples contain considerably greater amounts of (-)-epicatechin than (+)-catechin [23, 40], and this is in agreement with the results of our study. The ratio of (+)-catechin to (-)-epicatechin in the ethanol extracts of different cultivar apple samples varied in the range from 1:2.0 (cv. "Aukis") to 1:5.3 (cv. "Šampion").

Duda-Chodak et al. analyzed the lyophilized apple extracts of the cv. "Šampion" by HPLC. The results of their study showed that the analyzed extracts contained lower amounts of monomeric flavan-3-ols: on the average, $221.7 \mu\text{g/g}$ of (-)-epicatechin and $12.2 \mu\text{g/g}$ of (+)-catechin [41]. Different apple cultivation and fertilization approaches could contribute to the differences in their quantitative composition; the impact of meteorological and geographical factors cannot be excluded either.

The compounds of the procyanidin (oligomeric flavan-3-ol) class have been identified in the plants of the family Rosaceae [42] and in various apple cultivars [24, 40]. Procyanidins isolated from apples have an antineoplastic effect [43], a strong antioxidant effect [44], an anti-inflammatory effect [45], a cholesterol- and triglyceride-lowering effect [37], and a positive effect on the cardiovascular system [46, 47], and therefore they are among the most promising phenolic compounds in apples. In the present study, procyanidins B1 and B2 were identified and quantified in the ethanol extracts of apple fruit samples. Table 3 shows their quantitative content.

The amount of the identified procyanidins varied from $360.5 \pm 12.6 \mu\text{g/g}$ (cv. "Ligol") to $1014.4 \pm 43.9 \mu\text{g/g}$ (cv. "Šampion"). The data in Table 3 show that procyanidin B2 was the major compound in the ethanol extracts of cv. "Šampion" apples, and its concentration was by 2.9 times greater than the lowest concentration of procyanidin B2 found in the ethanol extracts of cv. "Ligol" apple samples. Contrary to other 3 cultivars, procyanidin B2 rather than chlorogenic acid was a dominant compound in the ethanol extracts of cv. "Šampion" apples.

Ethanol extracts of lyophilized apple samples of all the analyzed cultivars contained higher concentrations of procyanidin B2 than those of procyanidin B1 (Table 3). Similar quantitative characteristics of these compounds in the extracts of apple samples have also been found by other researchers [26, 41, 48]. The ratio of procyanidin B1 to procyanidin B2 in the ethanol extracts of different cultivar

apple samples varied in the range from 1:4.2 (cv. "Aukis") to 1:11.2 (cv. "Šampion"). These data confirm the importance of the cultivar as a factor for the quantitative composition of apples.

In the investigated ethanol extracts of apple samples, quercetin glycosides were the most abundant group of phenolic compounds. Quercetin glycosides together with compounds of the flavan-3-ol group are most responsible for the antioxidant effect of the complex of phenolic compounds in apples [44]. The consumption of products rich in quercetin glycosides reduces the risk of cancer and neurodegenerative diseases [49, 50]. Quercetin glycosides inhibit the angiotensin-converting enzyme and therefore have an antihypertensive effect [46].

The following quercetin derivatives were identified and determined quantitatively: rutin, hyperoside, isoquercitrin, avicularin, and quercitrin. The total content of these quercetin glycosides varied from $168.5 \pm 5.0 \mu\text{g/g}$ (cv. "Aukis") to $532.3 \pm 19.3 \mu\text{g/g}$ (cv. "Aldas").

The triplet of quercetin glycosides, namely, rutin, hyperoside, and isoquercitrin, where hyperoside was a predominant component and the concentration of rutin was the lowest, was found to be characteristic of all apple cultivars analyzed in our study. This is in line with the results of other studies [17, 20, 51] and therefore suggests that the rutin-hyperoside-isoquercitrin triplet (where hyperoside predominates and the concentration of rutin is relatively low)—along with the compounds of the dihydrochalcone class—could be considered as one of the characteristic features of the phytochemical composition of apples allowing for the identification of apple products.

The rutin-hyperoside-isoquercitrin ratio varied depending on the apple cultivar. It was 1:11.6:2.5 in the ethanol extracts of cv. "Aldas" apples; 1:4.2:2.1—in cv. "Aukis" apples; 1:4.6:1.7—in cv. "Ligol" apples; and 1:10.7:2.7—in cv. "Šampion" apples.

The data in Table 3 show that the apple samples of the cv. "Aldas" contained the highest levels of all the identified flavonols. The concentration of hyperoside in this cultivar was by 3.7-fold greater than that in the cv. "Aukis." The concentration of isoquercitrin in the apples of the cv. "Aldas" was by 1.6-fold greater than that in the apples of the cv. "Ligol." The concentration of avicularin in the apples of the cv. "Aldas" was by a 3.7-fold higher, compared to the lowest concentration of avicularin found in the apples of the cv. "Ligol." The concentration of quercitrin found in the apples of the cv. "Aldas" was by 2.9 times higher than the lowest concentration of quercitrin in the apples of the cv. "Aukis" (Table 3). In the apples of the cv. "Šampion," hyperoside was the major compound of all quercetin derivatives identified, and this is in line with the results of other studies [41, 48]. Rutin was a minor component among all the identified quercetin derivatives, and these results are consistent with those reported by other authors [20, 23]. The highest concentration of rutin ($16.4 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$) was detected in ethanol extracts of the cv. "Aldas" apple samples. This concentration was by 1.3 times greater than the lowest concentration of rutin detected in the ethanol extracts of cv. "Aukis" apple samples.

Qualitative and quantitative analysis of the compounds of the dihydrochalcone class is of great importance as these compounds can be regarded as chemotaxonomic markers for the identification of apple cultivars as well as products made from apples [17, 52, 53]. Phloridzin exhibits antidiabetic activity [54, 55], and therefore apples as plant raw materials accumulating this compound can be potentially useful for the prevention of diabetes mellitus [9]. The highest concentration of dihydrochalcone phloridzin was in the cv. "Aldas" ($142.4 \pm 6.3 \mu\text{g/g}$), and it was by 2.3 times higher than the lowest concentration of phloridzin detected in the cv. "Šampion" ($63.8 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$).

Our analysis showed a wide variation in the phenolic content of different apple cultivars grown in Lithuania. The total content of phenolic compounds identified in the ethanol extracts of lyophilized apple samples ranged from $1641.0 \pm 47.9 \mu\text{g/g}$ (cv. "Ligol") to $4291.3 \pm 154.2 \mu\text{g/g}$ (cv. "Aldas"). The cultivar itself as a factor has an impact on the parameters of qualitative and quantitative content of the apples [20], and depending on the apple cultivar, these parameters can vary considerably [26]. Other factors that may affect the qualitative and quantitative content of apples include the geochemical composition of the soil, the geographic region [41, 56–58], and the climatic-meteorological [59] and cultivation or storage conditions [60, 61]. Some authors found increased levels of phenolic compounds in apple peel due to sunlight exposure [62, 63]. Orchard fertigation and foliar fertilization lead to increased phenol contents [64]. However, these factors were not considered in this study, and we are planning to include them in our future studies.

4. Conclusions

The HPLC-based analytical procedure for the determination of phenolic compounds in the apple samples from 4 popular cultivars was optimized and validated. The specificity, precision, and assaying range confirm the suitability of this method.

The examination of the apple samples revealed the distribution of 11 different groups of phenolic compounds important for human health. Chlorogenic acid was the major component in cultivars "Aldas," "Auksis," and "Ligol" and procyanidin B2 in cv. "Šampion." Hyperoside and avicularin were the dominant compounds among all the identified quercetin derivatives in the apples of the cultivars "Aldas" and "Auksis;" hyperoside in the cv. "Šampion;" and quercitrin in the cv. "Ligol."

Abbreviations

cv.: Cultivar
DAFB: Days after full bloom
DW: Dry weight
HPLC: High-performance liquid chromatography
PDA: Photodiode array
RE: Rutin equivalent
%RSD: Percent relative standard deviation
v/v: Volume/volume.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by the Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences and a Grant from the Research Council of Lithuania (no. SVE-02/2011).

References

- [1] Nacionalinės sveikatos tarybos metinis pranešimas. Lietuvos sveikatos programa: rezultatai ir išvados = Annual report of the National Health Board. Lithuanian health program: results and conclusions, Vilnius, Lithuania, 2011.
- [2] Food and Health in Europe: A New Basis for Action, WHO Regional Publications European Series, no. 96, WHO, 2004.
- [3] B. Suárez, Á. L. Álvarez, Y. D. García, G. D. Barrio, A. P. Lobo, and F. Parra, "Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace," *Food Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 339–342, 2010.
- [4] R.-R. He, M. Wang, C.-Z. Wang et al., "Protective effect of apple polyphenols against stress-provoked influenza viral infection in restraint mice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 8, pp. 3730–3737, 2011.
- [5] S. Reagan-Shaw, D. Eggert, H. Mukhtar, and N. Ahmad, "Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells," *Nutrition and Cancer*, vol. 62, no. 4, pp. 517–524, 2010.
- [6] S. H. Thilakarathna, H. P. V. Rupasinghe, and P. W. Needs, "Apple peel bioactive rich extracts effectively inhibit in vitro human LDL cholesterol oxidation," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 1, pp. 463–470, 2013.
- [7] C. Carrasco-Pozo, H. Speisky, O. Brunser, E. Pastene, and M. Gotteland, "Apple peel polyphenols protect against gastrointestinal mucosa alterations induced by indomethacin in rats," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 12, pp. 6459–6466, 2011.
- [8] M. J. Bao, J. Shen, Y. L. Jia et al., "Apple polyphenol protects against cigarette smoke-induced acute lung injury," *Nutrition*, vol. 29, no. 1, pp. 235–243, 2013.
- [9] A. Francini and L. Sebastiani, "Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing," *Antioxidants*, vol. 2, no. 3, pp. 181–193, 2013.
- [10] *European Pharmacopoeia*, vol. 1, Council of Europe, Strasbourg, France, 7th edition, 2010.
- [11] A. Urbonavičiūtė, V. Jakštas, O. Kornysheva, V. Janulis, and A. Maruška, "Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts," *Journal of Chromatography A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 339–344, 2006.
- [12] C. Santos-Buelga, S. Gonzalez-Manzano, M. Dueñas, and A. M. Gonzalez-Paramas, "Extraction and isolation of phenolic compounds," *Methods in Molecular Biology*, vol. 864, pp. 427–464, 2012.
- [13] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, "Techniques for analysis of plant phenolic compounds," *Molecules*, vol. 18, no. 2, pp. 2328–2375, 2013.

- [14] C. D. Stalikas, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids," *Journal of Separation Science*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, 2007.
- [15] M. Naczek and F. Shahidi, "Extraction and analysis of phenolics in food," *Journal of Chromatography A*, vol. 1054, no. 1–2, pp. 95–111, 2004.
- [16] R. Tsao and Z. Deng, "Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals," *Journal of Chromatography B*, vol. 812, no. 1–2, pp. 85–99, 2004.
- [17] A. Schieber, P. Keller, and R. Carle, "Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 910, no. 2, pp. 265–273, 2001.
- [18] N.-N. Chen, S.-C. Zhao, L.-G. Deng et al., "Determination of five polyphenols by HPLC/DAD and discrimination of apple varieties," *Chromatographia*, vol. 73, no. 5–6, pp. 595–598, 2011.
- [19] R. Tsao, R. Yang, J. C. Young, and H. Zhu, "Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 21, pp. 6347–6353, 2003.
- [20] S. C. Marks, W. Mullen, and A. Crozier, "Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 87, no. 4, pp. 719–728, 2007.
- [21] N. Baber, "International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH)," *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 37, no. 5, pp. 401–404, 1994.
- [22] A. Mari, I. Tedesco, A. Nappo, G. L. Russo, A. Malorni, and V. Carbone, "Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of 'Annurca' apple, a southern Italian cultivar," *Food Chemistry*, vol. 123, no. 1, pp. 157–164, 2010.
- [23] J. Wu, H. Gao, L. Zhao et al., "Chemical compositional characterization of some apple cultivars," *Food Chemistry*, vol. 103, no. 1, pp. 88–93, 2007.
- [24] L. Montero, M. Herrero, E. Ibáñez, and A. Cifuentes, "Profiling of phenolic compounds from different apple varieties using comprehensive two-dimensional liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1313, pp. 275–283, 2013.
- [25] D. De Paeppe, K. Servaes, B. Noten et al., "An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits," *Food Chemistry*, vol. 136, no. 2, pp. 368–375, 2013.
- [26] M. Ceymann, E. Arrigoni, H. Schärer, A. Bozzi Nising, and R. F. Hurrell, "Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 26, no. 1–2, pp. 128–135, 2012.
- [27] L. Jakobek, R. García-Villalba, and F. A. Tomás-Barberán, "Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 31, no. 2, pp. 199–211, 2013.
- [28] M. C. Soares, É. T. Ribeiro, E. M. Kuskoski et al., "Composition of phenolic acids content in apple (*Malus sp*) pomace," *Seminário de Ciências Agrárias*, vol. 29, no. 2, pp. 339–348, 2008.
- [29] A. Schieber, P. Keller, P. Streker, I. Klaiber, and R. Carle, "Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. 'Bretacher') by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS," *Phytochemical Analysis*, vol. 13, no. 2, pp. 87–94, 2002.
- [30] M. Amzad Hossain, S. M. Salehuddin, M. J. Kabir, S. M. M. Rahman, and H. P. V. Rupasinghe, "Sinensetin, rutin, 3,4-dihydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 185–190, 2009.
- [31] Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa et al., "In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid," *International Journal of Pharmacokinetics*, vol. 403, no. 1–2, pp. 136–138, 2011.
- [32] X. Zhang, H. Huang, T. Yang et al., "Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury," *Injury*, vol. 41, no. 7, pp. 746–752, 2010.
- [33] T. Thomas and A. E. H. Pfeiffer, "Foods for the prevention of diabetes: how do they work?" *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 25–49, 2012.
- [34] Y. Kanno, R. Watanabe, H. Zempo, M. Ogawa, I. Suzuki, and M. Isobe, "Chlorogenic acid attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in mice," *International Heart Journal*, vol. 54, no. 3, pp. 176–180, 2013.
- [35] N. Cinkilic, S. K. Cetintas, T. Zorlu et al., "Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 53, pp. 359–363, 2013.
- [36] B. Stefanska, H. Karlic, F. Varga, K. Fabianowska-Majewska, and A. G. Haslberger, "Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components—the implications in cancer prevention," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 2, pp. 279–297, 2012.
- [37] A. T. Serra, J. Rocha, B. Sepodes et al., "Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties—correlation of response with composition," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 4, pp. 2378–2386, 2012.
- [38] B. A. R. Lina, A. A. Reus, O. Hasselwander, Q. Bui, and P. P. Tenning, "Safety evaluation of Evesse™ EPC, an apple polyphenol extract rich in flavan-3-ols," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 8, pp. 2845–2853, 2012.
- [39] C. Huang, Y. Chen, T. Zhou, and G. Chen, "Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases," *Xenobiotica*, vol. 39, no. 4, pp. 312–322, 2009.
- [40] L. Panzella, M. Petriccione, P. Rega, M. Scortichini, and A. Napolitano, "A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity," *Food Chemistry*, vol. 140, no. 4, pp. 672–679, 2013.
- [41] A. Duda-Chodak, T. Tarko, P. Satora, P. Sroka, and T. Tuszyński, "The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland," *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, vol. 18, no. 2, pp. 39–50, 2010.
- [42] M. Bräunlich, R. Slimestad, H. Wangensteen et al., "Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors," *Nutrients*, vol. 5, no. 3, pp. 663–678, 2013.
- [43] M. E. Maldonado-Celis, S. Bousserouel, F. Gossé, A. Lobstein, and F. Raul, "Apple procyanidins activate apoptotic signaling pathway in human colon adenocarcinoma cells by a lipid-raft independent mechanism," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 388, no. 2, pp. 372–376, 2009.
- [44] X. Bai, H. Zhang, and S. Ren, "Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, no. 10, pp. 2502–2506, 2013.

- [45] C. M. Andre, J. M. Greenwood, E. G. Walker et al., "Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 42, pp. 10546–10554, 2012.
- [46] N. Balasuriya and H. P. V. Rupasinghe, "Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 4, pp. 2320–2325, 2012.
- [47] E.-B. Byun, S. Korematsu, T. Ishikawa et al., "Apple procyanidins induce hyperpolarization of rat aorta endothelial cells via activation of K⁺ channels," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 23, no. 3, pp. 278–286, 2012.
- [48] A. Duda-Chodak, T. Tarko, and T. Tuszyński, "Antioxidant activity of apples—an impact of maturity stage and fruit part," *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, vol. 10, no. 4, pp. 443–454, 2011.
- [49] F. Dajas, "Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 2, pp. 383–396, 2012.
- [50] M. González-Vallinas, M. González-Castejón, A. Rodríguez-Casado, and A. Ramírez de Molina, "Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives," *Nutrition Reviews*, vol. 71, no. 9, pp. 585–599, 2013.
- [51] A. Alberti, A. A. E. Zelinski, D. M. Zardo, I. M. Demiate, A. Nogueira, and L. I. Mafra, "Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology," *Food Chemistry*, vol. 149, pp. 151–158, 2014.
- [52] R. M. Alonso-Salces, K. Ndjoko, E. E. Queiroz et al., "On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 1046, no. 1–2, pp. 89–100, 2004.
- [53] C. Gosch, H. Halbwirth, and K. Stich, "Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants," *Phytochemistry*, vol. 71, no. 8–9, pp. 838–843, 2010.
- [54] M. Kobori, S. Masumoto, Y. Akimoto, and H. Oike, "Phloridzin reduces blood glucose levels and alters hepatic gene expression in normal BALB/c mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 7, pp. 2547–2553, 2012.
- [55] M. Najafian, M. Z. Jahromi, M. J. Nowrooznejad et al., "Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats," *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 5, pp. 5299–5306, 2012.
- [56] E. Delian, V. Petre, I. Burzo, L. Bădulescu, and D. Hoza, "Total phenols and nutrients composition aspects of some apple cultivars and new studied breeding creations lines grown in Voinești area—Romania," *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 16, no. 6, pp. 6722–6729, 2011.
- [57] M. A. Awad and A. De Jager, "Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin," *Scientia Horticulturae*, vol. 92, no. 3–4, pp. 265–276, 2002.
- [58] T. K. McGhie, M. Hunt, and L. E. Barnett, "Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 8, pp. 3065–3070, 2005.
- [59] L. Mainla, U. Moor, K. Karp, and T. Püssa, "The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia," *Zemdirbystė*, vol. 98, no. 1, pp. 63–70, 2011.
- [60] N. T. T. Hoang, J. B. Golding, and M. A. Wilkes, "The effect of postharvest 1-MCP treatment and storage atmosphere on 'Cripps Pink' apple phenolics and antioxidant activity," *Food Chemistry*, vol. 127, no. 3, pp. 1249–1256, 2011.
- [61] A. A. Van der Sluis, M. Dekker, A. De Jager, and W. M. F. Jongen, "Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 8, pp. 3606–3613, 2001.
- [62] S. F. Hagen, G. I. A. Borge, G. B. Bengtsson et al., "Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): effect of postharvest UV-B irradiation," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 45, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [63] S. Sun, L. Xin, H. Gao, J. Wang, and P. Li, "Response of phenolic compounds in 'Golden Delicious' and 'Red Delicious' apples peel to fruit bagging and subsequent sunlight-exposure," *Scientia Horticulturae*, vol. 168, pp. 161–167, 2014.
- [64] S. Murtić, H. Čivić, M. Đurić et al., "The content of some antioxidants in apple depends on the type of fertilization," *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 22, no. 2, pp. 475–480, 2013.

Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits

D. Kviklys¹, M. Liaudanskas², V. Janulis², P. Viškelis¹, M. Rubinskienė¹, J. Lanauskas¹, N. Uselis¹

¹*Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania*

²*Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania*

ABSTRACT

The effect of weather conditions and eleven apple rootstocks was studied on the phenol content in fruits. Super-dwarf rootstocks P 61 and P 22 determined the highest content of all phenolic compounds tested. Dwarf rootstocks M.9, P 62 and semi-dwarf M.26 determined lower content of all phenolic compounds tested. The content of (+)-catechin, procyanidin B1 and total procyanidins content in apple fruits depended on rootstock genotype and high variation coefficient of these compounds between rootstocks was established. Rootstocks had a lesser effect on the content of quercitrin, (–)-epicatechin, total catechins, phloridzin and chlorogenic acid. No clear differences were found between super-dwarf, dwarf and semi-dwarf rootstock groups. Conditions during the growing season, yield and fruit weight impacted on the content of bioactive compounds. Less than 10% difference in total phenols between the growing seasons was recorded for M.26 and P 22. The greatest differences were recorded in the fruits from trees grown on M.9, Pure 1 and P 66 rootstocks. Rootstock B.396 determined the most stable content of all compounds analysed, except for procyanidin B1 and B2.

Keywords: polyphenols; *Malus × domestica*; phenylpropanoid metabolism; antioxidant compounds

Apples in human diet are an important source of different biological active natural plant products, which can contribute positively to prevention of several diseases. Compared to other fruits, apples contain the highest concentration of free phenolics (Sun et al. 2002). Apple studies in the USA indicated that twenty-two percent of the phenolics consumed from fruits are from apples (Vinson et al. 2001).

Various abiotic and or biotic factors can affect apple fruit composition of such defence substances. The biggest differences were found among apple cultivars, where high variability of phenolic content was recorded (Van der Sluis et al. 2001). Growing technologies can stimulate or reduce accumulation of phenolic compounds in apple fruits. Fruit position on a tree and sun exposure

have an impact on phenol content (Awad et al. 2001). Weather conditions during the growing season may significantly affect the content of total polyphenols (Mainla et al. 2011).

Various studies demonstrated rootstock effect on tree vegetative and generative development, fruit quality (Kviklys et al. 2012, 2013), uptake and transport of water and minerals (Lochard and Schneider 1981). Therefore a presumption of possible rootstock effect on different pattern of accumulation of bioactive substances in apple fruits could be made.

Impact of rootstocks on fruit phenolics has not been widely tested. Fruit tree studies revealed great differences between rootstocks in accumulation of phenols in lemons (Gil-Izquierdo et al. 2004), peaches and apricots (Scalzo et al. 2005), cherries

Supported by the Research Council of Lithuania, Project No. SVE-02/2011.

(Usenik and Štampar 2002). Three apple rootstocks were compared in the trial performed in Estonia (Mainla et al. 2011). Rootstock studies performed in the USA demonstrated significant differences in leaf phenolic content among rootstocks (Garcia et al. 2004).

The objective of the present study was to evaluate apple rootstock effect on the content and composition of phenolic compounds in apple fruits, to ascertain rootstock impact on the stability of biological active substances during the growing seasons, to highlight dependence of accumulation and variability of phenolic compounds due to rootstock induced tree vigour.

