



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ ÚČINKU PLODŮ ŠÍPKOVÉ RŮŽE (ROSA CANINA L.) NA OXIDAČNÍ STABILITU ČERSTVÝCH ŠŤÁV

DETERMINATION OF THE EFFECT OF DOG ROSE (ROSA CANINA L.) ON THE OXIDATIVE STABILITY IN FRESH JUICES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Šárka Borová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1682/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Šárka Borová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Stanovení účinku plodů šípkové růže (*Rosa canina* L.) na oxidační stabilitu čerstvých šťáv

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma (složení plodu šípkové růže, její účinky a využití v potravinářství a farmacii).
2. Příprava etanolových extraktů z plodů šípkové růže.
3. Charakterizace extraktů (obsah sacharidů, fenolických látek, pektinu, vitamínu C, antioxidační vlastnosti).
4. Ověření antioxidačního účinku extraktů na stabilizaci čerstvé ovocné šťávy.
5. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Šárka Borová
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce měla za cíl analyzovat obsah bioaktivních látek, antioxidační aktivitu v ethanolových extraktech z plodů růže šípkové (*Rosa Canina L.*) a v neposlední řadě ověřit antioxidační účinek těchto extraktů na stabilizaci čerstvé hruškové šťávy. Ethanolové extrakty byly připraveny z nasbíraných plodů růže šípkové. Jednotlivé ethanolové extrakty z šípků byly získány v různých poměrech plodu šípku k objemu 40% ethanolového roztoku po dobu od 7–28 dní.

Po stanovení celkového obsahu sacharidů, polyfenolů, flavonoidů a vitamínu C bylo zjištěno, bylo zjištěno, že principiálně obsah stanovovaných látek stoupá s poměrem plodu šípku k objemu ethanolového roztoku a s časem extrakce. Bylo také prokázáno, že ethanolové extrakty z šípků mají významnou antioxidační aktivitu. Vliv antioxidačního účinku vybraného ethanolového extraktu z plodů šípku byl ověřen jeho přidáním do čerstvé ovocné šťávy z hrušek, spektrofotometricky. Bylo prokázáno, že jeden z vybraných ethanolových extraktů inhiboval oxidaci čerstvé hruškové šťávy a má potenciál jako přírodní stabilizátor čerstvých ovocných šťáv.

KLÍČOVÁ SLOVA

Růže šípková, ethanolový extrakt, antioxidační vlastnosti, bioaktivní látky, plody růže šípkové

ABSTRACT

This bachelor thesis aimed to determine the content of bioactive substances and antioxidant activity in ethanolic extracts of rose hips fruits (*Rosa Canina L.*). This work verified the possibility of using the rosehip ethanolic extract as an antioxidant to inhibit the oxidation of fresh pear juice. The ethanolic extracts were prepared by extracting rose hips fruits in various ratios of fruits to the volume of 40% ethanol for 7-28 days.

After determining the total content of carbohydrates, polyphenols, flavonoids and vitamin C, it was found that, in principle, the range of the defined substances increases with the ratio of rosehip fruit to the volume of ethanol solution as well as with the extraction time. Ethanol rosehip extracts have also been shown to possess significant-high antioxidant activity. The stabilizing effect of rosehip fruit extract against the oxidation of fresh pear juice was determined spectrophotometrically. It was found that rosehip fruit extracts could inhibit the oxidation of fresh pear juice and have the potential as a natural stabilizer of fresh fruit juices.

KEY WORDS

Rose hip, ethanol extract, antioxidant properties, bioactive substance, fruits of rose hip

CITACE

BOROVÁ, Šárka. *Stanovení účinku plodů šípkové růže (Rosa canina L.) na oxidační stabilitu čerstvých šťáv* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/129936>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především vedoucí bakalářské práce paní doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D., za její ochotu a cenné rady při práci v laboratoři i psaní této práce. Poděkování patří také Ing. Pavlu Vostrejšovi, za pomoc při provádění analýz a konzultace. Velké díky patří i celé mé rodině za podporu při studiu. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Martinu Beňovi za trpělivost a pomoc při mém studiu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Františku Fojtíkovi za pomoc při sběru šípků a za cenné rady.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Růže šípková.....	9
2.1.1	Obecná charakteristika	9
2.2	Složení plodu růže šípkové.....	10
2.2.1	Fenoly a polyfenoly.....	10
2.2.2	Flavonoidy.....	10
2.2.3	Třísloviny	11
2.2.4	Organické kyseliny.....	11
2.2.5	Pektin.....	13
2.2.6	Vitamíny.....	13
2.2.7	Karotenoidy	16
2.2.8	Sacharidy	17
2.3	Využití a účinky růže šípkové	18
2.3.1	Čaj	18
2.3.2	Hospodářství.....	18
2.3.3	Potraviny	18
2.3.4	Farmacie a kosmetický průmysl.....	19
2.4	Čerstvé ovocné šťávy	19
2.4.1	Výroba čerstvých ovocných šťáv	20
3	EXPRETIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použité přístroje a pracovní pomůcky	21
3.2	Použité chemikálie.....	21
3.3	Použitý software	22
3.4	Příprava ethanolových extraktů	22
3.5	Stanovení sacharidů.....	23
3.5.1	Měření vzorků a kalibrační křivky	23
3.6	Stanovení celkových polyfenolů	24
3.6.1	Měření vzorků a kalibrační křivky	24
3.7	Stanovení flavonoidů.....	25
3.7.1	Měření vzorků a kalibrační křivky	25
3.8	Stanovení vitamínu C	26
3.8.1	Měření vzorků titrační metodou	26
3.9	Stanovení antioxidační aktivity	26
3.10	Stabilizace čerstvé hruškové šťávy extraktem z plodů šípků	27

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Stanovení sacharidů	28
4.2	Stanovení celkových polyfenolů	30
4.3	Stanovení flavonoidů	32
4.4	Stanovení vitamínu C	34
4.5	Stanovení antioxidační aktivity	35
4.6	Ověření antioxidačního účinku extraktu na stabilizaci čerstvé ovocné šťávy	36
5	ZÁVĚR.....	39
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	45
7	SEZNAM PŘÍLOH.....	46

1 ÚVOD

Růže šípková, lat. (*Rosa Canina L.*), je rostlina vyskytující se téměř po celém světě. Blahodárné účinky této rostliny i jejích plodů na zdraví jsou známy už několik století. Růže šípková je také odpradávná symbolem nejen zamilovanosti, ale také mládí a krásy. Využití této léčivé rostliny sahá do potravinářského, kosmetického i farmaceutického průmyslu. Díky vysokému obsahu bioaktivních látek, zejména vitamínů a antioxidantů, se stala růže šípková v posledních letech velmi populární. Je všeobecně známo, že její plody (šípky) obsahují vysoké množství vitamínu C, a to až mnohonásobně více než citrusové plody. Využívá se například pro výrobu čajů, džemů, sirupů, krémů, růžové vody, parfémů apod. Bylo provedeno několik studií, které dokazují, že plody růže šípkové, tedy šípků mají vliv na imunitu a mají protizánětlivé či antivirové účinky. V současnosti probíhají stále nové a nové studie, které se snaží zjistit nové informace o této léčebné rostlině a jejích plodech.

Tato bakalářská práce si klade za cíl stanovit množství celkových polyfenolů, flavonoidů a sacharidů v plodech růže šípkové, tedy šípkách. Dále je cílem prokázat, zda mají ethanolové extrakty z šípků antioxidantní schopnosti, které by bylo možné využít pro inhibici oxidace čerstvě odšťavněné hruškové šťávy. V současné době potravinářský průmysl využívá hrušky velmi často, a to jak na výrobu například dětských přesnídávek nebo na výrobu právě čerstvých šťáv či džusů. Do těchto produktů se také často používá příliš mnoho umělých aditiv a stabilizátorů. Tato práce se snaží kopírovat trend rozšiřování biopotravin a odstraňování umělých aditiv nahrazením přírodními látkami.