MATERIAL AND METHODS

The trial was conducted in the experimental orchard of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2011–2012. Rootstocks for this trial were chosen based on their popularity worldwide (M.9, M.26, partly B.396 and P.22) and suitability for intensive apple growing. According to induced tree vigour rootstocks fall within the following groups: super-dwarf rootstocks P.22, P.59, P.61 and P.B.4, dwarf rootstocks M.9, P.62, P.66, P.67, B.396 and Pure 1, semi-dwarf rootstock M.26.

Rootstocks were grafted with cv. Ligol and planted in randomized block design, with four replicates and 3 trees per plot. Twenty randomly selected fruits from each replication were taken for biochemical analysis and carefully mixed. Twenty five randomly selected fruits were chosen from the bulk and analysed in three replicates. The data on the main traits were subjected to the analysis of variance. Significance of differences between rootstocks means was evaluated using *LSD* test at $P < 0.05$. Hierarchical clustering analysis and resulting dendrograms representing similarities between rootstocks were developed with SPSS software (Somers, USA).

Preparation of samples. Each apple was cut into slices, frozen and lyophilized with a ZIRBUS sublimator $3 \times 4 \times 5/20$ (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany). The lyophilized slices were ground to a fine powder using a Retsch 200 mill (Haan, Germany).

Extraction. 2.5 g of lyophilized apple powder mixed in 30 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) for 20 min at 40°C. Type of extraction, duration, temperature, solvent and its concentration were chosen considering the results of extraction optimization.

Instrumentation and chromatographic conditions. A Waters 2695 chromatograph equipped with a Waters 2998 photodiode array detector was used for HPLC analysis, which was controlled with the Empower® v.2.0. software (Waters, Milford, USA). Chromatographic separations were carried out by using a YMC-Pack ODS-A ($5 \mu\text{m}$, C_{18} , $250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$) column equipped with a YMC-Triart ($3 \mu\text{m}$, C_{18} , $10 \times 3.0 \text{ mm i.d.}$) precolumn (YMC Europe GmbH). The volume of the extract being investigated was 10 μL . The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 min, 3–15% B; 30–45 min, 15–25% B; 45–50 min, 25–50% B; and 50–55 min, 50–95% B.

Detection was simultaneously performed at 3 wavelengths: 280 nm (dihydrochalcones, catechins, procyanidins), 320 nm (phenolic acids), and 360 nm (quercetin glycosides). All the phenolic compounds were identified by comparing their retention times and spectra (from 200 to 600 nm) with those of the standard compounds.

Growing conditions. Higher temperatures were recorded in 2011 when the average monthly temperatures were higher than long term average (Figure 1). The summer of 2011 was distinguished by more rainfall in July and especially in August when double the normal monthly rainfall was recorded (Figure 2).

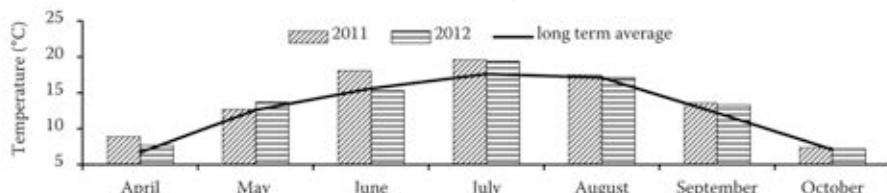


Figure 1. Temperature changes during vegetation periods

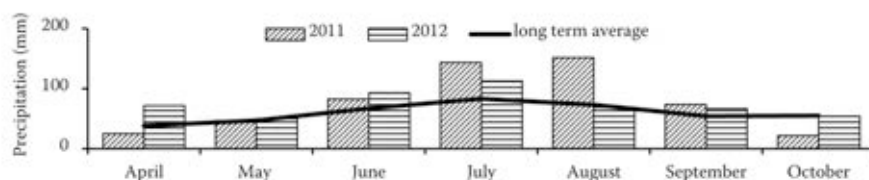


Figure 2. Precipitation during vegetation periods

RESULTS AND DISCUSSIONS

The content of phenolic compounds depends on fruit tissue analysed. Several times more phenolic compounds are found in the peel than in apple flesh (Wolfe et al. 2003, Drogoudi et al. 2008, Lecce et al. 2009). High content of phenols was detected in apple juices as well (Lachman et al. 2006). In our trial, we examined a whole fruit.

Studies of apple and cherry rootstock impact on accumulation of phenolic compounds in fruits and plant tissues revealed benefits of dwarfing rootstocks (Usenik and Štampar 2002, Mainla et al. 2011). That was not so evident in our trial

where we tested rootstocks from three different vigour classes.

Hagen et al. (2007) found increased levels of quercetin, epicatechin, procyanidins and phloridzin and Awad et al. (2000) indicated an increase of quercetin in apple peel due to better sun-exposure. However, in our trial we did not identify higher levels of tested compounds in fruits from trees on the super-dwarfing rootstocks, though they resulted in development of slender canopy with better light conditions. Accumulation of certain compounds depended on rootstock genotype but did not depend on rootstock-induced tree vigour. On average of both years, dwarf rootstocks M.9,

Table 1. Effect of semi-dwarf and super-dwarf rootstocks on average content of phenolic compounds in apple fruits ($\mu\text{g/g}$ dry weight) from years 2011 and 2012 and their deviation (%)

Compound	P 22		P 59		P 61		PB.4		M.26	
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
Chlorogenic acid	1047	21	818	43	1020	40	962	46	743	19
Phloridzin	113	35	101	27	112	49	112	58	98.8	42
Procyanidin B1	81.5	182	66.3	151	82.0	56	33.5	49	46.0	219
Procyanidin B2	920	29	711	45	906	23	704	8	706	76
Σ Procyanidins	1001	37	777	51	988	26	737	5	752	82
(+)-Catechin	71.1	22	37.1	24	77.3	23	43.0	59	53.2	6
(-)-Epicatechin	316	21	217	34	329	14	273	24	246	8
Σ Catechins	387	22	254	27	406	16	316	16	299	7
Hyperoside	124	41	135	26	147	24	125	6	102	13
Isoquercitrin	15.9	39	20.5	24	23.3	8	20.1	16	16.9	7
Rutin	20.5	60	18.7	29	21.6	49	21.3	26	15.3	39
Avicularin	84.2	36	75.4	5	94.0	25	78.1	20	69.3	21
Quercitrin	116	31	107	6	130	19	105	24	94.0	11
Σ Quercetin glycosides	361	38	357	11	416	24	350	17	298	15
Σ Phenolic compounds	2909	8	2307	11	2943	17	2476	26	2191	8

Difference between years in absolute values calculated according to formula: $100 - [(year2011 \times 100)/year2012]$

Table 2. Effect of dwarf rootstocks on average content of phenolic compounds in apple fruits ($\mu\text{g/g}$ dry weight) from years 2011 and 2012 and their deviation (%)

Compound	B.396		M.9		P 62		P 66		P 67		Pure 1	
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
Chlorogenic acid	821	9	729	36	781	17	891	53	817	26	935	45
Phloridzin	122	45	85.8	32	98.7	49	107	50	83.7	37	111	51
Procyanidin B1	37.6	79	48.2	43	53.4	300	38.8	12	49.4	13	78.6	47
Procyanidin B2	815	101	577	9	504	9	735	10	737	15	707	35
Σ Procyanidins	852	99	626	6	558	21	773	9	787	15	786	30
(+)-Catechin	57.8	1	49.7	43	35.6	68	52.9	48	38.1	23	77.6	31
(-)-Epicatechin	268	9	222	45	221	12	263	38	294	36	320	30
Σ Catechins	326	7	272	45	257	4	316	40	332	31	397	30
Hyperoside	118	5	87.0	45	100	58	124	17	116	64	127	33
Isoquercitrin	19.8	4	15.4	16	16.5	54	20.1	6	18.2	51	21.3	27
Rutin	19.2	29	15.1	60	17.8	68	20.1	27	20.4	72	21.4	52
Avicularin	79.5	8	59.9	39	65.0	49	81.6	21	71.7	49	86.2	24
Quercitrin	104	6	86.1	25	87.1	40	114	16	94.8	28	115	14
Σ Quercetin glycosides	340	4	264	37	286	52	359	17	321	51	371	26
Σ Phenolic compounds	2462	17	1976	29	1980	15	2447	34	2340	20	2600	36

Difference between years in absolute values calculated according to formula: $100 - [(year2011 \times 100)/year2012]$

P 62 and semi-dwarf M.26 rootstock were among the 4 rootstocks that determined lower content of all phenolic compounds tested (Tables 1, 2, Figure 3). Analysing separate compounds, super-dwarf P 59 together with the above-mentioned rootstocks determined low total quercetin glycosides content, super-dwarf PB.4 – low total procyanidin content and dwarf rootstock P 67 – low phloridzin. Super-dwarf rootstocks P 61 and P 22 were among the top 4 rootstocks that determined the highest content of phenolic compounds. Besides these two rootstocks, B.396 rootstock was distinguished by high total procyanidins and phloridzin, PB.4 – by chlorogenic acid, Pure 1 – by total catechins and total phenols.

Some researchers stress the relationship between phenolics accumulation in apple fruits and year conditions (Mainla et al. 2011). Despite the variable climatic conditions during the trial period, the difference between years in the total phenolic compounds accumulated in apple fruits was not high and averaged 17% for all rootstocks. The effect of individual rootstocks differed: less than 10% difference of total phenolic compounds was

recorded for M.26 and P 22, but around 30% for M.9, Pure 1 and P 66 rootstocks (Tables 1 and 2).

Rather low average differences (< 20%) were recorded for the content of isoquercitrin, quercitrin, catechin and procyanidin B2. Difference between years of procyanidin B1 content was the highest – 76%. Accumulation of rutin and phloridzin was also greatly affected by year fruiting and growing conditions. The analysis of individual rootstocks revealed two – three fold differences of procyanidin B1 content in fruits from trees on P 62, P 22 and M.26 rootstocks. On the other hand, only 12–13% difference was recorded for P 66 and P 67 rootstocks.

The most stable content of all compounds analysed, except for procyanidin B1 and B2, was in fruits from trees on B.396 rootstock.

In spite of small difference of total phenolic compounds, particular compounds varied considerably in fruits from trees on P 22 rootstock almost in all cases exceeding trial averages in absolute values. The same trend was recorded for P 62 rootstock.

There were some rootstocks (M.26, P 59 and P 66) that gave the same yield and similar fruit

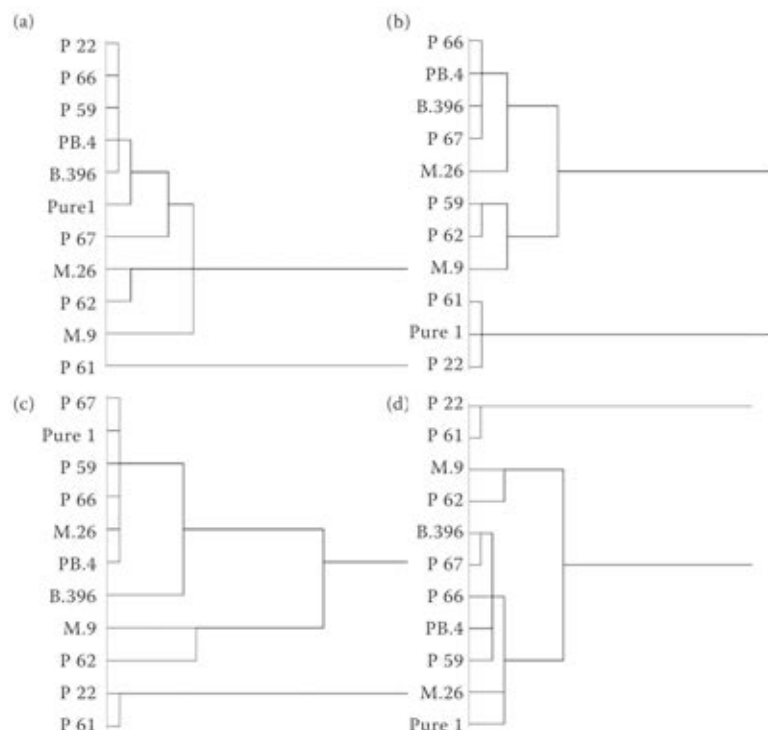


Figure 3. Dendrogram representing apple rootstock similarities between total quercetin glycosides (a); catechins (b); procyanidins (c), and phenolic compounds content (d) in apple fruit

weight in both years (the data is not presented). If the difference of the tested compounds between years was small in fruits from trees grown on M.26 and P 59 rootstocks, one of the biggest differences was detected on P 66. On the other hand,

low variation of the tested compounds in fruits from trees on B.396 rootstocks did not depend on threefold yield differences and great variation in fruit weight, showing primary rootstock genotype effect on the stability of total phenolic content

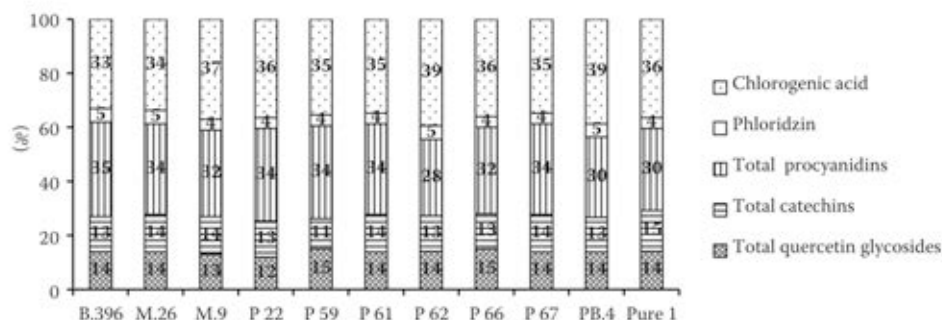


Figure 4. Rootstock effect on the composition of phenolic compounds in apple fruits (average of 2011, 2012)

Table 3. Coefficient of variation of phenolic compounds determined by rootstock genotypes

Year	Hyperoside	Isoquercitrin	Rutin	Avicularin,	Quercitrin	Σ Quercetin glycosides	(+) Catechin	(-) Epicatechin	Σ Catechins	Procyanidin B1	Procyanidin B2	Σ Procyanidins	Phloridzin	Chlorogenic acid	Σ Phenolic compounds
2012	15.1	13.5	15.9	12.2	13.4	12.5	40.6	15.6	17.8	35.5	19.7	20.4	14.9	17.2	15.7
2011	26.2	25.5	26.1	20.1	17.4	21.1	22.1	19.1	19.4	41.7	25.4	24.2	11.5	15.0	16.7

in apple fruits. Usually, investigations confirm the importance of the cultivar as a factor for the quantitative composition of apples (Tsao et al. 2003, Ceymann et al. 2012).

On average, chlorogenic acid was a dominating compound in apple fruits, which agrees with the findings of other researches (Marks et al. 2007, Duda-Chodak et al. 2010). P 62 and PB.4 rootstocks determined the highest share (39%) of it (Figure 4). Similar quantities of total procyanidins were detected as well. The share of total procyanidins was lower in fruits from trees grown on P 62. The B.396 was the only rootstock which determined higher content of procyanidins than chlorogenic acid. Equal amount of both compounds was accumulated in fruits from tress on M.26, P 59, P 61 and P 67 rootstocks. The share of total quercetin glycosides and total catechins varied from 13% to 15% of the total phenolic compounds and was the same for all rootstocks, only P 59 rootstock determined lesser amount of total catechins.

The average apple yield in the trial was 48.6 t/ha in 2012 and only 22.3 t/ha in 2011. The content of the two main apple fruit phenols depended on the yield. In 2012, 'in the year on' chlorogenic acid accounted for 40% of the total phenol content and only 32% in 2011 when apple yield was twice as low. Conversely, apple fruits contained lesser amount of total procyanidins in 2012 (27%) and more in 2011 (39%).

Fruits accumulated less phenols in 2011 and high variation ($CV > 20\%$) between rootstocks was detected for most of the tested compounds (Table 3). In 2012, the variation between rootstocks was medium, except for (+)-catechin and procyanidin B1. Despite the great differences in yield and fruit weight between years, the variation between rootstocks was medium in both years for quercitrin, (-)-epicatechin, total catechins, phloridzin, chlorogenic acid and total phenols.

In conclusion, super-dwarf rootstocks P61 and P 22 determined the highest content of all phenolic

compounds tested. Dwarf rootstocks M.9 and P 62 and semi-dwarf rootstock M.26 resulted in lower content of all phenolic compounds tested. No clear differences were found between super-dwarf, dwarf and semi-dwarf rootstock groups. Rootstock impact on the accumulation of total phenols was different: less than 10% difference between years was recorded for M.26 and P 22, but around 30% for M.9, Pure 1 and P 66 rootstocks. The most stable content of all compounds analysed, except for procyanidin B1 and B2, was in fruits from trees on B.396 rootstock. Environmental conditions, fruit yield and fruit weight had an impact on rootstock – dependent variation of phenolic compounds. On average of two years, the highest variation coefficient was established for (+)-catechin, procyanidin B1 and total procyanidins content. Medium variation coefficient was recorded for quercitrin, (-)-epicatechin, total catechins, phloridzin, chlorogenic acid and total phenols.

REFERENCES

- Awad M.A., de Jager A., van Westing L.M. (2000): Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: Characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83: 249–263.
- Awad M.A., Wagenmakers P.S., de Jager A. (2001): Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Scientia Horticulturae*, 88: 289–298.
- Ceymann M., Arrigoni E., Schärer H., Nising A.B., Hurrell R.F. (2012): Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26: 128–135.
- Drogoudi P.D., Michailidis Z., Pantelidis G. (2008): Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 115: 149–153.
- Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P., Tuszyński T. (2010): The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18: 39–50.

- García E., Rom C.R., Murphy J.B. (2004): Comparison of phenolic content of 'Liberty' apple (*Malus × domestica*) on various rootstocks. *ISHS Acta Horticulturae*, 658: 57–60.
- Gil-Izquierdo A., Riquelme M.T., Porras L., Ferreres F. (2004): Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 324–331.
- Hagen S.F., Borge G.I.A., Bengtsson G.B., Bilger W., Berge A., Haffner K., Solhaug K.A. (2007): Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 1–10.
- Kviklys D., Kviklienė N., Biedicki P., Bite A., Lepsis J., Univer T., Univer N., Uselis N., Lanauskas J. (2013): Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of apple (*Malus domestica* Borkh.) new rootstocks. *Zemdirbystė-Agriculture*, 100: 441–446.
- Kviklys D., Kviklienė N., Bite A., Lepsis J., Univer T., Univer N., Uselis N., Lanauskas J., Buskienė L. (2012): Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of 12 apple rootstocks in North-East Europe. *Horticultural Science*, 39: 1–7.
- Lachman J., Šulc M., Sus J., Pavliková O. (2006): Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. *Horticultural Science*, 33: 95–102.
- Leccese A., Bartolini S., Viti R. (2009): Antioxidant properties of peel and flesh in 'GoldRush' and 'Florina' scab-resistant apple (*Malus domestica*) cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37: 71–78.
- Lochard R.G., Schneider G.W. (1981): Stock and scion relationships and the dwarfing mechanism in apple. *Horticultural Reviews*, 3: 315–375.
- Mainla L., Moor U., Karp K., Püssa T. (2011): The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia. *Zemdirbystė-Agriculture*, 98: 63–70.
- Marks S.C., Mullen W., Crozier A. (2007): Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 719–728.
- Scalzo J., Politi A., Pellegrini N., Mezzetti B., Battino M. (2005): Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21: 207–213.
- Sun J., Chu Y., Wu X., Liu R.H. (2002): Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449–7454.
- Tsao R., Yang R., Young J.C., Zhu H. (2003): Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6347–6353.
- Usenik V., Štampar F. (2002): Influence of scion/rootstock interaction on seasonal changes of phenols. *Phyton*, 42: 279–289.
- Van der Sluis A.A., Dekker M., de Jager A., Jongen W.M.F. (2001): Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3606–3613.
- Vinson J.A., Su X., Zubik L., Bose P. (2001): Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5315–5321.
- Wolfe K., Wu X., Liu R.H. (2003): Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 609–614.

Received on January 23, 2014

Accepted on April 17, 2014

Corresponding author:

Dr. Darius Kviklys, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture, Kauno 30, Babtai, Kaunas distr., LT-54333, Lithuania
e-mail: d.kviklys@lsdi.lt

Research Article

Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves

Mindaugas Liaudanskas,¹ Pranas Viškelis,² Raimondas Raudonis,¹
Darius Kviklys,² Norbertas Uselis,² and Valdimaras Janulis¹

¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių Street 4,
50161 Kaunas, Lithuania

² Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno Street 30, Babtai, 54333 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Mindaugas Liaudanskas; m.liudanskas@yahoo.com

Received 2 June 2014; Revised 11 August 2014; Accepted 25 August 2014; Published 11 September 2014

Academic Editor: Wanchai De-Eknankul

Copyright © 2014 Mindaugas Liaudanskas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to determine the composition and content of phenolic compounds in the ethanol extracts of apple leaves and to evaluate the antioxidant activity of these extracts. The total phenolic content was determined spectrophotometrically, as well as the total flavonoid content in the ethanol extracts of apple leaves and the antioxidant activity of these extracts, by the ABTS, DPPH, and FRAP assays. The highest amount of phenolic compounds and flavonoids as well as the highest antioxidant activity was determined in the ethanol extracts obtained from the apple leaves of the cv. Aldas. The analysis by the HPLC method revealed that phloridzin was a predominant component in the ethanol extracts of the apple leaves of all cultivars investigated. The following quercetin glycosides were identified and quantified in the ethanol extracts of apple leaves: hyperoside, isoquercitrin, avicularin, rutin, and quercitrin. Quercitrin was the major compound among quercetin glycosides.

1. Introduction

Studies on the chemical biodiversity of plants are recognized as being relevant and are carried out with the aim of enriching the assortment of raw medicinal plant materials and to evaluate their potential application to the demands of practical medicine. A search for plants accumulating phenolic compounds, which have recently been considered as an object of many scientific studies, is especially promising. It is of importance to assess the composition and content of phenolic compounds in plant vegetative organs, to determine the patterns of their accumulation and identify new, promising sources of plant phenolic compounds.

The domestic apple (*Malus domestica* Borkh.) is one of the most widely cultivated fruit trees. Although the chemical composition of apples has been extensively investigated [1, 2], we have failed to find any data on the composition and content of phenolic compounds in the leaves of different apple cultivars grown in Lithuania. Comprehensive data of scientific research on the variation in the composition and

content of phenolic compounds would allow conducting purposeful studies leading to the usage of the raw material obtained from apple leaves as a potential source of phenolic compounds in practical medicine. Biologically active compounds could lead to production of dietary supplements and cosmetic preparations enriched in phenolic compounds found in apple leaves. Small-scale studies on the chemical composition of leaves have been published, where phloretin glycosides, phenolic acids, catechins, and some quercetin glycosides were identified as the main phenolic compounds [3–5]. Other studies on the composition and content of phenolic compounds in apple leaves were conducted in relation to *Venturia inaequalis*-caused infections in the vegetative organs of apple trees. Phenolic compounds accumulated in fruit plants play an important role in the plant defense mechanism against different fungal diseases and different stresses [6–9].