Bakalářská práce je rozdělena na několik částí. V teoretické části je popsána růže šípková a její bližší složení a využití. Dále je v experimentální části popsána příprava ethanolových extraktů z plodů růže šípkové a jsou zde také vypsány jednotlivé metody, které byly pro jednotlivé analýzy použity. Diskuze a závěr se poté zabývá samotnému vyhodnocování naměřených výsledků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Růže šípková

2.1.1 Obecná charakteristika

Růže šípková zvaná také jako psi růže, lat. (*Rosa Canina L.*), je rostlina z čeledi Rosaceae. Tato rostlina se vyskytuje téměř v celé Evropě, Malé Asii i v severní Africe. Až 25 % ze všech druhů růží roste v okolí Turecka. Je to nenáročná rostlina rostoucí zejména v křovinách, na stráních u lesa od nížin až po podhůří [1][2][3].

Jde o bohatě větvený trnitý keř. Tento keř dorůstá do výšky až 3 m. Z toho keře každý rok vyrůstají prutovité výhonky. Listy keře jsou lichožpeřené, složeny z pilovitých lístků vejčitého tvaru. Listy jsou trnité, stejně jako prutovité výhonky. Období, kdy keř kvete, je mezi červem a červencem. Květy jsou nejčastěji zbarveny světle růžově nebo bíle, jsou pravidelné, pětipočetné. Uvnitř květu se nachází hojný počet tyčinek a pestíků. Plodem je vlastně nepravý plod nazývaný šípek. Šípek je po dozrání lesklý, červený, vejcovitého tvaru s tvrdými hnědými nažkami [3][4].

Šípky začínají dozrávat na přelomu září a října, kdy nastává jejich sběr. Šípky, sesbírané ještě před prvním mrazem jsou nezměklé a tvrdé, proto dobře slouží například k přípravě čaje. Naopak šípky sesbírané po prvním mrazu, slouží lépe k přípravě šípkové dřeně, jelikož jsou změklé. Úprava a skladování šípků závisí na druhu spotřeby [5].



Obrázek 1: Zrající keř růže šípkové

2.2 Složení plodu růže šípkové

V posledních pár letech byla růže šípková čím dál více studována, jak z hlediska chemického, potravinářského, tak lékařského. Bylo zjištěno, že šípkový plod obsahuje několik biologicky aktivních látek s významnou antioxidační aktivitou. Mezi tyto biologicky aktivní látky patří fenoly, flavonoidy, třísloviny, organické kyseliny, pektin, sacharidy, karotenoidy i aminokyseliny. V neposlední řadě jsou významnou součástí složení plodu vitamíny, a to hlavně vitamíny B, E a C. Plod růže šípkové je též často zmiňován jako ovoce s nejvyšším podílem kyseliny askorbové, tedy vitamínu C [6][7][8].

2.2.1 Fenoly a polyfenoly

Fenoly jsou látky, které mají přímo na aromatickém jádře (benzenovém kruhu) navázanou hydroxylovou skupinu. Neřadí se přímo mezi alkoholy, přesto umožňují stejně jako alkoholy tvořit oxoniové soli, estery a fenoláty. Fenoly jsou oproti alkoholům mnohem kyselejší. Tyto fenolické látky lze jak uměle vytvářet, tak je lze najít přirozeně se vyskytující v přírodě. Přirozeně se fenoly a polyfenoly vyskytují v ovoci a zelenině, zejména v bobulích, citrusech, brokolici nebo rostlinách, kde jsou ukryty v chlorofylu. Na podzim se jejich přítomnost projevuje červeným až nachovým zbarvením. Toto typické načervenalé zbarvení je způsobeno díky antokyanům [9][10].

Jejich studium prokázalo léčivé, antioxidační vlastnosti. Spolu s vitamíny napomáhají k vychytávání volných radikálů, snižují oxidativní stres v těle, mají protizánětlivé či protirakovinné účinky. Používají se také k výrobě některých léků, dezinfekci nebo ničení bakterií [9][11].

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi polyfenoly. Tvoří velmi rozšířenou skupinu vyšších rostlinných sekundárních metabolitů čítající před 4000 druhů. Struktura flavonoidů je obecně tvořena 15 atomy uhlíku, obsahuje tedy dva benzenové kruhy spojené uhlíkovým řetězcem, tvořený třemi uhlíky. Takto tvořená struktura se pak dá zapsat ve tvaru konfigurace $C_6-C_3-C_6$. Flavonoidy se rozdělují dle chemické struktury do několika tříd: flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, isoflavony, antokyany [12][13].

Flavonoidní látky jsou pigmenty, jejichž hlavním zdrojem jsou jablka, borůvky, čokoláda, maliny, citrusy, ořechy nebo také nápoje jako čaj, pivo i červené víno. Mezi tyto pigmenty se řadí také antokyany. Jsou to červené až modrofialové pigmenty zralých plodů nebo květů.

Podle zralosti plodů, doby skladování nebo pH prostředí barviv se stupeň jejich intenzity liší. Jako další barviva, které se řadí mezi flavonoidy jsou anthoxanthiny, které jsou přirozenými inhibitory nežádoucích oxidačních změn potravin. Flavonoidy tedy patří mezi nejhojnější antioxidanty, které lze najít v běžné stravě [11][13][14].

Isoflavonoidy patří pod skupinu flavonoidů a mají vynikající účinky. Vyskytují se v luštěninách, obilninách, petrželi nebo sóje. Nalézají uplatnění hlavně při menstruačních a menopauzálních potížích. Z různých studií vyplývá, že dlouhodobé užívání flavonoidů ve stravě může snižovat výskyt rakoviny, alergií, virových a bakteriálních onemocnění i kardiovaskulárních onemocnění. To, že flavonoidy slouží jako prevence proti srdečním chorobám, potvrzují i výsledky studie *in vivo*, kdy po perorálním podání flavonoidů myším s aterosklerózou, byl zlepšen jejich zdravotní stav [11][13].

2.2.3 Třísloviny

Třísloviny neboli taniny se vyskytují u většiny druhů rostlin v rostlinné ríši. Taniny patří mezi důležité sekundární metabolity rostlin stejně tak jako celulóza, hemicelulóza nebo ligniny. Rozdělují se na dvě hlavní skupiny, a to hydrolyzovatelné a kondenzované taniny [15].

Hydrolyzovatelné taniny jsou estery cukru, nejčastěji jde o glukosu a estery fenolových kyselin. Fenolové kyseliny zde zastupuje kyselina gallová (gallotaniny), nebo kyselina ellagová (ellagitaniny). Jsou lehce hydrolyzovány za působení enzymů či kyseliny do jejich příslušných monomerních jednotek. Kondenzované taniny, též často známé jako proanthokyanidiny jsou složeny z flavonoidů, konkrétně z flavan-3-ol nebo flavan-3,4-diol jednotek [15].

Třísloviny se nacházejí v mnoha částech rostlin a dřevin. Zejména v listech, kůře nebo dřevě, kde působí jako bariéra proti mikroorganismům, patogenům, houbám apod. Dále se pak hojně vyskytují i běžných potravinách, jako jsou jahody, ostružiny, čaje, hrozny, trnky a v neposlední řadě ořechy kešu nebo lískové ořechy. Taniny ovlivňují chuť potravin, jejich chuť je vnímána jako trpká, až nahořklá. Je to způsobeno interakcí taninu s proteinem. Trpkou chuť lze rozpoznat například v červeném víně, naopak v pivu poukazuje na výskyt většího množství taninu hořká chuť. Taniny se využívají v potravinářském i zdravotnickém průmyslu [15][16].

2.2.4 Organické kyseliny

Kyseliny se uplatňují v potravinářství hlavně proto, že působí bakteriostaticky i jako aktivátory některých trávicích enzymů. Dodávají potravinám typickou chuť, nejčastěji kyselost. Pro konzervaci potravin se využívá nejčastěji kyselina citronová, jablečná nebo vinná [14].