Phenolic compounds, acting as natural antioxidants, scavenge free radicals and inhibit their production, stimulate the synthesis of antioxidant enzymes, and thus prevent oxidative stress resulting in damage to the structural molecules

of the body [10–12]. The antioxidant activity of phenolic compounds is associated with other biological properties of these compounds, such as anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, cardiovascular system-improving, and other activities [13–15]. Apple leaves accumulate high amounts of phloridzin [16, 17], which exhibit antidiabetic activity [18]. Therefore, plant raw materials accumulating this compound can be potentially useful for the prevention of diabetes mellitus.

Therefore, the aim of this study was to determine the composition and content of phenolic compounds in the ethanol extracts of apple leaves harvested from the cultivars Aldas, Auksis, Ligol, and Lodel grown under Lithuanian climatic conditions, to assess the variation of phenolic compounds and to compare their antioxidant activity in the apple leaf samples obtained from different cultivars.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material. The following apple cultivars were included into this study: Auksis (early winter cv., bred in Lithuania) and Ligol (winter cv., bred in Poland) that are two main cultivars in commercial apple orchards as well as Aldas (early winter cv., bred in Lithuania) and Lodel (winter cv., bred in Poland), two cultivars resistant to apple scab (*Venturia inaequalis*). Cultivars Aldas and Lodel are recommended for organic orchards. The apple trees were grown in the experimental orchard of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Baktai, Lithuania (55°60'N, 23°48'E). Aldas: block 4, row 16, trees 5–8; Auksis: block 2, row 3, trees 25–28; Ligol: block 2, row 4, trees 21–24; Lodel: block 4, row 5, trees 12–15. The altitude of Baktai town is 57 m above sea level. Average annual precipitation is 630 mm, and average sum of active temperatures ($>10^{\circ}\text{C}$)—2300°. Temperatures during the experiment year were close to long term average. The summer of 2012 was characterised by more rainfall in April, June, and July. Trees were trained as slender spindle. Pest and disease management was carried out according to the rules of the integrated plant protection. The experimental orchard was not irrigated. Tree fertilization was performed according to soil and leaf analysis. Nitrogen was applied before flowering at the rate of 80 kg/ha, and potassium was applied after harvest at the rate of 90 kg/ha. Soil conditions of the experimental orchard were as follows: clay loam, pH: 7.3, organic matter: 2.8%, P_2O_5 : 255 mg/kg, and K_2O : 230 mg/kg. Apple leaves were harvested from 10-year-old apple trees in 2012. The study sample comprised 20 healthy, fully developed leaves collected from different places of each apple tree of each cultivar. Apple leaves were lyophilized with a ZIRBUS sublimator $3 \times 4 \times 5/20$ (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany) at a pressure of 0.01 mbar (condenser temperature, -85°C). The lyophilized apple leaves were ground to a fine powder by using a Retsch 200 mill (Haan, Germany). Loss on drying before analysis was determined by the method of the European Pharmacopoeia [19]. Data were recalculated for absolute dry lyophilized weight.

2.2. Chemicals. All the solvents, reagents, and standards used were of analytical grade. Acetonitrile and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland) and ethanol from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Hyperoside, rutin, quercitrin, phloridzin, phloretin, caffeic acid, and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France), (+)-catechin and (–)-epicatechin from Fluka (Buchs, Switzerland) and avicularin and isoquercitrin from Chromadex (Santa Ana, USA). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), potassium persulfate, sodium acetate trihydrate, iron (III) chloride hexahydrate, and 2,4,6-triphenyl-s-triazine (TPTZ) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid monohydrate, sodium carbonate, aluminum chloride hexahydrate, and hexamethylenetetramine were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland). Deionized water, produced by the Crystal E high-performance liquid chromatography (HPLC, Adrona SIA, Riga, Latvia) water purification system, was used.

2.3. Extraction. An amount of 0.25 g of lyophilized apple leaf powder (exact weight) was weighed, added to 10 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) for 40 minutes at 60°C . The extract obtained was centrifuged for 7 minutes at 6000 rpm with a Hermle Z206A centrifuge (Denville Scientific Inc., USA). The extract was collected and filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

2.4. Spectrophotometric Studies

2.4.1. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Content. All the spectrophotometric measurements were carried out with a Genesys-10 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, Rochester, USA). The total phenolic content (mg GAE/g DW) in the ethanol extracts of apple leaves was determined by the Folin-Ciocalteu method [20]. The total amount of flavonoids in the ethanol extracts of apple leaves was determined using the described methodology [21], calculated from a rutin calibration curve, and expressed as mg/g rutin equivalent (RE) per gram of absolutely dry weight (DW) (mg RE/g DW).

2.4.2. Determination of Antioxidant Activity

(1) DPPH[•] Free Radical Scavenging Assay. The DPPH[•] free radical scavenging activity was determined using the method proposed by Brand-Williams et al. [22]. DPPH[•] solution in 96.3% v/v ethanol (3 mL, 6×10^{-5} M) was mixed with 10 μL of the ethanol extract of apple leaves. A decrease in absorbance was determined at a wavelength of 515 nm after keeping the samples for 30 minutes in the dark.

(2) ABTS^{•+} Radical Cation Decolorization Assay. An ABTS^{•+} radical cation decolorization assay was applied according to the methodology described by Re et al. [23]. A volume of 3 mL

of ABTS^{•+} solution (absorbance 0.800 ± 0.02) was mixed with 10 μ L of the ethanol extract of apple leaves. A decrease in absorbance was measured at a wavelength of 734 nm after keeping the samples for 30 minutes in the dark.

(3) *FRAP Assay*. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was carried out as described by Benzie and Strain [24]. The working FRAP solution included TPTZ (0.01 M dissolved in 0.04 M HCl), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02 M in water), and acetate buffer (0.3 M, pH 3.6) at the ratio of 1:1:10. A volume of 3 mL of a freshly prepared FRAP reagent was mixed with 10 μ L of the apple leaf extract. An increase in absorbance was recorded after 30 minutes at a wavelength of 593 nm.

(4) *Calculation of Antioxidant Activity of the Ethanol Extract of Apple Leaves*. The antioxidant activity of extracts was calculated from Trolox calibration curve and expressed as μ mol Trolox equivalent (TE) per gram of absolutely dry weight (DW). TE was calculated according to the formula: $\text{TE} = c \times V / m$ (μ mol/g); c : the concentration of Trolox established from the calibration curve (in μ M); V : the volume of leaf extract (in L); m : the weight (precise) of lyophilized leaf powder (in g).

2.5. High-Performance Liquid Chromatography. Qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds was performed according to the previously validated and described high-performance liquid chromatography (HPLC) method [25]. A Waters 2695 chromatograph equipped with a Waters 2998 photodiode array (PDA) detector (Waters, Milford, USA) was used for HPLC analysis. Chromatographic separations were carried out by using a YMC-Pack ODS-A (5 μ m, C18, 250 $\times$ 4.6 mm i.d.) column equipped with a YMC-Triart (5 μ m, C18, 10 $\times$ 3.0 mm i.d.) precolumn (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Germany). The column was operated at a constant temperature of 25°C. The volume of the extract being investigated was 10 μ L. The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 minutes, 3%–15% B; 30–45 minutes, 15%–25% B; 45–50 minutes, 25%–50% B; and 50–55 minutes, 50%–95% B.

The identification of the chromatographic peaks was achieved by comparing the retention times and spectral characteristics ($\lambda = 200$ –600 nm) of the eluting peaks with those of reference compounds. The compounds identified were confirmed by spiking the sample with the standard compound and monitoring the changes in the peak shape and spectral characteristics. For quantitative analysis, a calibration curve was obtained by injection of known concentrations of different standard compounds. Dihydrochalcones and catechins were quantified at 280 nm, phenolic acids at 320 nm, and flavonols at 360 nm.

2.6. Statistical Data Processing Methods. All the experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations were calculated with the SPSS 20.0 software (Chicago, USA).

TABLE 1: The total amounts of phenolic compounds (TP) and flavonoids (TFd) in the ethanol extracts of apple leaves of different cultivars.

cv.	TP (mg GAE/g DW) ^a	TFd (mg RE/g DW) ^a
Aldas	163.35 $\pm$ 4.36	45.02 $\pm$ 0.90
Auksis	98.81 $\pm$ 1.51	21.59 $\pm$ 0.52
Ligol	107.93 $\pm$ 2.94	26.97 $\pm$ 0.63
Lodel	159.86 $\pm$ 4.02	39.64 $\pm$ 1.31
	$P < 0.05^b$	$P < 0.05^b$

^aValues are means $\pm$ standard deviations ($n = 3$).

^bBy ANOVA test.

A single factor analysis of variance (ANOVA) along with the post hoc Tukey test was employed for statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to examine the normality of distribution. To verify the hypothesis about the equality of variances, Levene's test was employed. The correlation was evaluated by Pearson analysis. Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results and Discussion

3.1. Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents. In order to determine the patterns of the accumulation of biologically active compounds in plants, it is important to identify their composition and content in separate plant organs. The secondary metabolites of plant metabolism, phenolic compounds, have been detected in apple leaves [3, 16]; therefore, this study aimed at determining the composition and content of phenolic compounds in plants and at determining the patterns of their variation and accumulation.

In this study, the total amount of phenolic compounds in the ethanol extracts of apple leaves varied from 98.81 ± 1.51 mg GAE/g DW (cv. Auksis) to 163.35 ± 4.36 mg GAE/g DW (cv. Aldas) (Table 1). In a study by Iqbal et al. [26], the total phenolic content in the ethanol extracts of apple leaves was 157.06 mg GAE/g DW; meanwhile one Slovenian study reported a lower total phenolic content in apple leaves, ranging from 80 mg GAE/g DW to 115 mg GAE/g DW [16]. Both scab-resistant cultivars, Aldas and Lodel, accumulated significantly higher amounts of total phenolics and total flavonoids. Such differences among the cultivars susceptible and resistant to apple scab have been established in other studies as well [27].

Studies investigating the total phenolic content in the leaf samples of other plants belonging to the *Rosaceae* family have been conducted as well. Methanol extracts from the leaves of various *Sorbus* species were found to have lower total amounts of phenolics ranging from 60.6 to 90.9 mg GAE/g DW [28]. Hua et al. [6], who investigated the samples of pear leaves, reported a lower total phenolic content (68.1–83.3 mg GAE/g DW).

The biological effects of many plant raw materials depend on flavonoids; therefore, studies on the variation in their content are important and relevant. This study determined the total flavonoids content in the ethanol extracts of apple leaves, which ranged from 21.59 ± 0.52 mg RE/g DW (cv.

Auksis) to 45.02 ± 0.90 mg RE/g DW (cv. Aldas) (Table 1). Iqbal et al., who investigated the ethanol extracts of apple leaves, reported a higher total flavonoids content, reaching 121.86 mg RE/g DW [26]. In contrast to that, the ethanol extracts of hawthorn leaves were found to have a lower total flavonoids content ($9.5\text{--}13.0$ mg RE/g DW) [21].

The data on the patterns of variation in the total phenolic and flavonoid contents of apple leaves are scarce. Therefore, this study provides new knowledge about total phenolics and flavonoids content in the apple leaves of the cultivars grown under Lithuanian climatic conditions, allows the comparison of the results obtained with those of other studies, and is valuable to carrying out a search for promising, biologically active substance-accumulating plant raw materials.

3.2. Measurements of Antioxidant Activity in Extracts. After studying the total phenolics and flavonoids content of apple leaves harvested from different cultivars grown under Lithuanian climatic conditions, it is important to examine and assess the antioxidant activity in the extracts of apple leaves. The results obtained during studies will be useful for the selection of apple cultivars in order to provide a consumer with products rich in antioxidants, will be useful for the assessment and standardization of quality of plant raw materials and their products, and will allow predicting an antioxidant effect of apple leaves *in vivo*.

Herbal extracts are multicomponent matrices with antioxidant activity determined by the set of different mechanism reactions, so antioxidant effect cannot be adequately tested using only one method [29, 30]. For these reasons, it is recommended to use at least two different methods for determination of antioxidant activity in herbal extracts [31]. In order to thoroughly evaluate the antioxidant activity of the ethanol extracts of apple leaves, different antioxidant capacity assays (DPPH, ABTS, and FRAP) were employed. The *in vitro* antioxidant effect of the investigated extracts was evaluated by the DPPH and ABTS assays as a capability of DPPH[•] and ABTS^{•+}, compounds possessing an antiradical activity, to scavenge free radicals [22, 23] and by the FRAP assay, as a capability of antioxidants to reduce Fe(III) to Fe(II) [24]. The results of *in vitro* antioxidant activity determined in the ethanol extracts of apple leaves (cultivars Aldas, Auksis, Ligol, and Lodel) are summarized in Figure 1.

It has been previously reported that antioxidant capacity determined by *in vitro* assays differs [32–34]. TE values, obtained from samples of apple leaf extracts antioxidant activity studies, according to the used methods, can be arranged in the following order: DPPH < ABTS < FRAP (Figure 1). This pattern could be explained by differences of applied antioxidant activity determination methods. FRAP assay is a method for measuring total reducing power of electron donating substances, whilst ABTS and DPPH assays are methods for measuring the ability of antioxidant molecules to scavenge ABTS^{•+} and DPPH[•] free radicals, respectively [35, 36]. ABTS and DPPH methods have several differences from one another, which causes their TE values to be different. Some authors indicate that TE or VCE values determined by DPPH method are lower than those determined by ABTS

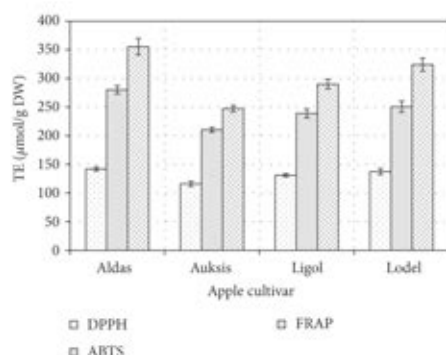


FIGURE 1: The antioxidant activity of ethanol extracts obtained from apple leaves and determined by using DPPH, ABTS, and FRAP assays. Values are means and errors bars indicate standard deviations ($n = 3$).

method [37–40] probably because the DPPH method has more limitations. ABTS radical cation (ABTS^{•+}) is soluble in water and organic solvents, which allows determining antiradical activity of the hydrophilic and lipophilic compounds [30, 41]. DPPH[•] radicals are only soluble in organic solvents, which limits the evaluation of antioxidant activity of hydrophilic antioxidants [36, 42]. Wang et al. found that some of the compounds, which have ABTS^{•+} scavenging activity, may not show DPPH[•] scavenging activity [43]. Arts et al. reported that some products of ABTS^{•+} scavenging reaction may have a considerable contribution to the antioxidant capacity and can continually react with ABTS^{•+} [44].

The analysis of the antioxidant activity in apple leaves revealed differences in the antioxidant activity among the ethanol extracts of the apple leaves of the cultivars investigated (Figure 1). The ethanol extracts obtained from the apple leaves of the cv. Aldas showed the highest TE values. They reached 141.95, 280.23, and 355.54 μmol/g DW for the DPPH, ABTS, and FRAP assays, respectively. To our knowledge, no studies on the antioxidant activity of apple leaves have been carried out so far. Therefore, the findings from this study on antioxidant activity were compared with those obtained in studies on other plants belonging to the Rosaceae family. The methanol extracts obtained from the leaves of different *Sorbus* species showed a higher antioxidant activity; that is, the TE values were higher than those determined in the present study: 344.0–628.3 μmol/g DW by the DPPH assay, 262.5–467.3 μmol/g DW by the ABTS assay, and 861.6–1650.4 μmol/g DW by the FRAP assay [28]. These results could be explained by the fact that apple leaves accumulate high amounts of phloridzin, belonging to the dihydrochalcone class [3, 16], which possesses a lower antioxidant activity than the phenolic compounds belonging to other classes [4, 45].

In order to determine the relationship between the antioxidant activities of the ethanol extracts of apple leaves

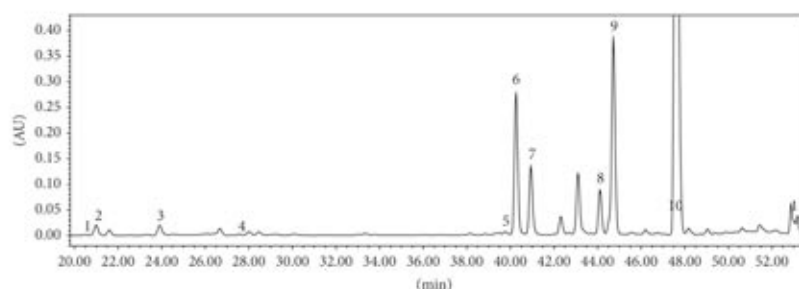


FIGURE 2: Chromatogram of ethanol extract of apple leaf sample (cv. Aldas) investigated ($\lambda = 320$ nm). Numbers indicate the peaks of analytes: 1: (+)-catechin, 2: chlorogenic acid, 3: caffeic acid, 4: (-)-epicatechin, 5: rutin, 6: hyperoside, 7: isoquercitrin, 8: avicularin, 9: quercitrin, 10: phloridzin, and 11: phloretin.

TABLE 2: Content of quercetin glycosides in ethanol extracts obtained from the apple leaves of cultivars grown in Lithuania.

Compound	Content of quercetin glycosides, mg/g (expressed for absolute dry weight) ^a			
	Aldas	Auksis	Ligol	Lodel
Hyperoside	8.95 ± 0.35 ^a	5.67 ± 0.20 ^b	4.59 ± 0.17 ^c	7.03 ± 0.20 ^d
Isoquercitrin	3.48 ± 0.12 ^a	2.79 ± 0.11 ^b	1.84 ± 0.07 ^c	2.40 ± 0.08 ^d
Rutin	0.33 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.03 ^b	0.67 ± 0.02 ^c	0.54 ± 0.02 ^d
Avicularin	2.48 ± 0.10 ^a	2.82 ± 0.10 ^b	2.09 ± 0.07 ^c	2.51 ± 0.08 ^d
Quercitrin	13.36 ± 0.51 ^a	10.29 ± 0.48 ^b	7.77 ± 0.27 ^c	12.31 ± 0.59 ^d

^aValues are means ± standard deviations ($n = 3$). The different letters indicate significant differences between the values ($P < 0.05$).

assessed by the DPPH, ABTS, and FRAP assays and total phenolic as well as flavonoid contents in these extracts, the correlation analysis was carried out. There was a strong positive correlation between total phenolic as well as flavonoid contents and the antioxidant activity assessed by all the methods ($r = 0.84-0.98$, $P < 0.05$). The strongest correlation was found between the antioxidant activity of the ethanol extracts of apple leaves determined by the FRAP method and total flavonoid content ($r = 0.96$, $P < 0.05$) as well as total phenolic content ($r = 0.98$, $P < 0.05$) in these extracts. Other studies published earlier also reported strong correlative relationships between phenolic as well as flavonoid contents and the antioxidant activity of plant extracts evaluated by different assays [46–48].

3.3. Identification and Quantification of Phenolic Compounds by HPLC. The phenolic compounds of various groups, (+)-catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, (-)-epicatechin, rutin, hyperoside, isoquercitrin, avicularin, quercitrin, phloretin, and phloridzin, in the analyzed ethanol extracts obtained from the apple leaves of the cultivars Aldas, Auksis, Ligol, and Lodel were identified by the HPLC method. The values of resolution ($R_s > 2$) were achieved in all the samples of extracts. The applied HPLC method allowed for an effective separation of quercetin glycosides: the separation of rutin and hyperoside in ethanol extracts of lyophilized apple leaf samples with the resolution of 2.63; the separation of hyperoside and isoquercitrin with the resolution of 3.28; and

the separation of avicularin and quercitrin with the resolution of 2.94. The chromatograms of ethanol extracts of apple leaf samples obtained from all the cultivars investigated are identical regarding the number of analytes and retention time. The example of chromatogram of the ethanol extract of the apple leaf sample (cv. Aldas) is shown in Figure 2.

The apple leaves of the cv. Aldas contained the highest total amount of the quercetin glycosides identified and quantified. It was 1.7 times higher than their lowest amount found in the apple leaves of the cv. Ligol (Table 2). Quercitrin was a predominant component among all the quercetin glycosides identified and quantified in the ethanol extracts of apple leaves. The apple leaves of the cv. Aldas had the highest amount of quercitrin. The results obtained are in agreement with literature data that quercitrin is one of the main flavonols found in apple leaves [5, 49]. The results of this study are in line with those reported by the Slovenian study where the quercitrin content in the apple leaves collected in the Maribor region ranged from 6.3 mg/g to 10.8 mg/g (cv. Golden Delicious) and from 3.7 mg/g to 8.5 mg/g (cv. Jonagold) [49]. The factors such as a geographical region and climatic-meteorological and cultivation conditions could influence these quantitative differences.

Rutin was the minor component among all the quercetin glycosides quantified in all ethanol extracts of the apple leaf samples analyzed. The results obtained are confirmed by previously published data on the variation in the composition and content of quercetin glycosides in apple leaves [5].

The highest amount of rutin was detected in the apple leaves of the cv. Aukšis (Table 2). However, the Slovenian study reported contrary findings on the flavonol content in apple leaves. The authors of that study demonstrated that rutin along with quercitrin was one of the major compounds in apple leaves [49].

When comparing quercetin glycoside content and composition variation in apple fruits and leaves grown in Lithuanian climatic conditions, it was found that apple leaves have higher amounts of these compounds. For example, cv. Aldas, cv. Aukšis, and cv. Ligol apple fruits had hyperoside amounts from 0.05 mg/g (cv. Aukšis) to 0.19 mg/g (cv. Aldas) [25] which constitutes only 0.9–2.1% hyperoside content found in leaves of the same apple cultivars. Similar quantitative differences between apple fruit and leaf grown in Lithuania are also typical in other quercetin group compounds.

All the quercetin glycosides identified and quantified in the ethanol extracts of apple leaf samples can be ranked in the following ascending order by their content: rutin < isoquercitrin < avicularin < hyperoside < quercitrin. This order was characteristic of the apple leaves of the cultivars Aukšis, Ligol, and Lodel. In the apple leaves of the cv. Aldas, the amount of isoquercitrin was higher than that of avicularin.