2.2.4.1 Kyselina jablečná

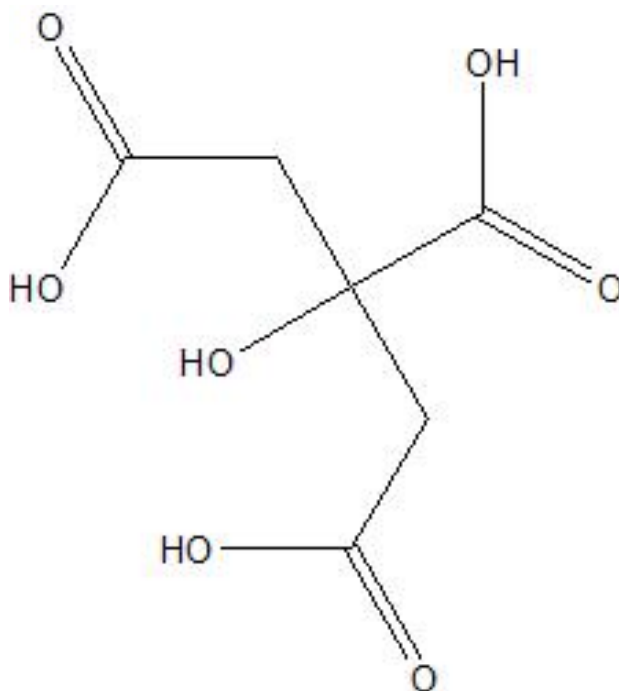
Kyselina jablečná je kyselina patřící mezi karboxylové kyseliny. Její struktura obsahuje tři hydroxylové skupiny. Vyskytuje se ve formě bílého prášku, který je vysoce rozpustný ve vodě. Kyselina jablečná má dvě stereoizomerní formy a to L-izomer a D-izomer. Je však známo, že přirozeně se kyselina jablečná vyskytuje ve vysokém množství u několika druhů ovoce a zeleniny pouze ve formě L-izomeru [19].

Nejčastěji se jedná o ovoce, které ještě není úplně zralé a s postupným zráním její množství v ovoci klesá. Jedná se hlavně o ovoce jako jsou hrozny, meruňky, višně, ale hlavně zelená nedozrálá jablka, kde výskyt této kyseliny se pohybuje okolo 3 %. Dále ji pak lze najít v Krebsově cyklu, v podobě anionu kyseliny jablečné, který je nazýván jako malát. Naopak kyselina jablečná ve formě D-izomeru je vyráběna jen synteticky [14][19][20].

Kyselina jablečná má teplotu tání stanovenou na 130 °C. Teplota tání kyseliny citronové je stanovena na 150 °C. Na základě výzkumů bylo zjištěno, že tento rozdíl teplot tání je možné využít při výrobě cukrovinek nebo tvrdých sladkostí, kdy je pro výrobce výhodnější použít právě kyselinu jablečnou namísto kyseliny citronové. Teplotní rozdíl má značný vliv jak na snížení nákladů na energie, tak na rychlost výroby [19][20].

2.2.4.2 Kyselina citronová

Tato organická kyselina, známá též jako kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová, je velmi důležitým bioproduktem. Kyselina citronová je primárním metabolickým produktem, který se tvoří při cyklu trikarboxylových kyselin neboli Krebsově cyklu. Začala se průmyslově vyrábět fermentací za pomoci houby *Aspergillus niger* v Belgii. Používá se jako ochucovadlo, pro okyselení potravin i nápojů. Zároveň je používána do konzervačních nebo čistících prostředků. V čistících prostředcích se citrát používá jako změkčovač vody [17][18].



Obrázek 2: Strukturní vzorec kyseliny citronové

2.2.5 Pektin

Z chemického hlediska je pektin hlavně lineární polysacharid složený z několika tisíc jednotek. Stavební řetězec je v hlavní podstatě tvořen molekulami kyseliny D-galakturonové, které jsou mezi sebou propojeny 1→4 glykosidickou vazbou. Nalezneme ho ve formě světle béžového prášku [21].