Phloridzin and phloretin, which belong to the dihydrochalcone class, were identified in the ethanol extracts of apple leaf samples. Phloridzin was the major phenolic compound in the apple leaves. It accounted for 76.9% to 84.2% of all phenolic compounds identified and quantified in the extracts of apple leaves by the HPLC method. The results obtained confirm literature data that phloridzin is a predominant component of phenolic compounds in apple leaves [16, 17]. Determined phloretin levels were significantly lower. They make up 1.0–1.8% of all identified and quantified phenolic compounds. This could be interpreted by phloretin and phloridzin molecules structural differences. Phloridzin is phloretin glycoside, which has glucose linked at hydroxy group in molecule's 2' position. Gosch et al. researched dihydrochalcone synthesis processes in apple leaves and found that phloridzin is formed from phloretin by glycosylation reaction, affected by enzyme dihydrochalcone 2'-O-glucosyltransferase [17]. Sugar molecule link to the aglycone influences the physical-chemical properties of flavonoid. Commonly flavonoid glycosides have lower antioxidant activity and are more hydrophilic than their respective aglycones [50, 51]. These characteristics relate to the fact that the flavonoid aglycone has more free hydroxy groups than their corresponding glycosides, which have one or several hydroxy groups with bonded sugar [52, 53]. Rezk et al. indicates that formation of phloridzin by glycosylation of hydroxy group at phloretin molecule's 2' position reduces its antioxidant activity 18 times compared to phloretin [54]. Other researchers who conducted comparative studies of phloretin and phloridzin anti-inflammatory effects and their influence on lipid oxidation report similar patterns. Phloretin has significantly stronger anti-inflammatory [55] and lipid oxidation inhibitory effect [56] than phloridzin. The flavonoid aglycone reactivity explains why glycosides are the most common flavonoid in plants [57, 58]. This pattern

is also characteristic for dihydrochalcone group compounds in apple leaves—glycoside phloridzin levels are significantly higher than its aglycone phloretin levels [3, 59].

Phloridzin has a wide spectrum of biological effects, inhibits the growth of cancer cells [60], improves memory [61, 62], and is useful in the bone fracture prevention [63, 64]. One of the most important and potentially valuable phloridzin biological effects is antidiabetic activity [18, 65]. Main phloridzin pharmacological mechanism of action, leading to its antidiabetic effect, is to produce renal glycosuria and block intestinal glucose absorption through inhibition of sodium-glucose symporters in kidneys and small intestine [66]. The principle uses of phloridzin are associated with its ability to reduce plasma glucose, without changing insulin levels [67, 68]. Phloridzin ability to reverse glucotoxicity and reduce blood glucose levels without increasing body weight determines its benefits in prophylaxis and treatment of type 2 diabetes [69–71]. Phloridzin reduces body weight by blocking the absorption and resorption of glucose [72, 73], and the weight loss is one of the most important type 2 diabetes prevention methods [74, 75]. Phloridzin consumption to reduce glucose concentration in blood plasma does not cause body fluid loss and hypoglycemia risk [66, 76]. For the reasons stated above, it is purposeful to investigate plant materials and extracts that accumulate phloridzin. We believe it is a promising research in developing medicines and food supplements for body weight reduction in the prevention of diabetes. Our assumption is supported by other scientist's research, which offers to use apple leaves to enrich phenolic compounds composition with phloridzin in apple juice [77].

The apple leaves of the cv. Ligol contained the highest concentration of phloridzin. The identified amounts of phloretin were lower than those of phloridzin (Table 3). Such trends in the content of compounds belonging to this dihydrochalcone class have been demonstrated by other studies as well [3]. In contrast to the leaves of apple cultivars grown in Lithuania, phloridzin was not the dominant compound in apple fruits. Determined phloridzin levels were 0.06–0.14 mg/g [25], and it was only 3.9–5.5% of identified and quantified phenolic compounds, tested in varieties cv. Aldas, cv. Aukšis, and cv. Ligol. There was also a distinction of composition of phenolic compounds between the apple fruit and the apple leaf samples. Phloretin was identified only in apple leaf samples but not in apple fruit samples [25, 78].

The highest total amount of phenolic acids identified and quantified by the HPLC method (1.61 ± 0.07 mg/g) was found in the apple leaves of the cv. Aukšis (Table 3). The ethanol extracts of apple leaves contained caffeic acid; its amount was lower than that of chlorogenic acid. The levels of chlorogenic acid were similar or slightly higher than those reported by the earlier studies [49, 79]. Fruit and leaf composition and content of apples cultivated in Lithuanian climatic conditions differed. In cv. Aldas, cv. Aukšis, and cv. Ligol apples, chlorogenic acid was the predominant compound; determined amounts (0.69–2.23 mg/g) were 54.8–69.6% of all identified and quantified phenolic compounds [25]. In apple leaf extracts, phloridzin was dominant and chlorogenic acid was only 0.3–1.0% of all identified phenolic compounds.

Table 3: Content of dihydrochalcones, phenolic acids, and catechins in ethanol extracts obtained from the apple leaves of cultivars grown in Lithuania.

Compound	Content of dihydrochalcones, phenolic acids, and catechins, mg/g (expressed for absolute dry weight) ^a			
	Aldas	Auksis	Ligol	Lodel
Phloridzin	106.01 ± 4.23 ^a	108.9 ± 4.32 ^b	114.43 ± 4.72 ^c	109.51 ± 4.62 ^d
Phloretin	1.81 ± 0.07 ^a	1.52 ± 0.06 ^b	2.40 ± 0.09 ^c	1.40 ± 0.06 ^d
Chlorogenic acid	0.48 ± 0.02 ^a	1.38 ± 0.06 ^b	1.12 ± 0.05 ^c	0.86 ± 0.03 ^d
Caffeic acid	0.26 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.01 ^d
(+)-Catechin	0.05 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.01 ^c	0.17 ± 0.01 ^d
(-)-Epicatechin	0.72 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.02 ^b	0.76 ± 0.02 ^c	0.39 ± 0.01 ^d

^aValues are means ± standard deviations (n = 3). The different letters indicate significant differences between the values (P < 0.05).

Composition differences were also determined; apple leaves contained caffeic acid, while apple fruits did not.

The chemical composition of catechins (monomeric flavan-3-ols) in ethanol extracts obtained from the apple leaves of the cultivars Aldas, Auksis, Ligol, and Lodel was studied. The highest and lowest total amounts of the catechins identified were found in the apple leaves of the cultivars Ligol and Lodel, respectively (0.85 ± 0.04 mg/g versus 0.56 ± 0.02 mg/g) (Table 3). The amounts of (-)-epicatechin in the extracts studied were higher than those of (+)-catechin. Similar amounts of (-)-epicatechin were reported by other authors [3]. (+)-Catechin (0.05–0.15 mg/g) and (-)-epicatechin (0.24–0.45 mg/g) levels determined in apple fruits of Lithuanian cultivated cv. Aldas, cv. Auksis, and cv. Ligol were similar to those determined in apple leaves. Composition differences were also determined—procyanidins (oligomeric flavan-3-ols) group compounds; procyanidin B1 and procyanidin B2 were identified in apple fruits [25, 78], while in apple leaves they were not.

The HPLC analysis of ethanol extracts obtained from apple leaves revealed that phloridzin was the major compound in the samples investigated, and its amounts were considerably higher than those of other phenolic compounds. Quercitrin was a predominant component among quercetin glycosides. The results of the HPLC analysis show that apple leaves are a valuable, natural source of dihydrochalcones and quercetin glycosides. This encourages further research on this plant as a raw material for use in pharmacy.

4. Conclusions

In conclusion, the results of this study will provide new knowledge about the composition and content of phenolic compounds in apple leaves and the antioxidant activity of their extracts, which will give a wide range of possibilities to employ these plants as the source of phenolic compounds. The highest total amounts of phenolic compounds and flavonoids were determined in the apple leaves of the cv. Aldas (163.35 ± 4.36 mg GAE/g DW and 45.02 ± 0.90 mg RE/g DW, resp.). Phloridzin was the major compound in the ethanol extracts of apple leaves of all the cultivars investigated. The apple leaves of the cv. Ligol had the highest amount of phloridzin (114.43 ± 4.72 mg/g DW). Quercitrin was the predominant component among the quercetin glycosides

identified and quantified in ethanol extracts, and its amount in the apple leaves of different cultivars ranged from 7.77 to 13.36 mg/g DW.

The preliminary *in vitro* experiments examining the antioxidant activity of apple leaf extracts by the ABTS, DPPH, and FRAP assays have shown that these extracts possess a strong antioxidant activity, which positively correlated with the total phenolic and flavonoid contents ($r = 0.84$ – 0.98 , $P < 0.05$). The ethanol extracts obtained from the apple leaves of the cv. Aldas showed the highest TE values: 141.95 μmol/g DW by the DPPH assay, 280.23 μmol/g DW by the ABTS assay, and 355.54 μmol/g DW by the FRAP assay.

The results reported in this study prompt further research on the chemical composition and biological effect of apple leaves by evaluating the antioxidant activity of individual phenolic compounds *in vitro* and *in vivo* and confirm a potential of these plants as a raw material in medical practice as well as the development and production of dietary supplements and cosmetic preparations rich in biologically active compounds.

Abbreviations

- ANOVA: A single factor analysis of variance
- ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- cv.: Cultivar
- DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- DW: Dry weight
- FRAP: Ferric reducing antioxidant power
- GAE: Gallic acid equivalent
- HPLC: High-performance liquid chromatography
- Rs: Resolution
- TE: Trolox equivalent
- TFd: Total amount of flavonoids
- TP: Total amount of phenolic compounds
- TPTZ: 2,4,6-triphenyl-1,3,5-triazine
- VCE: Vitamin C equivalent.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by the Foundation of the Lithuanian University of Health Sciences and a Grant from the Research Council of Lithuania (no. SVE-02/2011).

References

- [1] J. Wu, H. Gao, L. Zhao et al., "Chemical compositional characterization of some apple cultivars," *Food Chemistry*, vol. 103, no. 1, pp. 88–93, 2007.
- [2] M. Ceymann, E. Arrigoni, H. Schärer, A. Bozzi Nising, and R. F. Hurrell, "Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 26, no. 1–2, pp. 128–135, 2012.
- [3] A. Picinelli, E. Dapena, and J. J. Mangas, "Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance: a preliminary study," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 43, no. 8, pp. 2273–2278, 1995.
- [4] D. Bonarska-Kujawa, S. Cyboran, J. Oszmiański, and H. Kleszczynska, "Antioxidant properties of apple leaves and fruits extracts from apple leaves and fruits as effective antioxidants," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 11, pp. 2339–2347, 2011.
- [5] U. Mayr, S. Michalek, D. Treutter, and W. Feucht, "Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance," *Journal of Phytopathology*, vol. 145, no. 2–3, pp. 69–75, 1997.
- [6] Y. Hua, H. Guo, X.-G. Zhou et al., "Correlations between soluble sugar and phenol contents in leaves and pear scab resistance," *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, vol. 5, no. 1, pp. 1–4, 2014.
- [7] J. Schováňková and H. Opatová, "Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-ammonia lyase in apples after fungal infections," *Horticultural Science*, vol. 38, no. 1, pp. 1–10, 2011.
- [8] R. Veberic, M. Trobec, K. Herberinger, M. Hofer, D. Grill, and F. Stampar, "Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars of organic and integrated production," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 85, no. 10, pp. 1687–1694, 2005.
- [9] U. Mayr, D. Treutter, C. Santos-Buelga, H. Bauer, and W. Feucht, "Developmental changes in the phenol concentrations of 'golden delicious' apple fruits and leaves," *Phytochemistry*, vol. 38, no. 5, pp. 1151–1155, 1995.
- [10] M. S. Fernandez-Pancho, D. Villano, A. M. Troncoso, and M. C. Garcia-Parrilla, "Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, no. 7, pp. 649–671, 2008.
- [11] B. Halliwell, J. Rafter, and A. Jenner, "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?" *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, pp. 268S–276S, 2005.
- [12] N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chemistry*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
- [13] G. G. Duthie, S. J. Duthie, and J. A. M. Kyle, "Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants," *Nutrition Research Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 79–106, 2000.
- [14] Y. Curin and R. Andriantsitohaina, "Polyphenols as potential therapeutic agents against cardiovascular diseases," *Pharmacological Reports*, vol. 57, pp. 97–107, 2005.
- [15] E. Middleton Jr., C. Kandaswami, and T. C. Theoharides, "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer," *Pharmacological Reviews*, vol. 52, no. 4, pp. 673–751, 2000.
- [16] M. M. Petkovsek, A. Slatnar, F. Stampar, and R. Veberic, "The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, no. 14, pp. 2366–2378, 2010.
- [17] C. Gosch, H. Halbwirth, J. Kuhn, S. Miosic, and K. Stich, "Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.)," *Plant Science*, vol. 176, no. 2, pp. 223–231, 2009.
- [18] S. Masumoto, Y. Akimoto, H. Oike, and M. Kobori, "Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 11, pp. 4651–4656, 2009.
- [19] *European Pharmacopoeia*, vol. 1, Council of Europe, Strasbourg, France, 7th edition, 2010.
- [20] R. Bobinait, P. Viškelis, and P. R. Venskutonis, "Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars," *Food Chemistry*, vol. 132, no. 3, pp. 1495–1501, 2012.
- [21] A. Urbonavičiute, V. Jakštas, O. Kornysiova, V. Janulis, and A. Maruška, "Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts," *Journal of Chromatography A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 339–344, 2006.
- [22] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT—Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [23] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, 1999.
- [24] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration," *Methods in Enzymology*, vol. 299, pp. 15–27, 1998.
- [25] M. Liaudanskas, P. Viškelis, V. Jakštas et al., "Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars," *Journal of Chemistry*, vol. 2014, Article ID 542121, 10 pages, 2014.
- [26] M. Iqbal, M. Sharma, R. F. Ali, M. Yousuf, and A. Hussain, "In vitro antioxidant activity and spectrophotometric quantification of total phenolic and flavonoid contents of *Malus domestica*," *World Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 3, no. 1, pp. 452–471, 2013.
- [27] V. Usenik, M. Mikulič-Petkovšek, A. Solar, and F. Stampar, "Flavonols of leaves in relation to apple scab resistance," *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 111, no. 2, pp. 137–144, 2004.
- [28] M. A. Olszewska and P. Michel, "Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three sorbus species in relation to their polyphenolic composition," *Natural Product Research*, vol. 23, no. 16, pp. 1507–1521, 2009.
- [29] W. Li, A. W. Hydamaka, L. Lowry, and T. Beta, "Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries,

- chokecherry and seabuckthorn," *Central European Journal of Biology*, vol. 4, no. 4, pp. 499–506, 2009.
- [30] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005.
 - [31] K. Schlessier, M. Harwat, V. Böhm, and R. Bitsch, "Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods," *Free Radical Research*, vol. 36, no. 2, pp. 177–187, 2002.
 - [32] P. C. Wootton-Beard, A. Moran, and L. Ryan, "Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods," *Food Research International*, vol. 44, no. 1, pp. 217–224, 2011.
 - [33] S. E. Çelik, M. Özyürek, K. Güçlü, and R. Apak, "Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods," *Talanta*, vol. 81, no. 4–5, pp. 1300–1309, 2010.
 - [34] G.-L. Chen, S.-G. Chen, Y.-Y. Zhao, C.-X. Luo, J. Li, and Y.-Q. Gao, "Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion," *Industrial Crops and Products*, vol. 57, pp. 150–157, 2014.
 - [35] M. N. Alam, N. J. Bristi, and M. Rafiqzaman, "Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity," *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 143–152, 2013.
 - [36] R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata et al., "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay," *Molecules*, vol. 12, no. 7, pp. 1496–1547, 2007.
 - [37] K. S. Miniotti and C. A. Georgiou, "Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity," *Grasas Y Aceites*, vol. 61, no. 1, pp. 45–51, 2010.
 - [38] A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S. I. Koo, and O. K. Chun, "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 24, no. 7, pp. 1043–1048, 2011.
 - [39] M. M. B. Almeida, P. H. M. de Sousa, A. M. C. Arriaga et al., "Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2155–2159, 2011.
 - [40] J. Piljac-Zegarac, T. Stipčević, and A. Belščak, "Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys," *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, vol. 1, no. 2, pp. 43–50, 2009.
 - [41] A. Wojdyło, J. Oszmiański, and R. Czemerys, "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 3, pp. 940–949, 2007.
 - [42] P.-Y. Chao, S.-Y. Lin, K.-H. Lin et al., "Antioxidant activity in extracts of 27 indigenous Taiwanese vegetables," *Nutrients*, vol. 6, no. 5, pp. 2115–2130, 2014.
 - [43] M. Wang, J. Li, M. Rangarajan et al., "Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 12, pp. 4869–4873, 1998.
 - [44] M. J. T. J. Arts, G. R. M. M. Haenen, H.-P. Voss, and A. Bast, "Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 42, no. 1, pp. 45–49, 2004.
 - [45] Y. Lu and L. Y. Foo, "Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace," *Food Chemistry*, vol. 68, no. 1, pp. 81–85, 2000.
 - [46] W. Zheng and S. Y. Wang, "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 11, pp. 5165–5170, 2001.
 - [47] A. Luximon-Ramma, T. Baharun, M. A. Soobrattee, and O. I. Aruoma, "Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 18, pp. 5042–5047, 2002.
 - [48] Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, no. 10, pp. 4113–4117, 1998.
 - [49] M. Mikulić Petkovšek, F. Stampar, and R. Veberic, "Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen," *Journal of Plant Pathology*, vol. 90, no. 1, pp. 49–55, 2008.
 - [50] E. Tripoli, M. L. Guardia, S. Giammanco, D. D. Majo, and M. Giammanco, "Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review," *Food Chemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 466–479, 2007.
 - [51] G. Kottra and H. Daniel, "Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 322, no. 2, pp. 829–835, 2007.
 - [52] P. Montoro, A. Braca, C. Pizza, and N. de Tommasi, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species," *Food Chemistry*, vol. 92, no. 2, pp. 349–355, 2005.
 - [53] A. Hopia and M. Heinonen, "Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, no. 1, pp. 139–144, 1999.
 - [54] B. M. Rezk, G. R. M. M. Haenen, W. J. F. Van der Vijgh, and A. Bast, "The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 295, no. 1, pp. 9–13, 2002.
 - [55] W.-T. Chang, W.-C. Huang, and C.-J. Liou, "Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages," *Food Chemistry*, vol. 134, no. 2, pp. 972–979, 2012.
 - [56] H. P. V. Rupasinghe and A. Yasmin, "Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of Omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin," *Molecules*, vol. 15, no. 1, pp. 251–257, 2010.
 - [57] M. Pikulski and J. S. Brodbelt, "Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 14, no. 12, pp. 1437–1453, 2003.
 - [58] W. Majak, "Review of toxic glycosides in rangeland and pasture forages," *Journal of Range Management*, vol. 54, no. 4, pp. 494–498, 2001.
 - [59] M. M. Petkovšek, A. Slatnar, F. Stampar, and R. Veberic, "Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab," *Biologia Plantarum*, vol. 55, no. 4, pp. 725–730, 2011.
 - [60] S. Veeriah, T. Kautenburger, N. Habermann et al., "Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells

- and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 45, no. 3, pp. 164–174, 2006.
- [61] M. M. Boccia, S. R. Kopf, and C. M. Baratti, "Phlorizin, a competitive inhibitor of glucose transport, facilitates memory storage in mice," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 71, no. 1, pp. 104–112, 1999.
- [62] S.-Y. Zhang, B.-Y. Li, X.-L. Li et al., "Effects of phlorizin on diabetic retinopathy according to isobaric tags for relative and absolute quantification-based proteomics in db/db mice," *Molecular Vision*, vol. 19, pp. 812–821, 2013.
- [63] C. Puel, A. Quintin, J. Mathéy et al., "Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions," *Calcified Tissue International*, vol. 77, no. 5, pp. 311–318, 2005.
- [64] C.-L. Shen, V. von Bergen, M.-C. Chyu et al., "Fruits and dietary phytochemicals in bone protection," *Nutrition Research*, vol. 32, no. 12, pp. 897–910, 2012.
- [65] M. Najafian, M. Z. Jahromi, M. J. Nowrooznejad et al., "Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats," *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 5, pp. 5299–5306, 2012.
- [66] J. R. L. Ehrenkranz, N. G. Lewis, C. R. Kahn, and J. Roth, "Phlorizin: a review," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 21, no. 1, pp. 31–38, 2005.
- [67] M. Kobori, S. Masumoto, Y. Akimoto, and H. Oike, "Phloridzin reduces blood glucose levels and alters hepatic gene expression in normal BALB/c mice," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 7, pp. 2547–2553, 2012.
- [68] H. Zhao, S. Yakar, O. Gavrilova et al., "Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 53, no. 11, pp. 2901–2909, 2004.
- [69] V. Poitout and R. P. Robertson, "Minireview: secondary β -cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity," *Endocrinology*, vol. 143, no. 2, pp. 339–342, 2002.
- [70] T. C. Hardman and S. W. Dubrey, "Development and potential role of type-2 sodium-glucose transporter inhibitors for management of type 2 diabetes," *Diabetes Therapy*, vol. 2, no. 3, pp. 133–145, 2011.
- [71] T. Ohta, H. Morinaga, T. Yamamoto, and T. Yamada, "Effect of phlorizin on metabolic abnormalities in Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats," *Open Journal of Animal Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 113–118, 2012.
- [72] Q. Cai, B. Li, F. Yu et al., "Investigation of the protective effects of phlorizin on diabetic cardiomyopathy in db/db mice by quantitative proteomics," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2013, Article ID 263845, 9 pages, 2013.
- [73] W.-D. Lu, B.-Y. Li, F. Yu et al., "Quantitative proteomics study on the protective mechanism of phlorizin on hepatic damage in diabetic db/db mice," *Molecular Medicine Reports*, vol. 5, no. 5, pp. 1285–1294, 2012.
- [74] J. A. Tayek, "Is weight loss a cure for type 2 diabetes?" *Diabetes Care*, vol. 25, no. 2, pp. 397–398, 2002.
- [75] American Diabetes Association, "Standards of medical care in diabetes—2014," *Diabetes Care*, vol. 37, supplement 1, pp. S14–S80, 2014.
- [76] M. Singhal, S. Rasania, A. Gaur, V. R. M. Vishnu, S. V. R. Raju, and Y. Upadhyay, "Overview on sodium glucose transport inhibitors as a therapeutic tool against diabetes mellitus," *Global Journal of Pharmacology*, vol. 6, no. 2, pp. 86–93, 2012.
- [77] J. Kolniak-Ostek, J. Oszmiański, and A. Wojdyło, "Effect of apple leaves addition on physicochemical properties of cloudy beverages," *Industrial Crops and Products*, vol. 44, pp. 413–420, 2013.
- [78] D. Kvildys, M. Liaudanskas, V. Janulis et al., "Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits," *Plant, Soil and Environment*, vol. 60, no. 5, pp. 234–240, 2014.
- [79] M. Mikulič Petkovšek, V. Usenik, and F. Štampar, "The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.)," *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani Kmetijstvo*, vol. 81, no. 2, pp. 233–242, 2003.