Pektin se vyskytuje přirozeně v přírodě jako polysacharid, který je součástí jednoděložných i dvouděložných rostlin. Je také uložen v buněčných stěn rostlinných pletiv, společně vázaný s celulózou. Díky jeho přítomnosti v buněčných stěnách, především ve střední buněčné lamelle, jsou jednotlivé buňky rostliny drženy pohromadě. Pektin tedy přispívá k pevnosti a tvrdosti nezralého ovoce i zeleniny. Pokud, ale ovoce začne zrát, začne docházet k enzymatickému štěpení pektinu, přesněji propektinu a tím ovoce měkne [14][21].

Obsah pektinu se podle druhů ovoce mění. Například citrusové nebo jablečné slupky ho mají velký dostatek. Proto se citrusový i jablečný pektin široce využívají v potravinářském průmyslu. A to i díky nízké cenové dostupnosti, jelikož obě suroviny jsou odpadem při výrobě ovocného koncentrátu. V zelenině je nejvíce pektinových látek v rajčatech. Pektin se používá jako zahušťovadlo. Také se používá jako želírující látka například do marmelád [14][21].

2.2.6 Vitamíny

Vitamíny jsou organické látky, které jsou potřebné pro normální fungování organismů, avšak sám organismus si je nedokáže vytvořit. Vitamíny tedy musí být přijímány potravou, až na některé výjimky jako je vitamin D nebo částečně niacin. Pokud má organismus nedostatek některého z vitamínů, projeví se to různými poruchami, například avitaminózou. Vitamíny fungují nejen jako katalyzátory v látkových přeměnách různých reakcí, ale patří i k antioxidačním látkám, které zabraňují tvorbě aktivních forem kyslíku [22].

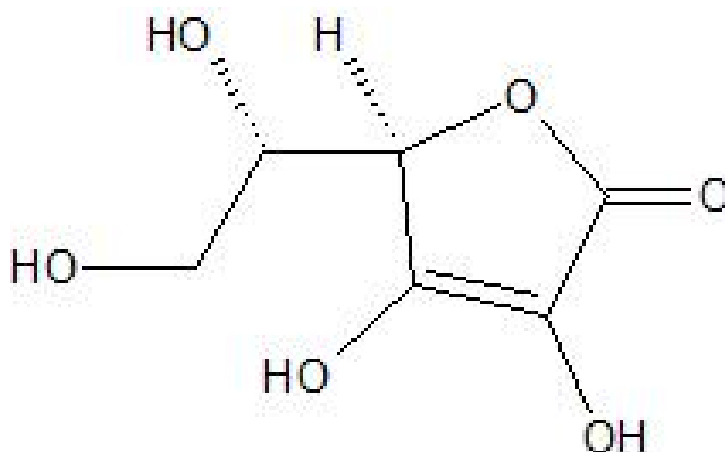
Vitamíny jsou velmi různorodé látky, a proto je po chemické stránce nelze přesně klasifikovat. Lze je však rozdělit dle rozpustnosti na hydrofilní vitamíny, tedy rozpustné ve vodě, a na vitamíny rozpustné v tucích, tzv. lipofilní vitamíny. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě jsou řazeny vitamíny B-komplex, kyselina nikotinová i vitamin C. Naopak vitamin A nebo vitamin E patří mezi vitamíny rozpustné tucích [22].

2.2.6.1 Vitamín C

Vitamín C, známý též pod názvem kyselina askorbová, je ve vodě rozpustná látka. Působí jako silný antioxidant, má redoxní vlastnosti a je nezbytně nutný pro spoustu biochemických dějů. Mezi tyto biochemické procesy patří i fotosyntéza, kde kyselina askorbová reguluje množství aktivních forem kyslíku. Všechny zelené fotoautotrofní rostliny jsou tedy schopny tuto kyselinu askorbovou syntetizovat. Také většina živočichů je schopna si syntetizovat vlastní vitamín C, avšak někteří savci jako netopýři, primáti ani lidský organismus toho bohužel není schopen, jelikož v průběhu vývoje začal postrádat L-gulonolaktonoxidázovou aktivitu, a proto je nutné ho přijímat v potravě. Vitamín C nalezneme také v ovoci a zelenině [22][23][24].