Polifenoliniai junginiai obuoliuose: cheminė sudėtis, struktūros ypatumai, biologinis poveikis (apžvalga)

Mindaugas Liaudanskas¹, Pranas Viškelis², Valdimaras Janulis¹

¹ Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos
Farmacijos fakulteto Farmakognozijos katedra, Mickevičiaus g. 9,
LT-44307 Kaunas, el. paštas farmakog@lsmuni.lt

² Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas Sodininkystės ir
daržininkystės institutas, Kauno g. 30, LT-54333 Babtai, Kauno r.,
el. paštas biochem@lsmi.lt

Obuoliai – vieni labiausiai vartojamų vaisių Lietuvoje ir visame pasaulyje. Jie yra svarbus polifenolinių junginių šaltinis. Pagrindiniai obuoliuose nustatyti polifenoliniai junginiai yra kvercetino grupės flavonoliai, flavan-3-oliai, dihidrochalkonai ir fenolinės rūgštys. Polifenoliniai junginiai yra antriniai augalų metabolitai, kurie atlieka biocheminių procesų moduliatorių funkcijas, apsaugo augalus nuo nepalankių aplinkos poveikių. Polifenolinių junginių biologinis aktyvumas įvairiapusis. Vienas svarbiausių šių junginių veikimo būdų – stiprus antioksidacinis aktyvumas. Polifenoliniai junginiai, veikdami kaip natūralūs antioksidantai, suriša laisvuosius radikalus, slopina jų susidarymo procesus, skatina antioksidacinių aktyvumu pasižyminčių fermentų išsiskyrimą, todėl padeda išvengti oksidacinio streso, sukeliančio struktūrinių organizmo molekulių pažeidimus. Su antioksidaciniu polifenolinių junginių poveikiu susiję ir kiti jų biologinio veikimo būdai: uždegimą slopinantis, antimikrobinis, antivėžinis, širdies ir kraujagyslių sistemos veiklą gerinantis poveikis. Polifenolinių junginių turinčių maisto produktų vartojimas stiprina organizmą, padeda išvengti daugelio ligų ir susirgimų. Obuoliai, kaip polifenolinių junginių turtingas maisto produktas, turi būti įtraukiami į gyventojų racioną, jie yra perspektyvi maisto papildų gamybos žaliava.

Reikšminiai žodžiai: antioksidacinis aktyvumas, obuoliai, polifenoliniai junginiai.

Įvadas. Pastaraisiais metais vis didėja gyventojų dėmesys sveikai gyvensenai, ekologiškiems maisto produktams, augalinės kilmės vaistams ir maisto papildams (Cohen, 2004). Maisto produktai, be pagrindinės funkcijos – aprūpinti organizmą reikiama maisto ir energinėmis medžiagomis, gali stiprinti žmogaus organizmą, veikti profilaktiškai, mažinti ligų riziką (Sėmukienė ir kt., 2007). Didėjantis susidomėjimas augalinėmis žaliavomis plečia jų panaudojimo medicinoje, kosmetikos ir maisto pramonėje galimybes, skatina šiuolaikiškais metodais įvertinti ir aprašyti

augalinių žaliavų išteklius, cheminę sudėtį, analizės metodus, poveikį žmogaus organizmui ir pateikti vartojimo rekomendacijas.

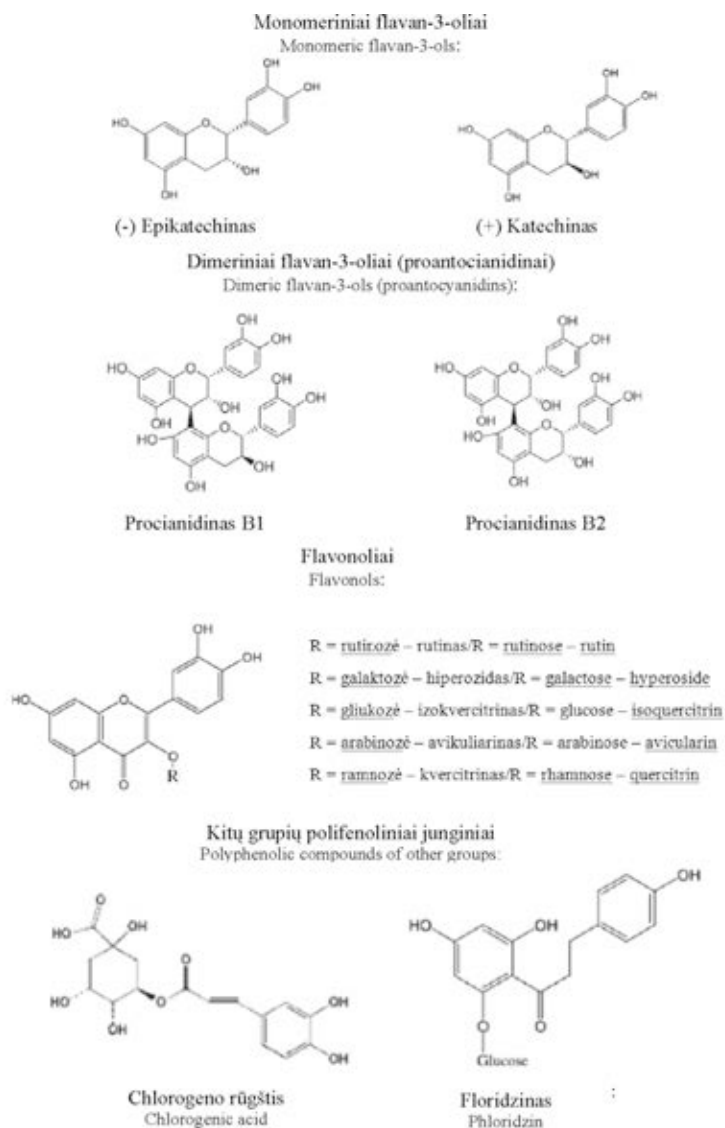
Obuoliai užima svarbią vietą žmogaus racione, jie yra vieni labiausiai vartojamų vaisių visame pasaulyje (Wu ir kt., 2007; Ceymann ir kt., 2012). 2010 m. duomenimis, visame pasaulyje išauginama apie 67,57 milijono tonų obuolių per metus. Daugiausiai obuolių auginančios šalys yra Kinija (apie 33 milijonai tonų per metus), JAV (apie 4,2 milijono tonų per metus) ir Turkija (2,6 milijono tonų per metus) (FAO Stat, 2012). Jie plačiai naudojami maisto pramonėje įvairiems produktams ir gėrimams (sultims, vynui, sidrui) gaminti, taip pat vartojami neapdoroti (Marks ir kt., 2007).

Obuoliai yra svarbus įvairių biologiškai aktyvių medžiagų šaltinis žmogaus organizmui. Juose gausu polifenolinių junginių, organinių rūgščių, vitaminų (daugiausia askorbo rūgšties), makro- ir mikroelementų, skaidulinių medžiagų (Wu ir kt., 2007). Šios medžiagos svarbios organizme vykstantiems fiziologiniams procesams, esant jų trūkumui organizmas tampa neatsparus ligoms, todėl greičiau susergama.

Polifenoliniai junginiai – svarbi augalinių biologiškai aktyvių junginių grupė, turinti organizmą stiprinantį poveikį ir sauganti nuo ligų (El Gharras, 2009). Daug epidemiologinių tyrimų įrodė reikšmingą koreliaciją tarp polifenolinių junginių turtingų maisto produktų vartojimo ir sumažėjusios rizikos sirgti širdies ir kraujagyslių, neurodegeneracinėmis ligomis, vėžiu (Weichselbaum ir kt., 2010; Spencer, 2010; Link ir kt., 2010). Polifenoliniai junginiai lemia stiprų antioksidacinį, antimikrobinį, uždegimo slopinamąjį, antivirusinį, antialerginį, vazodilatacinį poveikį (Pandey, Rizvi, 2009; Cushnie, Lamb, 2005; Havsteen, 2002). Jie slopina riebalų peroksidaciją, trombocitų agregaciją, mažina kapiliarų pralaidumą ir trapumą (Havsteen, 2002; Hollman ir kt., 1996).

Darbo tikslas – atlikti mokslinių tyrimų, nagrinėjančių obuolių polifenolinių junginių cheminę sudėtį, jų reikšmę augalams, struktūros ypatumus ir biologinį poveikį, analizę.

Tyrimo objektas, metodai ir sąlygos. Obuolių polifenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis. Cheminė obuolių sudėtis, priklausomai nuo veislės, labai įvairuoja (Ceymann ir kt., 2012). Vaisiuose nustatyti penkių skirtingų klasių polifenoliniai junginiai: flavonoliai (kvercetino ir izoramnetino glikozidai), dihidrochalkonai (floretinas ir jo glikozidai), flavan-3-oliai (katechinai (monomeriniai flavan-3-oliai) ir procianidinai (polimeriniai flavan-3-oliai)), antocianinai (cianidino glikozidai, ypač cianidino galaktozidas) ir fenolinės rūgštys (daugiausia chlorogeno rūgšties, mažesni kiekiai ferulo, p-kumaro, sinapo, kavos rūgščių) (Četković ir kt., 2008; Tsao ir kt., 2003). Didžioji dalis polifenolinių junginių obuoliuose yra susitelkę vaisiaus luobelėje ir apie sėklas, minkštyme jų kiekiai daug mažesni (Tsao ir kt., 2003; Marks ir kt., 2007). Bendras polifenolinių junginių kiekis įvairių veislių obuoliuose varijuoja nuo 520,0–3 790,0 µg/g (Ceymann ir kt., 2012), luobelėje – 1 016,5–2 350,4 µg/g, minkštyme – 177,4–933,6 µg/g (Tsao ir kt., 2007). Individualių dažniausiai obuoliuose nustatomų polifenolinių junginių kiekiai pateikiami lentelėje (Ceymann ir kt., 2012; Tsao ir kt., 2007; Duda-Chodak ir kt., 2010), o jų formulės – 1 paveiksle.



1 pav. Dažniausiai obuoliuose nustatomų polifenolinių junginių formulės
Fig. 1. Most common polyphenolic compound formulas found in apples

Be polifenolinių junginių, obuoliuose yra ir kitų biologiškai aktyvių medžiagų: organinių rūgščių (bendras kiekis – 75–100 mg/g) – vyno, obuolių, šikimo, gintaro, chinino, maleino, fumaro, citrinų rūgščių; angliavandenių (vidutiniškai – 14 mg/g) – fruktozės, gliukozės, sacharozės, galaktozės, maltozės, ksilozės, ribozės, sorbitolio,

maltitolio, inozitolio, ksilitolio, krakmolo; pektinų (vidutiniškai – 5 mg/g); amino rūgščių – asparagino, serino, glutamino, glicino, histidino, arginino, prolino, alanino, cisteino, tirozino, treonino, valino, metionino, lizino, izoleucino, leucino fenilalanino; riebiųjų rūgščių – palmitino, palmitoleino, stearino, oleino, linolio, linoleno, arachido, arachidono, eikozano ir kt.; vitaminų – askorbo rūgšties (vidutiniškai –120 µg/g), piridoksino, filochinono, mažesni kiekiai retinolio ir tokoferolio; mineralinių medžiagų – kalio (vidutiniškai – 1 440 µg/g), kalcio (70 µg/g), magnio (60 µg/g), fosforo (120 µg/g) (Wu ir kt., 2007; Gerhauser, 2008).

Lentelė. Dažniausiai obuoliuose nustatomi polifenoliniai junginiai

Table. The most common polyphenolic compounds found in apples

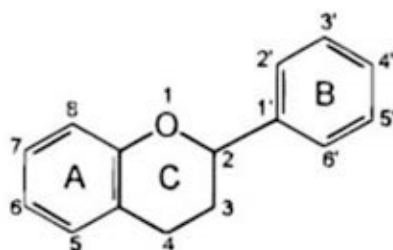
Polifenoliniai junginiai Polyphenolic compounds	Visas obuolys Whole apple, µg/g	Luobelė Peel, µg/g	Minkštumas Flesh, µg/g
Kvercetin-3-O-galaktozidas (hiperozidas)	3,1–36,1	57,8–101,1	0,41–1,25
Kvercetin-3-O-gliukozidas (izokvercitrinas)	0,6–10,9	11,8–89,2	0,31–2,85
Kvercetin-3-O-ksilozidas (reinotrinis)	2,6–12,9	20,3–44,9	0,57–6,91
Kvercetin-3-O-arabinozidas (avikuliarinas)	3,9–25,7	43,5–103,3	0,79–5,80
Kvercetin-3-O-ramnozas (kvercitrinas)	4,1–50,4	32,3–91,4	3,7–6,4
Kvercetin-3-O-rutinozidas (rutinas)	2,0–3,6	2,0–61,0	0,04–0,6
(+) Katechinas	2,3–97,6	38,1–123,9	1,1–55,2
(-) Epikatechinas	5,1–339,2	165,6–591,6	27,6–142,3
Procianidinas B1	2,8–110,3	46,6–254,4	31,9–172,8
Procianidinas B2	6,4–324,3	196,5–468,1	81,9–212,6
Floretin-2'-O-gliukozidas (floridzinis)	3,8–127,7	37,6–172,0	8,0–24,6
Cianidin-3-O-galaktozidas	0,7–8,5	17,4–208,2	Nenustatyta Unknown
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	14,4–700,2	19,3–233,6	103,1–308,0

Polifenolinių junginių reikšmė augalams bei jų struktūros ypatumai. Polifenoliniai junginiai – antriniai augalų metabolitai, aptinkami beveik visuose induočiuose augaluose (Krazeisen ir kt., 2001; Lattanzio ir kt., 2006). Jų reikšmė augalams iki galo neištirta. Manoma, kad polifenoliniai junginiai atlieka biocheminių procesų moduliatorių funkcijas, dalyvauja ekranuojant UV spinduliavimą bei augalui prisitaikant prie nepalankių aplinkos sąlygų (Andersen, Markham, 2006). Jie apsaugo augalų ląsteles nuo oksidacinio bei deguonies trūkumo sukkelto streso, sujungdami susiformavusius laisvuosius radikalus, dėl savo antimikrobinių savybių saugo augalą nuo patogeninių mikroorganizmų (Ghasemzadeh, Ghasemzadeh, 2011; Burchard ir kt., 2000). Dalis polifenolinių junginių yra spalvoti, jie suteikia atspalvius ir spalvas įvairioms augalų dalims: lapams, žiedams, stiebams, vaisiams, todėl atlieka svarbų vaidmenį priviliojant vabzdžius, apdulkinančius augalus (Bruneton, 1999).

Obuoliuose randami polifenoliniai junginiai priskiriami dviem didelėms polifenolinių junginių grupėms: flavonoidams ir fenolinėms rūgštims. Fenolinių rūgščių grupei priskiriama hidroksibenzenkarboksirūgštys ir hidroksicinamono rūgštys (Bravo, 1998).

Hidroksibenzenkarboksirūgštys yra benzoinės rūgšties dariniai, turintys C_6-C_1 struktūrą. Individualius rūgščių skirtumus šioje grupėje sąlygoja aromatinio žiedo hidroksilo (-OH) ir metoksi- (CH_3O -) grupių pakaitai (Manach ir kt., 2004; Del Rio ir kt., 2010). Obuoliuose nustatyti nedideli hidroksibenzenkarboksirūgščių grupei priklausančių galo, protokatecho, siringo rūgščių kiekiai (Schieber ir kt., 2001). Hidroksicinamono rūgštis, dar vadinamoms fenilpropanoidais, būdinga C_6-C_3 struktūra (Manach ir kt., 2004). Obuoliuose hidroksicinamono rūgštys aptinkamos laisvos (kavos, ferulo, p-kumaro ir sinapo rūgštys) arba kaip esteriai su chino, šikimo, vyno rūgštimis, arba susijungę angliavandenių molekulėmis (Schieber ir kt., 2001; Kahle ir kt., 2005). Chlorogeno rūgštis, susidaranti kavos ir chino rūgščių esterifikacijos metu, yra viena labiausiai paplitusių fenolinių rūgščių augaluose (Ghasemzadeh, Ghasemzadeh, 2011). Obuoliuose ši rūgštis yra vienas dominuojančių polifenolinių junginių, obuolio minkštyme chlorogeno rūgšties kiekis sudaro apie 90 proc. visų polifenolinių junginių (Tsao ir kt., 2003).

Flavonoidai yra didžiausia polifenolinių junginių grupė (Del Rio ir kt., 2010). Jiems priskiriama daugiau kaip pusė visų žinomų polifenolinių junginių (Balasundram ir kt., 2006). Obuoliuose flavonoidai sudaro didelę polifenolinių junginių dalį (Price ir kt., 1999). Flavonoidai yra mažos molekulinės masės junginiai. Jų aglikono pagrindas yra $C_6-C_3-C_6$ struktūra, susidedanti iš dviejų aromatinių benzeno žiedų (A ir B žiedai), sujungtų trimis anglies atomais, paprastai per deguonies tiltelį suformuojančiais heterociklinį žiedą (C žiedas) (Andersen, Markham, 2006). Flavonoidų aglikono struktūra pavaizduota 2 paveiksle.



2 pav. Flavonoidų aglikono struktūrinis pagrindas
Fig. 2. The principal structure of flavonoid aglycone

Flavonoidai pagal įvairias C žiedo modifikacijas skirstomi į 6 poklasių: flavonolius, flavonus, flavan-3-olius (katechinas), flavanonus, antocianinus ir izoflavonoidus (Andersen, Markham, 2006). Individualius skirtumus tarp to paties poklasio junginių lemia įvairūs A ir B žiedų hidroksilo grupės pakaitai, kurie gali būti metilinti, acilinti, sulfatuoti, prenilinti ir glikozilinti (Manach ir kt., 2004). Obuoliuose paprastai aptinkama flavonolių, flavan-3-olių ir antocianinų poklasių flavonoidų (Četković ir kt., 2008). Dažniausiai jie yra glikozidų pavidalo (Awad ir kt., 2000). Obuolių flavonoidų

aglikonai dažniausiai yra susijungę su galaktoze, taip pat su gliukoze, ramnoze, ksiloze, arabinoze, rutinoze (Amzad ir kt., 2010). Laisvų flavonoidų aglikonų (kaip laisvo kvercetino) obuoliuose nustatyti nedideli kiekiai (Schieber ir kt., 2001).

Polifenolinių junginių biologinis poveikis. Antioksidacinis poveikis. Polifenoliniai junginiai – svarbi augalinių biologiškai aktyvių junginių grupė, stiprinanti organizmą ir apsauganti nuo ligų (El Gharras, 2009; Sun ir kt., 2002). Vienas svarbiausių šių junginių veikimo būdų – stiprus antioksidacinis aktyvumas, su kuriuo susiję dauguma polifenolinių junginių biologinių poveikių (Scalbert ir kt., 2005). Daugelio polifenolinių junginių antioksidacinis aktyvumas yra daug didesnis nei gerai žinomų antioksidantų: askorbo rūgšties ir vitamino E (Prior, Cao, 2000). Organizme, dėl vidinių (uždegimų, aktyvios peroksidacijos peroksisomose, aktyvios fagocitozės, metabolinių reakcijų ir kt.) ir išorinių (rūkymas, UV ar radiacinė spinduliuotė, aplinkos užterštumas, ozonas ir kt.) veiksnių įtakos susidaro aktyvios deguonies formos (Kohen, Nyska, 2002). Reaktyviausios deguonies formos yra laisvieji radikalai: hidroksiradikalas $\text{OH}\cdot$, superoksido radikalas $\text{O}_2^{\cdot-}$, azoto oksido $\text{NO}\cdot$ ir lipidų peroksidų $\text{LOO}\cdot$ radikalai (Orrenius ir kt., 2007). Jie pažeidžia struktūrines organizmo makromolekules: baltymus, lipidus, angliavandenius, DNR, ir taip sąlygoja susirgimą daugeliu ligų (tokių kaip vėžys, Parkinsono ir Alzheimerio ligos, aterosklerozė ir kt.) (Halliwell, 2001; Markesbery, 1999; Steinberg, 1997). Polifenolinių junginių antioksidacinis poveikis pasireiškia per daugelį sudėtingų mechanizmų:

1) tiesioginė laisvųjų radikalų surišimo geba. Tyrimais nustatyta, kad vienas svarbiausių polifenolinių junginių antioksidacinio poveikio mechanizmų yra šių junginių gebėjimas sujungti ir inaktyvuoti laisvuosius radikalus (Halliwell ir kt., 1995). Laisvųjų radikalų sujungimas vyksta polifenoliniams junginiams atiduodant laisvos hidroksilo grupės vandenilio atomą, dėl to paprastai susidaro mažiau reaktyvūs ir stabilesni fenoksilo radikalai (Arora ir kt., 1998). Polifenoliniai junginiai gali efektyviai sujungti daugelį reaktyvių žmogaus organizme susidarančių radikalinių (superoksido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroksilo ($\text{ROO}\cdot$), hidroksilo ($\text{HO}\cdot$), alkoksilo ($\text{RO}\cdot$) ir azoto oksido ($\text{NO}\cdot$) laisvieji radikalai) ir neradikalinių (vandenilio peroksidas (H_2O_2), singletinis deguonis ($^1\text{O}_2$), peroksinitrilas ($\text{NOO}^\cdot$) bei hipochlorito rūgštis (HOCl)) oksidantų, taip apsaugodami struktūrines organizmo makromolekules nuo pažeidimų (Halliwell, 1991).

2) aktyviųjų deguonies ir azoto formų susidarymo procesų slopinimas. Jis susijęs su polifenolinių junginių gebėjimu surišti metalų jonus. Pereinamųjų metalų (ypač Fe^{2+} ir Cu^+) jonai atlieka svarbų vaidmenį Fentono ir Haber-Weiso reakcijų metu formuojantis ypač reaktyviems hidroksilo radikalams (Perron, Brumaghim, 2009). Fentono reakcijos metu susidariusios lipidų peroksidazės (LOOH) suvirsta suformuodamos stiprius oksidantus, alkoksilo radikalus, sukeliančius grandines lipidų peroksidacijos reakcijas (Fernandez ir kt., 2002). Polifenoliniai junginiai sujungia pereinamųjų metalų jonus ir taip apsaugo ląsteles nuo jų generuojamų laisvųjų radikalų sukkelto oksidacinio streso (Hider ir kt., 2001).

Polifenoliniai junginiai inhibuoja fermentus, inicijuojančius uždegimus, kurių metu didėja laisvųjų radikalų gamyba (Al-Awwadi ir kt., 2005). Jie slopina oksidacinių fermentų: ksantino oksidazės ir proteino kinazės C, generuojančių $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalus, NO sintazės, gaminančios $\text{NO}\cdot$ radikalus, mieloperoksidazės, atsakingos už HOCl susidarymą, aktyvumą, taip mažindami laisvųjų radikalų gamybą (Prochazkova ir kt., 2011;

Kettle, Winterbourn, 1997). Polifenoliniai junginiai, ypač flavonoidai, slopina ir kitas fermentines sistemas, formuojančias laisvuosius radikalus: lipoksigenazes, ciklooksigenazes, citochromo oksidazę, prolino hidroksilazę, mitochondrinę suksinoksidazę (Havsteen, 2002; Kim ir kt., 1998).