Nejvíce se vitamín C vyskytuje v citrusových plodech, černém rybízu, kadeřavé petrželi, paprice, ale hlavně v plodech růže šípkové, kde obsah vitamínu C může být až šestkrát vyšší než v pomerančích. V plodech růže šípkové se obsah vitamínu C pohybuje mezi hodnotami 2500–10000 mg/kg. Šípek se však skládá z více částí jako je slupka, semena a jemného chmýří. Dle některých studií se obsah vitamínu C v těchto částech šípku liší a nejvíce je ho obsaženo právě ve slupce. Dále pak bylo zjištěno, že obsah vitamínu C v čerstvých šípcích se značně liší od obsahu vitamínu C v šípcích, které byly usušeny. Pokud jsou šípky usušeny díky vyšším teplotám, obsah vitamínu C právě v těchto usušených šípcích může být až o polovinu nižší ve srovnání s hodnotou obsahu vitamínu C v šípcích čerstvých. Přesto jsou i sušené šípky stále bohatým zdrojem vitamínu C [8][24][25].

Vitamín C má velmi příznivé účinky na lidský organismus. Napomáhá při prevenci vůči vysokému krevnímu tlaku, rakovině, zánětům močových cest. Dokáže také vysoce aktivovat účinnost imunitního systému při virových i bakteriálních onemocněních. V neposlední řadě se vitamín C používá proti onemocnění zvaném kurděje. Kurděje je nemoc vznikající při dlouhodobějším nedostatku právě tohoto vitamínu projevující se především krvácením z dásní [22][23].



Obrázek 3: Strukturální vzorec kyseliny L-askorbové

2.2.6.2 Vitamín E

Vitamín E je souhrnný název pro látky, které jsou odvozeny od tokolu a tokotrienolu. Souhrnný název pro tuto látku je také tokoferol. V přírodě se však nejvíce nachází α -tokoferol. Vitamin E je rozpustný v tucích a je důležitým antioxidantem, který zabráňuje oxidaci tuků. U eukaryotických buněk působí jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály [22][24].

Vitamín E se vyskytuje se hlavně v rostlinách, zvláště v lipidech rostlinného původu a jen menším množstvím, je přítomen v některých potravinách živočišného původu. Hlavním zdrojem vitamínu E jsou oleje z obilných klíčků. V menším množství se tento vitamín nachází v rostlinných olejích např. v oleji řepkovém nebo slunečnicovém. Dále se pak nachází v otrubách, klíčcích, ořích nebo kukuřici. V potravinách živočišného původu je hlavním zdrojem tohoto vitamínu vepřové nebo králičí maso a vejce [22][24].

Ze studií vyplývá, že vitamín E má pozitivní vliv na zpomalení stárnutí organismu, hojení ran, pomáhá při prevenci vzniku zhoubných nádorů. Jeho nedostatek se v lidském organismu může projevit poruchami zrání pohlavních buněk až neplodností [24].

2.2.6.3 Vitamín B₁ a B₂

Vitamín B₁ (thiamin) je ve vodě rozpustná, bílá krystalická látka. Je důležitým koenzymem pro některé centrální metabolické enzymy, jako například pro dekarboxylázy. Dále je důležitým koenzymem v metabolismu sacharidů, konkrétně u pentózového cyklu. Lidé i někteří savci jsou pro příjem tohoto vitamínu odkázáni pouze na stravu. V rostlinných surovinách se nachází ve volné formě. Naopak v živočišných produktech je vázán ve formě thiamindisfosfátu, kde ho organismus před vstřebáváním musí nejprve enzymaticky rozštěpit. Hlavním zdrojem jsou nezpracované luštěniny, sójové boby, ovesné vločky. Dalším cenným zdrojem jsou pivovarské kvasnice, které mají schopnost syntézy thiaminu. Z živočišných produktů je pak zdrojem libové vepřové maso nebo ryby. Vitamín B₁ má na lidský organismus pozitivní účinky, především na podporu růstu, nervový systém a svalový aparát, trávení sacharidů, při onemocnění pásového oparu. Jeho nedostatek se může negativně projevit poruchami kardiovaskulárního i svalového systému. Nedostatek vitamínu B₁ se může projevit i nervovými poruchami, tedy nemocí zvanou beri beri, nejčastěji v rozvojových zemích. Vitamín B₂ (riboflavin) patří do skupiny flavinů. Má vysokou teplotu tání. Je odolný také vůči kyselinám nebo oxidaci, rozkládá se za přítomnosti světla. Stejně jako vitamín B₁ lidský organismus není schopen syntetizovat, musí ho přijímat v potravě. Riboflavin se nachází v játrech, mléce, kvasnicích apod [22][23][26].