3) polifenoliniai junginiai gali apsaugoti kitus antioksidantus nuo oksidacinio poveikio ir suardymo (Graversen ir kt., 2008). Nustatyta, kad kai kurie flavonoidai (ypač kvercetas, rutinas) apsaugo askorbo rūgštį nuo oksidacijos (Havsteen, 2002). Vienas galimų šio poveikio mechanizmų susijęs su polifenolinių junginių gebėjimu surišti vario ir kitų pereinamųjų metalų jonus ir tokiu būdu apsaugoti vitaminą C nuo šių jonų katalizuojamos oksidacijos (Bors ir kt., 1995). Polifenolinių junginių gebėjimas surišti laisvuosius radikalus taip pat apsaugo vitaminą C nuo transformacijos į neaktyvią dehidroaskorbo rūgštį (Bors ir kt., 1995). Polifenoliniai junginiai (ypač kavos rūgštis, kvercetas, miriscetas) gali apsaugoti α -tokoferolį, esantį mažo tankio lipoproteinuose. Manoma, kad pagrindinis šio poveikio mechanizmas yra polifenolinių junginių gebėjimas regeneruoti α -tokoferolį iš α -tokoferoksilo radikalo vandenilio atomų atidavimo reakcijos metu (Zhu ir kt., 1999).

4) naujausių tyrimų duomenimis, polifenoliniai junginiai skatina antioksidaciniu veikimu pasižyminčių fermentų išsiskyrimą. Jie gali indukuoti genų, koduojančių antioksidacinių (superoksido dismutazės, katalazės) ir II fazės detoksifikuojančių (NAD(P)H-kvino oksidoreduktazės, glutatono S-transferazės ir UDP-gliukuronoziltransferazės) fermentų ekspresiją, tokiu būdu padėdami kontroliuoti ląstelių redokso būklę bei saugoti jas nuo oksidacinės žalos (Nijveldt ir kt., 2001).

Uždegimą slopinantis poveikis. Tyrimais nustatytas polifenolinių junginių uždegimą slopinantis veikimas. Šie junginiai slopina uždegimą, mažindami jį sukeliančių fermentų (ciklooksigenazės ir lipoksigenazės) bei mediatorių (leukotrienų ir prostaglandinų) aktyvumą (Boots ir kt., 2008; Nijveldt ir kt., 2001). Pagrindinis uždegimą slopinančio poveikio mechanizmas – uždegimo mediatorių (histamino, serino proteazių, prostaglandinų ir leukotrienų) atpalaidavimo ir sintezės slopinimas (Havsteen, 2002). Įrodyta, kad polifenoliniai junginiai slopina fermentus ciklooksigenazę-1 ir ciklooksigenazę-2, kurie katalizuoja prostaglandinų susidarymą iš arachidono rūgšties (Sergent ir kt., 2010). Prostaglandinai kartu su kitais uždegimo mediatoriais didina kapiliarų pralaidumą, sukelia alergines reakcijas ir veikia pirogeniškai (Skrede, Wrolstad, 2002). Be to, nustatyta, kad ciklooksigenazę-2 yra slopinama labiau. Tai labai svarbu uždegimo slopinamajai terapijai, nes selektyvesnis poveikis sukelia mažiau nepageidaujamų šalutinių efektų.

Poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai. Polifenolinių junginių poveikis širdies ir kraujagyslių sistemai yra glaudžiai susijęs su šių junginių antioksidaciniu ir uždegimo slopinamuoju veikimu. Įrodyta, kad polifenoliniai junginiai apsaugo širdies ir kraujagyslių sistemą nuo išemijos/reperfuzijos ir oksidacinio streso (Morton ir kt., 2000). Jie taip pat apsaugo kraujagyslių endotelio ląsteles, slopina trombocitų agregaciją, atpalaiduoja kraujagysles (Vita, 2005). Mokslinėje literatūroje aprašytas kraujagysles nuo aterosklerotinių plokštelių susidarymo apsaugantis poveikis. Polifenoliniai junginiai tiesiogiai mažina mažo tankio cholesterolio oksidaciją arba veikia per vitaminą E, apsaugodami jį nuo oksidacijos, mažina kapiliarų trapumą, normalizuoja kraujagyslių pralaidumą, todėl vartojami gydant venų nepakankamumą,

parestezijas, edemas, glaukomą (Havsteen, 2002).

Yra nemažai duomenų apie polifenolinių junginių poveikį, esant padidėjusiam kraujospūdžiui. Tyrimų rezultatai rodo, kad, naudojant skirtingus hipertenzijos modelius (spontanines hipertenzines žiurkes), kvercetas, priklausomai nuo dozės (2–300 mg/kg per dieną), sumažina kraujospūdį, apsaugo nuo morfologinių ir funkcinių širdies, kraujagyslių bei inkstų pažeidimų (Sesso ir kt., 2003). Manoma, kad toks poveikis pasireiškia dėl to, kad polifenoliniai junginiai, ypač kvercetino grupės flavonoidai, veikia kaip reaktyviųjų deguonies formų gaudyklė, sugeba reguliuoti NADPH oksidazę, atpalaiduoja kraujagysles. Polifenolinių junginių antioksidacinės savybės po išemijos/reperfuzijos padarytų pažeidimų pasireiškia surišant $O_2^{\bullet-}$ ir $OH^{\bullet}$ radikalus arba slopinant ksantino oksidazės aktyvumą ir lipidų peroksidacijos procesus (Hertog ir kt., 1993). Taip pat nustatytas tiesioginis kvercetino antihipertenzinis poveikis. Kvercetas inhibuoja fosfodiesterazę, dėl šio fermento slopinimo padidėja inkstų filtracija, daugiau vandens pašalinama su šlapimu, mažėja arterinis kraujospūdis (Lakhanpal, Rai, 2007).

Antivėžinis poveikis. Polifenoliniai junginiai yra svarbūs biologiškai aktyvūs junginiai, saugantys nuo karcinogenezės ir mutagenozės bei padedantys gydyti vėžį. Jie suriša laisvuosius radikalus, aktyvina arba slopina fermentus, apsaugo lipidus, baltymus ir nukleino rūgštis (Chang ir kt., 1994; Chithan ir kt., 2005). Polifenoliniai junginiai slopina vėžinių ląstelių augimą bei jų transformaciją, navikų augimą, vėžinių ląstelių proliferaciją, angiogenezę, skatina vėžinių ląstelių apoptozę (Chithan ir kt., 2005; Lakhanpal, Rai, 2007). Taip pat jie inhibuoja tirozinui specifinius fermentus: baltymų kinazes, topoizomerazę I ir topoizomerazę II (Lopez-Lazaro, 2002). Dėl to vėžinių ląstelių augimas ir dalijimasis sulėtėja. Ne visi polifenoliniai junginiai turi vienodą poveikį vėžinėms ląstelėms. Nustatyta, kad stipriausiu antivėžiniu veikimu pasižymi kvercetino grupės flavonoliai (Chahar ir kt., 2011). Atlikus tyrimus *in vitro*, nustatyta, kad kvercetas ir jo glikozidai slopina įvairių organų (prostatos, gimdos kaklelio, plaučių, krūties, storosios žarnos) vėžinių ląstelių augimą ir dalijimąsi (Havsteen, 2002; Ren ir kt., 2003). Gauti rezultatai buvo patvirtinti atlikus bandymus su gyvūnais: laboratorinių gyvūnų, šertų kvercetino turinčiu pašaru, vėžinių ląstelių vystymasis ir dalijimasis sulėtėjo (Lamson, Brignall, 2000; Ren ir kt., 2003).

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad kvercetas ir jo glikozidai slopina karcinogenezės procesus – inhibuoja 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetato (TPA) indukuotą ląstelių transformaciją ir transkripcijos aktyvatoriaus proteino 1 (AP-1) aktyvaciją (Havsteen, 2002; Ren ir kt., 2003). Šis poveikis susijęs su o-dihidroksifenil- struktūra kvercetino B žiede (Joshi ir kt., 2011). Jis būdingas kvercetinui ir jo glikozidams, karcinogenezę slopinantį poveikį išlaiko ir dauguma kvercetino metabolitų, tačiau manoma, kad jis silpnesnis nei laisvo kvercetino aglikono (Heim ir kt., 2002; Lopez-Lazaro, 2002). Flavonoidai, neturintys B žiede o-dihidroksifenil- struktūros, antivėžiniu aktyvumu nepasižymi (Lopez-Lazaro, 2002).

Antimikrobinis poveikis. Mokslinėje literatūroje aprašytas įvairių polifenolinių junginių grupių antimikrobinis poveikis (Gatto ir kt., 2002). Mikrobiologai ilgai diskutavo, koks yra šio jų poveikio mechanizmas. Atsižvelgiant į atliktus tyrimus, dabartinėje mokslinėje literatūroje linkstama daryti išvadą, kad polifenoliniai junginiai bakterijų nesunaikina, jų veikimas labiau bakteriostatinis (Crozer ir kt., 2010). Yra

keletas šio poveikio mechanizmų:

1) nukleorūgščių sintezės slopinimas. Atliktais moksliniais tyrimais nustatyta, kad polifenoliniai junginiai veiksmingai slopina *Proteus vulgaris* DNR sintezę. *S. aureus* bakterijose labiausiai slopinama RNR sintezė. Taip pat šiek tiek slopinama bakterijų lipidų ir baltymų sintezė, bet šie procesai nėra labai intensyvūs. Stipriausiai nukleorūgščių sintezę slopina kvercetino grupės flavonoliai. Šis poveikis grindžiamas tuo, kad flavonolių B žiedo hidroksilo grupės sudaro vandenilinius ryšius su nukleorūgščių azotinėmis bazėmis. Ištyrus *E. coli* bakterijas paaiškėjo, kad šių bakterijų DNR girazė slopinama 14 skirtingų flavonoidų. Taip pat nustatytas polifenolinių junginių bakteriostatinis poveikis *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* ir *Stenotrophomonas maltophilia* bakterijoms. Tačiau svarbu pažymėti, kad stiprių koreliacinių ryšių tarp DNR girazės slopinimo ir antibakterinio aktyvumo nebuvo nustatyta, todėl manoma, kad antibakteriniam polifenolinių junginių poveikiui įtakos turi ir kiti mechanizmai (Cushnie, Lamb, 2005; Gatto ir kt., 2002);

2) mikroorganizmų metabolizmo slopinimas. Antrasis ne mažiau svarbus polifenolinių junginių bakteriostatinio poveikio mechanizmas yra mikroorganizmų metabolizmo slopinimas. Haraguchi ir kt. nustatė, kad polifenoliniai junginiai (daugiausia flavonoidai) inhibuoja bakterijų NADH-citochromo c reduktazę, dėl to slopinama elektronų pernaša kvėpavimo grandinėje ir bakterijų energijos metabolizmas. Manoma, kad toks slopinimo mechanizmas labiausiai veikia *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* mikroorganizmus, o *Escherichia coli* bakterijose jis nenustatytas (Gatto ir kt., 2002; Crozer ir kt., 2010; Cushnie, Lamb, 2005).

Antropinis poveikis. Polifenoliniai junginiai saugo nuo skrandžio opaligės atsiradimo ir vystymosi. Vienas iš skrandžio opaligę sukeliančių veiksnių yra padidėjęs ciklooksigenazės aktyvumas. Polifenolinių junginių opų prevencinis poveikis grindžiamas tuo, kad jie, panašiai kaip acetilsalicilo rūgštis, gali blokuoti aminorūgšties serino, esančio ciklooksigenazės aktyviajame centre, hidroksilo grupes. Tiesa, tokį poveikį daro ne visi, o tik acilo grupę savo struktūroje turintys (t.y. acilinti) polifenoliniai junginiai (Havsteen, 2002; Mota ir kt., 2009).

Kita labai dažna skrandžio opaligės priežastis – *Helicobacter pylori* infekcija. *Helicobacter pylori* padermės sukeliama infekcija yra viena pagrindinių susirgimo skrandžio opalige ir skrandžio vėžiu priežasčių (González-Segovia ir kt., 2008). Manoma, kad polifenoliniai junginiai, ypač antocianinai ir kvercetino grupės flavonoliai, turi poveikį *Helicobacter pylori* padermės bakterijoms. Gydant *Helicobacter pylori* padermės bakterijų sukeliamas ligas ir kartu vartojant augalinės kilmės preparatus, kuriuose biologiškai aktyvios medžiagos yra polifenoliniai junginiai, galima pagerinti gydymo efektyvumą ir šiuos preparatus naudoti skrandžio opaligei gydyti ir jos profilaktikai (González-Segovia ir kt., 2008; Mota ir kt., 2009). Nors polifenolinių junginių įtraukimas į opalige sergančių pacientų dietą akivaizdžiai pagerino pasveikimo rodiklius (panašūs teigiami rezultatai gauti atlikus tyrimą su jūrų kiaulytėmis (González-Segovia ir kt., 2008), tikslus antibakterinio poveikio *Helicobacter pylori* bakterijoms mechanizmas nėra galutinai įrodytas. Atsižvelgiant į tai, kad polifenoliniai junginiai turi bakteriostatinį poveikį nemažai daliai mikroorganizmų, tikėtina, kad jie taip veikia ir *Helicobacter pylori* bakterijas, tačiau norint tą patvirtinti, reikia atlikti išsamesnius tyrimus (Havsteen, 2002; Mota ir kt., 2009).

Išvados. Obuoliai yra polifenolinių junginių turtingas maisto produktas. Didžiausi šių junginių kiekiai kaupiasi vaisiaus luobelėje. Lietuvoje užaugintų obuolių polifenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis dar nėra tyrinėta, todėl svarbu atlikti tyrimus ir nustatyti Lietuvos sąlygomis užaugintų obuolių individualių polifenolinių junginių kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

Polifenoliniai junginiai yra svarbūs žmogaus organizmui, jie lemia daugelį biologinių poveikių. Vienas svarbiausių polifenolinių junginių veikimo būdų – stiprus antioksidacinis poveikis, todėl būtina šiuolaikiškais analizės metodais įvertinti obuolių ekstraktų antioksidacinį poveikį *in vitro* ir *in vivo*.

Obuoliai yra perspektyvi augalinė maisto papildų gamybos žaliava, todėl svarbu parinkti efektyviausią polifenolinių junginių ekstrakcijos iš obuolių ėminių metodą.

Skirtingų veislių obuolių cheminė sudėtis yra nevienoda, ji gali labai įvairuoti, todėl svarbu nustatyti potencialiai vertingas obelių veisles ir skatinti jų auginimą Lietuvoje. Šių veislių obuoliai, turintys daug polifenolinių ir kitų biologiškai aktyvių junginių, galėtų būti įtraukiami į polifenolinių junginių turtingų maisto produktų dietas, o jų ekstraktai naudojami maisto papildams gaminti.

Padėka. Darbą finansavo Lietuvos mokslo taryba (projekto Nr. SVE-02/2011).

Gauta 2012 05 09

Parengta spausdinti 2012 06 12

Literatūra

1. Al-Awwadi N. A., Araiz C., Bornet A., Delbosc S., Cristol J. P., Linck N., Azay J., Teissedre P. L., Cros G. 2005. Extracts Enriched in Different Polyphenolic Families Normalize Increased Cardiac NADPH Oxidase Expression while Having Differential Effects on Insulin Resistance, Hypertension, and Cardiac Hypertrophy in High-Fructose-Fed Rats. *J. Agric. Food Chem.*, 53(1): 151–157.
2. Amzad H. M., Salehuddin S. M., Mizanur R. S. M., Kabir M. J. 2010. The effect of solvents on recovery of polyphenols from the pink fuji apple skin. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 10: 2 556–2 569.
3. Andersen Ø. M., Markham K. R. 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, New York.
4. Arora A., Nair M. G., Strasburg G. M. 1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, 24(9): 1 355–1 363.
5. Awad M. A., de Jager A., van Westing L. M. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Sci. Hortic.*, 83: 249–263.
6. Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99: 191–203.

7. Boots A. W., Lonneke C., Wilms L. C., Swennen E. L. R., Jos C. S., Kleinjans J. C. S., Bast A., Haenen G. R. M. M. 2008. *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*, 24: 703–710.
8. Bors W., Michel C., Schikora S. 1995. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* 19(1): 45–52.
9. Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56: 317–333.
10. Bruneton J. 1999. Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants. Lavoisier publishing, Paris.
11. Burchard P., Bilger W., Weissenbock G. 2000. Contribution of hydrocinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ.*, 23: 1 373–1 380.
12. Ceymann M., Arrigoni E., Schäfer H., Nising A. B., Hurrell R. F. 2012. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2): 128–135.
13. Četković G., Čanadanović-Brunet J., Djilas S., Savatović S., Mandić A., Tumbas V. 2008. Assessment of polyphenolic content and *in vitro* antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem.*, 109: 340–347.
14. Chahar M. K., Sharma N., Dobhal M. P., Joshi Y. C. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Phcog Rev.*, 5: 1–12. <http://www.phcogrev.com/text.asp?2011/5/9/1/79093>
15. Chang W. S., Lee Y. L., Lu F. J., Chiang H. C. 1994. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 13: 2 165– 2 170.
16. Chithan K., Lung-Ta L., Ping-Ping H. L., Juan-Juan H., Ferng-Chun K., Ying-Tung H., Ming-Ting L. 2005. The Antitumor Activities of Flavonoids. *In vivo*, 19: 895–910.
17. Cohen M. H. 2004. Legal and ethical issues in complementary medicine: a United States perspective. *Med. J. Aust.*, 181(3): 168–169.
18. Crozier A., Del Rio D., Clifford M. N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 446–467.
19. Cushnie T. P. T., Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356.
20. Del Rio D., Borges G., Crozier A. 2010. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, 104: S67–S90.
21. Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P., Tuszyński T. 2010. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.*, 18: 39–50.
22. El Gharras H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 2 512–2 518.
23. FAO Stat Database. 2012. [http:// faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)

24. Fernandez M. T., Mira M. L., Florêncio M. H., Jennings K. R. 2002. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Biochem.*, 92: 105–111.
25. Gatto M. T., Falcocchio S., Grippa E., Mazzanti G., Battinelli L., Nicolosi G., Lambusta D., Saso L. 2002. Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10: 269–272.
26. Gerhauser C. 2008. Cancer Chemopreventive Potential of Apples, Apple Juice, and Apple Components. *Planta Med*, 74: 1 608–1 624.
27. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31): 6 697–6 703.
28. González-Segovia R., Quintanar J. L., Salinas E., Ceballos-Salazar R., Aviles-Jiménez F., Torres-López J. 2008. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *Journal of Gastroenterology*, 43(6): 441–447.
29. Graversen H. B., Becker E. M., Skibsted L. H., Andersen M. L. 2008. Antioxidant synergism between fruit juice and α -tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and high ascorbic blackcurrant (*Ribes nigrum*). *Eur. Food Res. Technol.* 226: 737–743.
30. Halliwell B., Murcia M. A., Chirico S., Aruoma O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci.*, 35: 7–20.
31. Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3): 14–22.
32. Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs and Aging*, 18: 685–716.
33. Havsteen B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67–202.
34. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572–584.
35. Hertog M. G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.*, 342: 1 007–1 011.
36. Hider R. C., Liu Z. D., Khodr H. H. 2001. Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335: 190–203.
37. Hollman P. C., Hertog M. G., Katan M. B. 1996. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans.*, 24: 785–789.

38. Joshi U. J., Gadge A. S., D'Mello P., Sinha R., Srivastava S., Govil G. 2011. Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of Quercetin and its analogues. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(4): 1 756–1 766.
39. Kahle K., Kraus M., Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 797–806.
40. Kettle A. J., Winterbourn C. C. 1997. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox. Rep.* 3: 3–15.
41. Kim H. P., Mani L., Iversen L., Ziboh V. A. 1998. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 58(1): 17–24.
42. Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30(6): 620–650.
43. Krazeisen A., Breitling R., Möller G., Adamski J. 2001. Phytoestrogens inhibit human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171: 151–162.
44. Lakhanpal P., Rai D. K. 2007. Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2): 22–37.
45. Lamson D. W., Brignall M. S. 2000. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. *Altern. Med. Rev.*, 5(3): 196–208.
46. Lattanzio V., Lattanzio V. M. T., Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: F. Imperato (ed.), *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, India, 23–67.
47. Link A., Balaguer F., Goel A. 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80: 1 771–1 792.
48. Lopez-Lazaro M. 2002. Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, 2(6): 691–714.
49. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 727–747.
50. Markesbery W. R. 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 9: 133–146.
51. Marks S. C., Mullen W., Crozier A. 2007. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 719–728.
52. Morton L. W., Abu-Amsha Caccetta R., Puddey I. B., Croft K. D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27(3): 152–159.
53. Mota K. S. L., Dias G. E. N., Pinto M. E. F., Luiz-Ferreira Â., Monteiro Souza-Brito A. R., Hiruma Lima C. A., Barbosa Filho J. M., Batista L. M. 2009. Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules*, 14: 979–1012.

54. Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Norren K., Leeuwen P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 418–425.
55. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: Implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 143–183.
56. Pandey K. B., Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2: 270–278.
57. Perron N. R., Brumaghim J. L. 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem. Biophys.*, 53: 75–100.
58. Price K. R., Prosser T., Richetin A. M., Rhodes M. J. C. 1999. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chem.*, 66: 489–494.
59. Prior R. L., Cao G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Hortscience*, 35: 588–592.
60. Prochazkova D., Boušova I., Wilhelmova N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513–523.
61. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. 2003. Flavonoids: Promising anti-cancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519–534.
62. Scalbert A., Johnson I. T., Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 215S–217S.
63. Schieber A., Keller P., Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 910: 265–273.
64. Sekmokienė D., Liutkevičius A., Malakauskas M. 2007. Funkcionalusis maistas ir jo veikliosios dalys. *Veterinarija ir zootechnika*, 37(59): 72–78.
65. Sergeant T., Piront N., Meurice J., Toussaint O., Schneider Y. J. 2010. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact.* 188(3): 659–667.
66. Sesso H. D., Gaziano J. M., Liu S., Buring J. E. 2003. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77:1 400–1 408.
67. Skrede G., Wrolstad R. E. 2002. Flavonoids from Berries and Grapes. In: J. Shi, G. Mazza, L. M. Maguer (eds.), *Functional foods. Biochemical and Processing Aspects*. CRC Press, USA, 72–123.
68. Spencer J. P. E. 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, 104: S40–S47.
69. Steinberg D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 20 963–20 966.
70. Sun J., Chu Y., Wu X., Liu R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 7449–7454.

71. Tsao R., Yang R., Young J. C., Zhu H. 2003. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6 347–6 353.
72. Vita J. A. 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 292S–297S.
73. Weichselbaum E., Wyness L., Stanner S. 2010. Apple polyphenols and cardiovascular disease a review of the evidence. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 35: 92–101.
74. Wu J., Gao H., Zhao L., Liao X., Chen F., Wang Z., Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.*, 103: 88–93.
75. Zhu Q. Y., Huang Y., Tsang D., Chen Z. Y. 1999. Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *J. Agric. Food Chem.*, 47(5): 2 020–2 025.

SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. SCIENTIFIC ARTICLES. 2012. 31(1–2).

Polyphenolic compounds in apples – chemical composition, structure, biological activity (Review)

M. Liaudanskas, P. Viškelis, V. Janulis

Summary

Apples are one of the most frequently consumed fruits in Lithuania and worldwide. They are a significant source of polyphenolic compounds. The major polyphenolic compounds in apples are flavonols, flavan-3-ols, dihydrochalcones and phenolic acids. Polyphenolic compounds are secondary plant metabolites. They act as modulators of biochemical processes, protect plants against harsh environmental effects. Polyphenolic compounds have various biological activities. One of the most important effects of these compounds is strong antioxidative activity. Polyphenolic compounds are natural antioxidants which bind free radicals, inhibit their formation processes, stimulate production of antioxidative enzymes, therefore prevent oxidative stress that damages structural organism molecules. Antioxidative activity is closely related to other biological effects of polyphenolic compounds: antimicrobial, anti-inflammatory, anticarcinogenic and cardiovascular protective activity. The consumption of apples strengthens organism, helps avoid various diseases. As a food rich in polyphenolic compounds, apples should be more included in human diet, they are a promising source of raw material for food supplements.

Key words: antioxidative activity, apple, polyphenolic compounds.

Rootstock Affects Apple Fruit Biochemical Content: Preliminary Results

D. Kviklys¹, P. Viškelis¹, M. Rubinskienė¹, N. Kviklienė¹, M. Liaudanskas², J. Lanauskas¹ and V. Janulis²

¹ Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno 30, Babtai, Kaunas distr., Lithuania

² Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Keywords: *Malus × domestica*, phenolic content, antiradical activity, ascorbic acid

Abstract

Effects of apple rootstock on fruit inner quality parameters were tested at the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2010-2011. Twelve apple rootstocks M.26, M.9, P 22, P 59, P 61, P 62, P 66, P 67, B.9, B.396 (original name 62-396), PB.4 (Belarus selection) and Pure 1 (Latvian selection) were tested with cv. 'Auksis'. Rootstock effect on apple fruit titratable acidity, ascorbic acid, soluble solids and dry matter content was not consistent. Some of the tested rootstocks demonstrated steady impact on fruit biochemical characteristics; like the P series rootstocks on fruit titratable acidity and M.26 rootstock on low content of soluble solids. There were significant differences among rootstocks in fruit total phenolic content and antiradical activity.

INTRODUCTION

Apple rootstocks affect vegetative and reproductive development of a grafted tree. Direct effect of the rootstock on fruit quality parameters is less obvious, since they could be affected as well by crop load, planting distances, tree training, management system and others factors. Nevertheless, numerous trials report significant rootstock impact on fruit colour, size, maturity characteristics and inner fruit quality parameters.

Content of bioactive compounds and their synthesis depends on different factors such as cultivar, growing conditions, and fruit storage. Apple cultivars and rootstocks in Lithuanian orchards are different from those cultivated in Western Europe due to geographic location. The Nordic climate promotes more intensive fruit colouring and specific dynamic of quality parameters changes (Kviklys et al., 2012), what could have an effect on synthesis and amount of phenolic compounds.

Previous research stressed attention to differences among apple cultivars in total phenolic content, their specific composition and antiradical activity (Lachman et al., 2006; Henríquez et al., 2010). Some fruit biochemical studies were done comparing the effect of orchard management systems (Veberic et al., 2005; Yuri, 2012). Rootstock influence on fruit biochemical properties has not been widely tested. Only a trial performed in Estonia showed an advantage of vegetative rootstock versus *Malus Antonovka* seedlings concerning total phenolic content (Mainla et al., 2011).

The aim of this study was to determine effect of apple rootstock on fruit biochemical content.

MATERIALS AND METHODS

The trial was conducted in a productive orchard (planted Spring 2005) at the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Kaunas distr. in 2011-2012. Apple rootstock (M.26, M.9, P 22, P 59, P 61, P 62, P 66, P 67, B.9, B.396, PB.4 (Belarus selection) and Pure 1 (Latvian selection) effect on fruit biochemical content was tested with cv. 'Auksis' (Lithuanian selection). Trees were planted at 4 x 1.5 m and trained as a slender spindle. Pest and disease management was carried out according to the rules of integrated plant protection. The rootstock trial was arranged in a randomized block design, with four replicates and 3 trees per plot. Twenty-five randomly selected fruits from each replication were taken for biochemical analysis.

Total phenolic content, expressed as gallic acid was determined by the Folin-Ciocalteu method, soluble solids content (SSC) by refractometer, titratable acidity expressed as citric acid by titration with 0.1 N NaOH solution, and ascorbic acid (vitamin C) content by titration with 2,6-dichlorophenolindophenol sodium salt solution.

The extracts for the radical-scavenging activity (ARA) assay were obtained by extracting 5 g of homogenized apples with 25 ml of methanol at ambient temperature for 1 h with constant shaking. The solution was filtered, and the residue was repeatedly extracted with 25 ml of methanol for 1 h. Finally, the extracts were combined and diluted to 50 ml with methanol. The antiradical activity of the extracts against stable DPPH[•] was determined by a slightly modified spectrophotometric method of Brand-Williams et al. (1995). DPPH[•] methanolic solution (2 mL, 6×10^{-5} M) was mixed with 20 μ L of prepared extract and the reaction was carried out at ambient temperature. The decreasing absorbance at 515 nm was measured on a Genesys-10 UV/Vis spectrophotometer (GBC Scientific Equipment, Australia) during 30 min to attain reaction equilibrium. Simultaneously, the absorption of a blank sample containing the same amount of methanol and DPPH[•] solution was measured. The measurements were performed in triplicate. Antiradical activity of the samples was expressed as Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) equivalent antioxidant capacity TEAC. For this purpose the calibration curve of Trolox (concentration range 0-2,500 μ mol/L) was made in DPPH assay ($r^2 = 0.998$). TEAC corresponds to Trolox quantity (μ mol), which at the equal conditions has the same antiradical activity as 1 g of fresh apples.

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA). Significance of differences between treatment (rootstock) means was evaluated using Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The tested rootstocks with the exception of M.26 belong to dwarf and superdwarf groups. Their induced tree vigour was tested in the trial performed in the young orchard (Univer et al., 2010), and they can be grouped in following way: similar vigour as M.9 - B.396, B.9, P 62, P 67, P 66 and Pure 1, and more dwarfing than M.9 - P 22, P 59, P 61 and PB.4. Most of P series rootstocks were released recently, and only first testing results are available (Bielicki et al., 2007; Zurawicz et al., 2011).

Tested rootstocks were bred in different breeding centres in Poland, UK, Russia, Latvia, and Belarus and are from different genetic backgrounds, therefore greater differences in fruit biochemical content are expected.

Titratable acidity varied between years and rootstock (Table 1). Fruits from trees on M.26 rootstock had the highest acidity in 2011, whereas the highest acidity in 2012 was in fruits from trees on B.396 and B.9. Higher variability of titratable acidity was recorded in fruits from trees on M.9, M.26, B.9 and B.396. More stable results were with P series and PB.4 rootstocks. On average, lower acidity was detected in fruits on PB.4 and M.9, and higher acidity on B.396, B.9, M.26 and P 61.

Fruits accumulated more ascorbic acid in 2011. At the same time larger differences were recorded between rootstocks. On average, P 62 rootstock produced fruit with the lowest fruit ascorbic acid, though there were no significant differences with B.396 and P 61.

Significant rootstock effect on SSC was recorded every year despite induced differences by year due to vegetation conditions (Table 2). The lowest SSC was in fruits from trees on M.26, and the significantly highest SSC were in fruits from trees on PB.4, though the differences between rootstocks were not so evident in 2011. On average, lower fruit SSC were recorded with M.26, M.9 and P 62 rootstocks. Our previous rootstock trial confirmed the negative influence of M.26 rootstock on SSC, whereas fruits from trees on M.9 rootstock accumulated more SSC (Kviklys et al., 2012).

Similar tendencies were recorded for fruit dry matter content (DM), though on average differences between rootstocks were less pronounced. The reason could be a higher variation between rootstocks in different years. DM content was more stable in

fruits on the most dwarfing rootstocks P 59 and PB.4. Lower DM content was recorded from fruit of trees on M.26, M.9 and P 66.

There have been reported significant differences among apple cultivars in total phenolic content and antiradical activity (Lachman et al., 2006; Leccese et al., 2009). Our preliminary results showed rootstock-induced differences in fruits of the same cultivar. Differences among rootstocks in leaf phenolic content were demonstrated in rootstock studies performed in USA (Garcia et al., 2004).

Fruit total phenolic content in our trial varied from 72.4 up to 114.9 mg/100 g, which corresponded to usual levels found in apples (Veberic et al., 2005) and was significantly affected by rootstock (Table 3). The highest phenolic content was found in fruits from trees on B.396, and very high in P series rootstocks with the exception of P 62. M.26 and M.9 trees had low fruit total phenolic content in their fruit.

Antiradical activity was closely related with total phenolic content. The lowest ARA levels were found in apples on M.26 and P 62 rootstocks, compared to almost double ARA levels in fruits on P 22, Pure 1 and B.396 rootstocks.

CONCLUSIONS

Rootstock effect on apple fruit titratable acidity, ascorbic acid, soluble solids and dry matter content in most cases was variable and not consistent in different years. More long-term trials are necessary in order to receive reliable results. On the other hand, some of the tested rootstocks demonstrated a steady impact on fruit biochemical characteristics; like the P series rootstocks on fruit titratable acidity and M.26 rootstock on low content of soluble solids.

Significant differences among rootstocks in fruit total phenolic content and antiradical activity were found in this study. First year results were promising, and investigations of rootstock effect on fruit biochemical parameters will be continued.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Research Council of Lithuania, No. SVE-02/2011.

Literature Cited

- Bielicki, P., Czynczyk, A. and Chlebowska, D. 2007. Effect of new polish clonal rootstocks on growth, yield and fruit quality of two apple cultivars. *Acta Hort.* 732:191-196.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28:25-30.
- García, E., Rom, C.R. and Murphy, J.B. 2004. Comparison of phenolic content of 'Liberty' apple (*Malus × domestica*) on various rootstocks. *Acta Hort.* 658:57-60.
- Henríquez, C., Almonacid, S., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Cabezas, L., Simpson, R. and Speisky, H. 2010. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean J. of Agri. Res.* 70(4):523-536.
- Kviklys, D., Kviklienė, N., Bite, A., Lepsis, J., Univer, T., Univer, N., Uselis, N., Lanauskas, J. and Buskienė, L. 2012. Baltic fruit rootstock studies: evaluation of 12 apple rootstocks in North-East Europe. *Hort. Science (Prague)* 39(1):1-7.
- Lachman, J., Šulc, M., Sus, J. and Pavlíková, O. 2006. Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. *Hort. Sci. (Prague)* 33(3):95-102.
- Leccese, A., Bartolini, S. and Viti, R. 2009. Antioxidant properties of peel and flesh in 'GoldRush' and 'Fiorina' scab-resistant apple (*Malus domestica*) cultivars. *New Zealand J. Crop Hort. Science* 37(1):71-78.
- Mainla, L., Moor, U., Karp, K. and Püssa, T. 2011. The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia. *Zemdirbystė-Agriculture* 98(1):63-70.

- Univer, T., Kviklys, D., Lepsis, J. and Univer, N. 2010. Early performance of 'Auksis' apple trees on dwarfing rootstocks in Baltic region. *Agron. Res.* 8:743-748.
- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, G. and Stampar, F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *J. Sci. Food Agric.* 85:1687-1694.
- Yuri, J.A., Maldonado, F.J., Razmilic, I., Neira, A., Quilodran, A. and Palomo, I. 2012. Concentrations of total phenols and antioxidant activity in apple do not differ between conventional and organic orchard management. *J. Food Agri. Envir.* 10(2):207-216.
- Zurawicz, E., Bielicki, P., Czynczyk, A., Bartosiewicz, B., Buczek, M. and Lewandowski, M. 2011. Breeding of apple rootstocks in Poland – the latest results. *Acta Hort.* 903:143-150.

Tables

Table 1. Rootstock effect on fruit ascorbic acid content and titratable acidity.

Rootstock	Titratable acidity (%)			Ascorbic acid (mg/100 g)		
	2011	2012	Mean ^a	2011	2012	Mean
M.9	0.29±0.04	0.40±0.03	0.35 d	9.2±0.09	8.4±0.10	8.80 ab
M.26	0.52±0.03	0.38±0.05	0.45 ab	9.6±0.15	8.0±0.11	8.80 ab
P 22	0.35±0.05	0.40±0.03	0.38 cd	8.4±0.13	8.4±0.09	8.40 bc
P 59	0.44±0.04	0.36±0.03	0.40 bc	9.0±0.11	8.4±0.10	8.70 ab
P 61	0.49±0.03	0.40±0.04	0.45 ab	8.4±0.16	8.4±0.13	8.40 bc
P 62	0.42±0.04	0.36±0.03	0.39 bc	8.0±0.14	8.4±0.09	8.20 c
P 66	0.44±0.05	0.38±0.04	0.41 bc	8.9±0.11	8.8±0.09	8.85 ab
P 67	0.43±0.05	0.41±0.04	0.42 bc	9.6±0.12	8.0±0.17	8.80 ab
B.9	0.38±0.05	0.51±0.04	0.45 ab	10.0±0.15	8.0±0.19	9.00 ab
PB.4	0.34±0.02	0.34±0.03	0.34 d	9.1±0.16	8.4±0.11	8.75 ab
B.396	0.37±0.03	0.57±0.05	0.47 a	8.8±0.13	8.0±0.17	8.40 bc
Pure l	0.44±0.04	0.35±0.04	0.40 bc	10.0±0.10	8.4±0.15	9.20 a

^a Means followed by the same letter in each column are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 2. Rootstock effect on fruit soluble solids and dry matter content.

Rootstock	Soluble solid content (%)			Dry matter content (%)		
	2011 ^z	2012	Mean	2011	2012	Mean
M.9	13.6 b	11.3 de	12.5 de	14.9 b	11.9 f	13.4 cd
M.26	12.7 c	11.2 e	12.0 e	14.0 d	12.2 f	13.1 d
P 22	14.4 a	11.8 cd	13.1 bc	15.2 ab	12.6 de	13.9 b
P 59	14.5 a	12.4 bc	13.5 ab	14.1 d	13.8 a	14.0 ab
P 61	14.3 a	11.8 cd	13.1 bc	15.4 a	12.8 d	14.1 a
P 62	13.1 bc	11.7 cd	12.4 de	14.8 b	13.0 cd	13.9 b
P 66	13.8 ab	11.9 cd	12.9 bc	14.0 d	12.3 ef	13.2 d
P 67	14.1 a	11.3 de	12.7 cd	14.9 b	12.1 f	13.5 cd
B.9	13.8 ab	11.8 cd	12.8 cd	15.3 a	13.3 bc	14.3 a
PB.4	14.4 a	13.2 a	13.8 a	14.3 cd	14.0 a	14.2 a
B.396	13.1 bc	12.3 bc	12.7 cd	15.1 ab	13.6 ab	14.3 a
Pure 1	13.8 ab	12.0 c	12.9 bc	14.7 bc	12.8 d	13.7 bc

^z Means followed by the same letter in each column are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Rootstock effect on fruit total phenolic content and antiradical activity in 2012.

Rootstock	Total phenolic content ^z (mg/100 g)	Antiradical activity (μ mol TE/g)
M.9	79.9 f	2.39 cd
M.26	77.7 f	1.99 d
P 22	108.6 b	3.84 a
P 59	107.7 b	3.39 ab
P 61	102.2 cd	3.24 ab
P 62	72.4 g	1.99 d
P 66	98.6 de	3.24 ab
P 67	106.7 b	3.44 a
B.9	102.4 c	3.19 b
PB.4	91.4 f	2.84 bc
B.396	114.9 a	3.64 a
Pure 1	97.0 e	3.69 a

^z Means followed by the same letter in each column are not significantly different at $P \leq 0.05$ by Duncan's multiple range test.

PRAKTINĖ REKOMENDACIJA (projektas pateiktas LAMMC rengiamam rekomendacijų leidiniui)

Fenoliniai junginiai obulių vaisiuose ir lapuose

Maisto produktai be pagrindinės funkcijos – aprūpinti organizmą reikiamomis maistinėmis ir energinėmis medžiagomis – gali stiprinti imuninę sistemą ir mažinti lėtinių susirgimų riziką. Vakarų šalių gyventojų mityboje obuoliai yra svarbus biologiškai aktyvių junginių šaltinis. Juose gausu fenolinių junginių, organinių rūgščių, vitaminų, makro- ir mikroelementų, skaidulinių medžiagų. Vieni svarbiausių obuolių biologiškai aktyvių junginių, lemiančių jų naudą žmogaus organizmui, yra fenoliniai junginiai, kurie priskiriami natūraliems antioksidantams.

Siekiant ištirti obuolių fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairumą, išvystyta ir validuota efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodika. Ji pritaikyta 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel', 'Rajka' veislių obuolių, jų luobelų, minkštimų ir 'Aldas', 'Auksis', 'Ligol', 'Lodel' veislių obulių lapų fenolinių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties tyrimams. Duomenys pateikti kaip trijų pakartojimų vidurkis±standartinis nuokrypis mg/g absoliučiai sausos žaliavos.

Suminis tirtų veislių obuolių ėminiuose nustatytų fenolinių junginių kiekis svyravo nuo $2,21 \pm 0,08$ mg/g (veislė 'Connel Red') iki $5,82 \pm 0,15$ mg/g (veislė 'Aldas'). Obuolių ėminių ekstraktuose identifikuoti ir kiekiškai įvertinti šie skirtingų grupių fenoliniai junginiai: procianidinas B1, (+)-katechinas, chlorogeno rūgštis, procianidinas B2, (–)-epikatechinas, rutinas, hiperozidas, izokvercitrinas, avikuliarinas, kvercitrinas ir floridzinas. Chlorogeno rūgštis buvo vyraujantis komponentas 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' veislių obuolių ėminiuose. 'Rajka' veislės obuolių ėminiuose dominavo procianidinas B2.

Suminis fenolinių junginių kiekis obuolių luobelų ėminiuose įvairavo nuo $2,78 \pm 0,09$ mg/g (veislė 'Ligol') iki $6,06 \pm 0,20$ mg/g (veislė 'Aldas'). Obuolių minkštimų ėminiuose suminis identifikuotų ir kiekiškai įvertintų fenolinių junginių kiekis varijavo nuo $2,30 \pm 0,07$ mg/g (veislė 'Rajka') iki $4,55 \pm 0,17$ mg/g (veislė 'Aldas'). Nustatyti skirtumai tarp obuolių luobelų ir minkštimų fenolinių junginių kiekinės sudėties. Suminis identifikuotų kvercetino glikozidų kiekis obuolių luobelų ėminiuose buvo 11,50–17,30 kartų didesnis už šių junginių kiekį, nustatytą obuolių minkštimuose. Didžiausias kvercetino glikozidų kiekis ($1,73 \pm 0,04$ mg/g) nustatytas 'Aldas' veislės obuolių luobelų ėminiuose. Didžiausias katechinų ($1,09 \pm 0,02$ mg/g) ir procianidinų ($1,42 \pm 0,03$ mg/g) kiekis nustatytas 'Lodel' veislės obuolių minkštimų ėminiuose.

Obelių lapų ėminiuose suminis identifikuotų fenolinių junginių kiekis įvairavo nuo $135,02 \pm 6,03$ mg/g (veislė 'Auksis') iki $137,93 \pm 5,26$ mg/g (veislė 'Aldas'). Obuolių ir obelių lapų ėminių kokybinė ir kiekinė sudėtis skyrėsi. Obelių lapų ėminiuose nustatyta kavos rūgštis ir floretinas. Šie junginiai obuolių ėminiuose neidentifikuoti. Skirtingai nei obuolių ėminiuose, obelių lapuose vyraavo floridzinas, kuris sudarė 76,9–84,2 proc. visų obelių lapų ėminiuose identifikuotų junginių kiekio. Obelių lapų ėminiuose nustatyti kvercetino glikozidų kiekiai buvo didesni už nustatytus obuolių ėminiuose, o chlorogeno rūgšties – mažesni.

Įvertinus obuolių fenolinių junginių įvairavimą augalo vegetacijos periodo metu, nustatyta, kad didžiausi visų identifikuotų fenolinių junginių kiekiai obuolių ėminiuose sukaupiami vaisių vystymosi fenologinio tarpsnio pradžioje. Obelių lapų ėminiuose didžiausi chlorogeno ir kavos rūgščių, (+)-katechino, hiperozido, izokvercitrino ir rutino kiekiai nustatyti augalo vegetacijos periodo pabaigoje, floridzino, avikuliarino, kvercitrino – lapų vystymosi fenologinio tarpsnio metu, floretino ir (–)-epikatechino – lapų brandos metu.

Nustatyta, kad obels poskiepis turi įtakos obuolių fenolinių junginių kiekinės sudėties įvairavimui. Didžiausi individualių fenolinių junginių kiekiai nustatyti nykštukinių P 61 ir P 22 poskiepių obuolių ėminiuose, mažiausi – žemaūgių M.9 ir P 62 bei pusiaūžemaūgio M.26 poskiepio obuolių ėminiuose.

Ištyrus obuolių ėminių ekstraktų antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniais metodais, nustatyta, kad chlorogeno rūgštis, procianidinas B2 ir (–)-epikatechinas gali būti pasirenkami kaip analitiniai žymenys obuolių ir jų produktų antioksidacinio aktyvumo vertinimui. Obelių lapų ėminių ekstraktuose tarp identifikuotų fenolinių junginių stipriausią antioksidacinį aktyvumą lėmė kvercitrinas ir hiperozidas. Palyginus skirtingų veislių obuolių ir obelių lapų ėminių antioksidacinį aktyvumą, nustatyta, kad stipriausiomis antiradikalinėmis ir redukcinėmis savybėmis pasižymėjo 'Aldas' veislės obuolių ir obelių lapų ekstraktai. Šios veislės obuolių ir obelių lapų ėminiuose sukaupiami didžiausi fenolinių junginių kiekiai, todėl 'Aldas' veislės obelys yra perspektyvios auginimui Lietuvos soduose.

SUMMARY

INTRODUCTION

In recent years, the attention of the biomedicine researchers has been devoted to the investigations of chemical variety of herbal raw materials. The results of the scientific studies are very important in establishing new research on raw plant materials in creating medicinal preparations and food supplements. The research of chemical variety is important in determining biologically active compounds in food products as well. The results obtained during the research create the opportunity to use food products with known chemical composition for the health purposes.

Biologically active compounds in raw plant materials and their preparations determine the multifunctional biological effect. All over the world, especially great attention is paid to the research on chemical composition of food products. Apart the main function to provide the organism for necessary nutritious and energy supplying substances, food products can act preventively, strengthen immune system and reduce the risk of chronic diseases [63, 118]. Apples are an important source of biologically active compounds in human nutrition. They are rich in phenolic compounds, organic acids, vitamins, macro- and microelements, fiber [139].

Ones of the most important biologically active compounds of apples, determining positive effects on human organism are phenolic compounds which are attributed to natural antioxidants. The research of qualitative and quantitative composition of raw plant materials accumulating phenolic compounds is significant and relevant.

A domestic apple (*Malus domestica* Borkh.) is one of the most widespread fruit-trees. According to the statistic data of 2013, 80.82 million tons of apples are grown in the world. About 62.4 thousand tons are grown in Lithuania [37]. Apples are widely used in food industry in producing various products and beverages.

Scientific literature states that apple leaves can be used to enrich apple juice with quercetin glycosides and phloridzin [62]. Phloridzin is a dihydrochalcone derivative possessing anti-diabetic activity [50, 93]. Variation in qualitative and quantitative composition of apple leave flavonoids substantiates the possibility to use the leaves of Lithuanian grown apple cultivars for extracting the bioactive compounds and manufacturing of food supplements.

It is purposeful to carry out research on phytochemical composition of fruits and leaves of *Malus domestica* Borkh. to determine the consistent patterns of accumulations of biologically active compounds, under Li-

thuania's climatic conditions to identify apple cultivars with highest amounts of phenolic compounds – natural antioxidants.

The Aim of the Study – to investigate the variation of qualitative and quantitative composition of flavonoids and phenolic acids in apple fruits and leaves and determine the antioxidant activity *in vitro*.

Objectives of the Study:

1. To develop and optimize the HPLC method for analysis of qualitative and quantitative composition of flavonoids and phenolic acids in the samples of apple leaves and fruits.
2. To determine the variation of qualitative and quantitative composition of flavonoids and phenolic acids in fruits and leaf samples of Lithuanian grown cultivars.
3. To determine the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in the samples of apple peel and flesh.
4. To determine the variation patterns of qualitative and quantitative composition of flavonoids and phenolic acids in apple leaf and fruits samples during vegetation period.
5. To determine the impact of rootstock on qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in apple fruit samples.
6. To determine the antioxidant activity of flavonoids and phenolic acids in Lithuanian grown cultivars of apple fruits and leaves *in vitro*.

Scientific Novelty. The research of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds of apples and leaves of 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel' and 'Rajka' apple-trees grown in Lithuania was performed. For the first time, the qualitative and quantitative composition of fruits and leaves phenolic compounds of the Lithuanian breaded cultivars of 'Aldas' and 'Auksis', was determined.

It was determined that the 'Aldas' apples distinguished with the highest amounts of phenolic compounds. The highest total amount of phenolic compounds was determined in the samples of fruits and leaves of this cultivar.

The determination of alliteration dynamics of quantitative composition of flavonoids and phenolic acids in the samples of fruits and leaves of apples presented novel knowledge about the regularities of biosynthesis and accumulative processes of phenolic compounds in fruits and leaves of apples grown in Lithuania during the vegetation period. It also allowed to

evaluate the influence of phenological stages to the variation of quantitative composition of apple fruits and leaves.

For the first time, the research of the influence of the rootstocks of superdwarf, dwarf and semi-dwarf apple-trees to the qualitative and quantitative composition of the phenolic compounds was carried out. It was determined that the highest amounts of phenolic compounds were accumulated in the apple samples of superdwarf rootstocks P 61 and P 22.

For the first time, the research of antioxidant activity of apples was done applying HPLC-ABTS and HPLC-FRAP post-column assays. It was determined that among identified compounds chlorogenic acid, procyanidin B2 and (–)-epicatechin possessed the strongest antioxidant activity in the apple fruit extracts.

Practical and Theoretical Significance. The HPLC method was developed, optimized and validated for the qualitative and quantitative determination of flavonoids and phenolic acids in the samples of apple fruits and leaves of Lithuanian grown cultivars.

The results obtained during the research enriched the scientific knowledge about the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds of fruits and leaves of apple cultivars grown in Lithuania. Such a research in the Lithuanian Republic was done for the first time. The highest amounts of the identified phenolic compounds was accumulated in the samples of 'Aldas' apples, therefore this cultivar is perspective for growing in Lithuania's orchards. In 2015 the recommendations "Phenolic Compounds in Fruits and Leaves of Apples" were prepared and approved at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

After the research on the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and its variation was performed, it was determined that higher amounts of flavonoids (rutin, isoquercitrin, hyperoside, avicularin, quercitrin, phloridzin) were detected in the samples of leaves than in the samples of fruits. The leaves contain high amounts of quercetin glycosides and phloridzin, therefore this raw plant material can be valuable in enriching food products and food supplements with biologically active compounds.

We carried out the investigations of the influence of the apple-tree rootstocks to the quantitative composition variation of phenolic compounds in apples. During the investigations it was determined that superdwarf rootstocks P 61 and P 22 provides the highest accumulation of the amounts of phenolic compounds in the apple samples. The engrafted apple-trees by these rootstocks could more often be grown in the orchards of Lithuania.

After investigating radical scavenging and reducing activity of apples by post-column assay, phenolic compounds with distinguished antioxidant

activity *in vitro* were determined. Chlorogenic acid, procyanidin B2 and (–)-epicatechin were determined as analytical markers of apples, and their products for evaluation of antioxidant activity. The results obtained during the investigations are valuable in prognosticating the antioxidant activity of apple extracts and identified phenolic compounds *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. The following apple cultivars were included in the study. The samples of 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol', 'Lodel', 'Rajka' apples and leaves were prepared in Lithuania, in Babtai, in Institute of Horticulture of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

Sample Preparation

Preparation of Apple Samples. Apples were cut to equally sized lobes which were frozen in the freezer under the temperature of -35 degrees C and lyophilized in "Zirbus" ("Zirbus technology GmbH", Germany). Lyophilized apple lobes were milled with an electrical mill "Retsch 200" ("Retsch GmbH", Germany).

Preparation of Samples of Apple Peel and Flesh. Apple peels were separated from apple flesh using the apple peeling mechanism "Kronen AS2" ("Kronen GmbH", Germany). Cut to pieces samples of apple peels and flesh are prepared by analogy with apple samples.

Preparation of Samples of Leaves of Apple Trees. Freshly collected leaves were dried in lyophilizer "Zirbus" ("Zirbus technology GmbH", Germany) under the same conditions as apple samples.

Apple Extraction. An amount of 2.5 g of lyophilized apple powder (exact weight) was weighed, added to 30 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a "Sonorex Digital 10 P" ultrasonic bath ("Bandelin Electronic GmbH", Germany) for 20 at 40 degrees C. The extract obtained was filtered through a paper filter; the apple lyophilizate on the filter was washed twice with 10 mL of ethanol (70%, v/v) in a 50 mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 µm ("Carl Roth GmbH", Germany).

Apple Leaf Extraction. An amount of 0.25 g of lyophilized apple leaf powder (exact weight) was weighed, added to 10 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a "Sonorex Digital 10 P" ultrasonic bath ("Bandelin Electronic GmbH", Germany) for 40 minutes at 60 degrees C. The extract obtained was centrifuged for 7 minutes with a "Hermle Z206A" centrifuge ("Denville Scientific Inc.", USA). Centrifugation speed – 6000 revolutions

per minute. The extract was collected and filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm ("Carl Roth GmbH", Germany).

High Performance Liquid Chromatography Method. A "Waters 2695" chromatograph equipped with a "Waters 2998" photodiode array detector ("Waters", USA) was used for HPLC analysis. Chromatographic separations were carried out by using a "YMC-Pack ODS-A" (5 μm , C_{18} , 250 $\times$ 4.6 mm i.d.) column equipped with a "YMC-Triart" (5 μm , C_{18} , 10 $\times$ 3.0 mm i.d.) pre-column ("YMC Europe GmbH", Germany). The column was operated at a constant temperature of 25 degrees C. The volume of the injection was 10 μL . The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 minutes, 3–15% B; 30–45 minutes, 15–25% B; 45–50 minutes, 25–50% B; and 50–55 minutes, 50–95% B. The identification of the chromatographic peaks was achieved by the retention times and spectral characteristics (λ =200–400 nm) of the eluting peaks with those of the reference compounds. Dihydrochalcones and flavan-3-ols were quantified at 280 nm, phenolic acids at 320 nm and flavonols at 360 nm.

Antioxidant Activity Determination Using HPLC-ABTS and HPLC-FRAP Post-column Assays. The chromatographic separation of extracts was carried out by "Waters 2695 Alliance" system ("Waters", USA) with photodiode array detector "Waters 2998", applying previously described method. The antiradical and reductive activity in extracts was evaluated using HPLC-ABTS and HPLC-FRAP methods as described by Raudonis et al [109]. After detection eluate was directly mixed with radical cation $\text{ABTS}^{\cdot+}$ or FRAP reagent which was supplied to post-column by chromatograph "Beckman programmable solvent module 126" ("Beckman", USA) at constant 0,5 ml/min. flow rate. The reaction between analyte and reagent was carried out at the reaction coil, made out of polyether ether ketone (length 15 m, inner diameter 0.3 mm) under the temperature of 25 degrees C. "Waters 2487" detector was used to register the increase of absorption after the reaction with FRAP (593 nm wave length) or decrease after the reaction with $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (650 nm wave length).

The Statistic Methods of Data Processing. All the experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations were calculated with "SPSS 20.0" ("SPSS Inc.", USA) and "Microsoft Office Excel 2003" ("Microsoft", USA) softwares. A single factor analysis of variance (ANOVA) along with the posthoc Tukey's test was employed for statistical analysis. The Kolmogorov – Smirnov test was applied to examine the

normality of the distribution. To verify the hypothesis about the equality of variances, Levene's test was employed. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The Study on Variation of Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds of the Apple Cultivars Grown in Lithuania

The total amount of phenolic compounds determined in the sample extracts of the apple cultivars varied from 2.209 mg/g ('Connel Red') to 5.817 mg/g ('Aldas'). The highest total amount of identified quercetin glycosides 0.731 ± 0.015 mg/g was determined in the 'Aldas' apple samples. It was 1.95-fold higher than the smallest total amount of quercetin glycosides (0.375 ± 0.008 mg/g) determined in the 'Auksis' apple samples. The quercetin glycosides in the apple samples formed 7.99–23.54% of the total amount of the determined phenolic compounds.

The highest amount of (–)-epicatechin (0.928 ± 0.019 mg/g) was determined in the 'Lodel' apple samples, the smallest – in the 'Connel Red' and 'Ligol' apple samples (respectively 0.315 ± 0.006 mg/g and 0.311 ± 0.004 mg/g). The highest amount of (+)-catechin (0.121 ± 0.003 mg/g) was determined in the 'Rajka' apple samples. The catechin group compounds in the apple samples formed 11.2–21.54% of the total identified amount of phenolic compounds.

The highest amount of procyanidin B2 (1.279 ± 0.023 mg/g) was determined in the 'Lodel' apple samples. It was 2.64 times higher than the amount of this compound (0.484 ± 0.007 mg/g) determined in the 'Connel Red' apple samples. The determined amounts of procyanidin B1 were smaller. They varied from 0.035 ± 0.001 mg/g ('Connel Red') to 0.157 ± 0.003 mg/g ('Aldas'). The determined procyanidin group compounds formed 17.38–31.03% of all identified phenolic compounds.

The highest amount of chlorogenic acid (3.074 ± 0.068 mg/g) was determined in the 'Aldas' apple samples. It was 4.99-fold higher than the lowest amount of this acid (0.616 ± 0.011 mg/g) determined in the 'Rajka' apple samples. The percentage part of chlorogenic acid in the apple samples varied from 20.52% ('Rajka') to 53.37% ('Auksis') of all identified as well as quantitatively evaluated amount of phenolic compounds.

After carrying out the analysis of sample extracts of lyophilized apples, it was determined that the amount of phenolic compounds in the samples of different cultivars of apples vary. The predominant component in the apple samples of 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol' and 'Lodel' was chloro-

genic acid. Procyanidin B2 was the predominant component in the 'Rajka' apple samples. Among identified quercetin glycosides, quercitrin predominated in the 'Rajka' apple samples and hyperoside predominated in the samples of other cultivars.

The Variation in Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds of Apple Peels and Flesh

The total amount of phenolic compounds in the samples of apple peels varied from 2.778 mg/g ('Ligol') to 6.055 mg/g ('Aldas'). The total amount of quercetin glycosides in the samples of apple peels varied from 0.667 mg/g ('Auksis') to 1.775 mg/g ('Aldas'). That formed 14.38–42.71% of the amount of the phenolic compounds determined by HPLC method. The highest amounts of (+)-catechin (0.109 ± 0.002 mg/g) and (–)-epicatechin (0.806 ± 0.018 mg/g) were determined in the 'Aldas' samples. The determined amount of procyanidin B1 varied from 0.030 ± 0.001 mg/g ('Ligol') to 0.222 ± 0.004 mg/g ('Aldas') and the amount of procyanidin B2 varied from 0.214 ± 0.004 mg/g ('Ligol') to 1.219 ± 0.027 mg/g ('Auksis'). The highest amount of phloridzin (0.403 ± 0.008 mg/g) was determined in the 'Rajka' apple peels and the amount of chlorogenic acid (2.025 ± 0.038 mg/g) was determined in the 'Aldas' apple peels. The percentage part of chlorogenic acid varied from 6.03% to 34.50% in the samples of all apple peels of identified phenolic compounds.

Quercetin glycosides formed only 1.40–4.24% of the amount of phenolic compounds of all quantitatively evaluated apple flesh. The total amount of determined quercetin glycosides in the apple flesh varied from 0.080 mg/g ('Lodel') to 0.122 mg/g ('Aldas'). The highest amount of (+)-catechin (0.150 ± 0.004 mg/g) was determined in the 'Auksis' apple flesh samples and the highest amount of (–)-epicatechin (1.012 ± 0.022 mg/g) was determined in the 'Lodel' apple flesh samples. The highest amount of procyanidin B1 (0.174 ± 0.004 mg/g) was determined in the samples of 'Auksis' apple flesh and the highest amount of procyanidin B2 (1.353 ± 0.027 mg/g) was determined in the samples of 'Lodel' apple flesh. The highest amount of phloridzin (0.389 ± 0.008 mg/g) was determined in the samples of 'Lodel' apple flesh. And the highest amount of chlorogenic acid (2.739 ± 0.056 mg/g) was determined in the samples of 'Aldas' apple flesh. The chlorogenic acid in the samples of apple flesh formed from 27.28% ('Rajka') to 60.26% ('Aldas') of all identified phenolic compounds.

The Composition of Phenolic Compounds of the Samples of Apple Leaves

The apple leaves of the cultivar 'Aldas' contained the highest total amount of the quercetin glycosides identified and quantified. It was 1.7-fold higher than their lowest amount found in the apple leaves of the cultivar 'Ligol'. Phloridzin was the major phenolic compound in the apple leaves. It accounted for 76.9% to 84.2% of all phenolic compounds identified and quantified in the extracts of apple leaves by the HPLC method. The apple leaves of the cultivar 'Ligol' contained the highest amount of phloridzin (114.433 ± 4.721 mg/g). Quercitrin was a predominant component among all the quercetin glycosides identified and quantified in the ethanol extracts of apple leaves. The apple leaves of the cultivar 'Aldas' had the highest amount of quercitrin (114.431 ± 4.723 mg/g). The chlorogenic acid in the leaves of apples wasn't a predominating compound. Its determined amounts formed only 0.3–1.0% of all identified phenolic compounds. The results have been comprehensively analyzed in the article "Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars".

The Variation in Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds in the Samples of Different Apple Rootstocks

Superdwarf rootstocks P 61 and P 22 determined the highest content of all phenolic compounds tested. Dwarf rootstocks M.9 and P 62 and semi-dwarf rootstock M.26 resulted in lower content of all phenolic compounds tested. No clear differences were found between superdwarf, dwarf and semi-dwarf rootstock groups. Rootstock impact on the accumulation of total phenols was different: less than 10% difference between 2011-2012 years was recorded for M.26 and P 22, but around 30% for M.9, Pure 1 and P 66 rootstocks. The most stable content of all compounds analyzed, except for procyanidin B1 and B2, was in fruits from trees on B.396 rootstock. On average of two years, the highest variation coefficient was established for (+)-catechin, procyanidin B1 and total procyanidins content. Medium variation coefficient was recorded for quercitrin, (–)-epicatechin, total catechins, phloridzin, chlorogenic acid and total phenolic compounds. The results have been comprehensively analyzed in the article "Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits".

The Variation in Quantitative Composition of Phenolic Compounds in the Apple Fruit Samples during the Vegetation Period

The highest amounts of all identified phenolic compounds in the apple samples were accumulated in the samples of picked apples at the beginning of phenological stage of fruit development (on the 168th day of a year), the smallest amounts – during fruit ripeness (on the 280th day of a year). Chlorogenic acid in the complex of identified phenolic compounds varied during the whole vegetation period. Its highest amount (8.844 ± 0.381 mg/g) was determined in the samples of picked apples at the beginning of fruit development. Among identified quercetin group compounds, at the beginning of apple development quercitrin predominated, and higher amount of hyperoside was determined after apples reached ripeness.

The Variation in Quantitative Composition of Phenolic Compounds in the Samples of Apple Leaves during the Vegetation Period

Phloridzin predominated in the samples of apple leaves which were picked during all phenological stages. The highest amount of this compound (178.973 ± 7.436 mg/g) was determined in the samples of leaves on the 140th day of a year at the beginning of phenological stage of leaf development.

Among identified quercetin glycosides, during vegetation period of apple leaves quercetin predominated. Its highest amount (9.529 ± 0.205 mg/g) was determined at the beginning of phenological stage of leaf development (on the 140th day of a year). The highest amount of hyperoside (4.378 ± 0.110 mg/g) was determined at the end of vegetation period (on the 308th day of a year), that of avicularin (4.616 ± 0.189 mg/g) was determined at the beginning of leaf development (on the 140th day of a year) in the leaf samples. The highest amounts of isoquercitrin (2.735 ± 0.215 mg/g) and rutin (0.801 ± 0.033 mg/g) were determined during phenological stage of leaf aging (on the 308th day of a year) when leaves are becoming yellow. The highest amounts of chlorogenic (5.457 ± 0.208 mg/g) and caffeic acids (0.180 ± 0.007 mg/g) were determined in the samples of picked apple leaves at the end of vegetation period.

The Antioxidant Activity Assessment of Apple Extracts by HPLC Post-column Reaction Assay

The apple extracts of the cultivar 'Aldas' distinguished by the strongest radical scavenging and reducing activity (respectively 21.44 μ mol/g and 19.98 μ mol/g). The weakest radical scavenging activity was determined of the cultivar 'Rajka' (10.66 μ mol/g). The apple extracts of the cultivar 'Ligol'

distinguished themselves in the weakest reducing activity (9.21 $\mu\text{mol/g}$). Among individual apple samples the identified phenolic compounds, chlorogenic acid, procyanidin B2 and (–)-epicatechin possessed the strongest radical scavenging and reducing activity. These compounds could be used as analytical markers of apple extracts and preparations made out of them in evaluating their antioxidant activity. Summarising the research data, it was determined that the highest total amount of phenolic compounds and antioxidant activity was determined in the extracts of 'Aldas' apples. The apple extracts of this cultivar could be valuable for enriching of food products by natural antioxidants, for developing and producing of food supplements, for picking and using of compounds distinguished by their antioxidant activity for medical needs.

CONCLUSIONS

1. The HPLC method was developed and optimized for the analysis of qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in the samples of apple fruits and leaves. The obtained values of validation parameters (selectivity, precision and linearity) confirmed the suitability of the method for the analysis. Method was applied for the qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds of apple fruits and leaves.
2. It was determined that cultivar defines the variation of quantitative composition of apple samples. The amounts of total phenolic compounds in lyophilized apple samples varied from 2.209 mg/g (cultivar 'Connel Red') to 5.817 mg/g (cultivar 'Aldas'). Total phenolic content in apple leaves varied from 135.021 mg/g (cultivar 'Auksis') to 137.938 mg/g (cultivar 'Aldas') for absolute dry weight. Chlorogenic acid was determined as predominant compound in samples of 'Aldas', 'Auksis', 'Connel Red', 'Ligol' and 'Lodel' cultivars and procyanidin B2 was determined as predominant compound in samples of 'Rajka' cultivar. Phloridzin was determined as predominant compound in apple leave samples and accounted for 76.9–84.2% of amount of total compounds.
3. It was determined that total amount of identified quercetin glycosides in apple peel was 11.50–17.30-fold higher than in apple flesh. The highest total amount of identified quercetin glycosides in apple peel samples of 'Aldas' cultivar (1.726 ± 0.037 mg/g). The highest amount of identified catechins (1.086 ± 0.021 mg/g) and oligomeric

procyanidins (1.422 ± 0.027 mg/g) were determined in flesh samples of 'Lodel' cultivars.

4. After the analysis of variation of phenolic compounds composition of leaves and fruits during vegetation period was performed, it was determined that highest amounts of phenolic compounds in apple samples were determined at the beginning of fruit ripening phenological stage. The highest amounts of chlorogenic acid, caffeic acid, catechin, hyperoside, isoquercitrin and rutin in apple leave samples were determined at the end of vegetation period. The highest amounts of phoridzin, avicularin, quercitrin in apple leaves were determined at leaf development stage; highest amount of phloretin and (–)-epicatechin were at full leaf maturation stage.
5. It was determined that the apple-tree rootstock influences the quantitative composition variety of phenolic compounds of apples. The highest amounts of individual phenolic compounds were determined in the samples of superdwarf apple-tree rootstocks P 61 and P 22, the lowest – in the apple samples of dwarf M.9 and P 62 and semi-dwarf M.26 apple-tree rootstocks.
6. After research on radical scavenging and reducing activity of apples, it was determined that chlorogenic acid, procyanidin B2 and (–)-epicatechin can be chosen as analytical markers of apples and their products for the evaluation of antioxidant activity.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė:

Mindaugas Liaudanskas

Adresas:

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto
Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto
Farmakognozijos katedra,
Eivenių g. 4, LT-50009, Kaunas
m.liaudanskas@yahoo.com

El. paštas:

Išsilavinimas

2006–2011 m.

Farmacijos magistras, Lietuvos sveikatos mokslų
universitetas

Kvalifikacija

Nuo 2011 m.

Vaistininko profesinė kvalifikacija

Darbo patirtis

Nuo 2014-09
iki šiol

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,
Farmakognozijos katedra, vyresnysis laborantas

Nuo 2011-09
iki 2014-09

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,
Farmakognozijos katedra, jaunesnysis mokslo
darbuotojas