2.2.6.4 Kyselina nikotinová

Kyselina nikotinová se v literatuře skrývá pod různými názvy. Najdeme ji pod názvem vitamín PP, vitamín B₃ nebo častěji niacin. Avšak systematický název kyselina pyridin-3-karboxylová znázorňuje všechny různé názvy této kyseliny. Pokud má lidský organismus k dispozici aminokyselinu zvanou tryptofan, je schopen si ji sám vyrobit. Amid kyseliny nikotinové se nazývá nikotinamid a je také velmi důležitý pro lidský organismus [22][23].

Kyselina nikotinová i její amid jsou v přírodě značně rozšířeny. Bohatým zdrojem vitamínu B₃ jsou kvasnice nebo maso. Vyskytuje se také v mouce, kde však jeho množství závisí na stupni vymletí, jelikož vitamín B₃ je ukryt v obalových vrstvách zrna a klíčku. Má blahodárné účinky na stimulaci oběhového systému, proto se používá ke snížení rizika některých kardiovaskulárních chorob. Snižuje hladinu cholesterolu, přispívá k lepšímu stavu pokožky a je součástí metabolických drah sacharidů a lipidů. Nedostatek tohoto vitamínu se projevuje nemocí zvanou Pelegra [22][27].

2.2.7 Karotenoidy

Obecně jsou karotenoidy vysoce lipofilní molekuly a mají velice významné antioxidační účinky. Karotenoidy patří do skupiny tetraaterpenoidů, mají polyenovou kostru tvořenou dlouze konjugovaným systémem dvojných vazeb. Rozdělit je lze na dvě základní skupiny, xantofyly a karoteny [6][29].

V rostlinách vystupují jako pigmenty či barviva, okrajově podílející se na fotosyntéze. Zbarvují rostlinná pletiva různými odstíny teplých barev. Karoteny jsou pigmenty červených, oranžových až nahnědlých odstínů. Tyto odstíny lze přímo vidět u malin, rybízu, ostružin aj. Již vzpomenuté xantofyly zbarvují žlutě. To je například příčinou žluté barvy u vaječného žloutku. Využití karotenoidů je široké a sahá do potravinářského, medicínského i kosmetického průmyslu. Dle některých studií lze karotenoidy extrahovat z plodů růže šípkové za použití superkritického oxidu uhličitého a poté určit jeho obsah pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bylo zjištěno, že z karotenoidů se v plodech růže šípkové nachází hlavně lykopen a β-karoten [6][14][28].

2.2.7.1 β-karoten

Jak již bylo uvedeno, v šípcích se ze skupiny karotenoidů nachází hlavně β-karoten, zvaný též jako provitamin A. Obecně je β-karoten jedním z nejrozšířenějších karotenoidů v přírodě. Struktura molekuly je tvořena čtyřmi izoprenovými jednotkami. V organismu má dvě základní role. β-karoten je prekurzorem vitamínu A, jelikož se jedna molekula β-karotenu v průběhu metabolických dějů může rozštěpit na dvě molekuly vitamínu A. Dále má pak β-karoten důležité antioxidační vlastnosti. Nachází se především v ovoci a zelenině s oranžovou a červenou barvou. Najdeme jej v tedy mrkvi, rajčatech, paprice apod. Pozitivní účinky má na imunitní systém, působí proti působení volných radikálů, proti rakovině [14][22].

2.2.8 Sacharidy

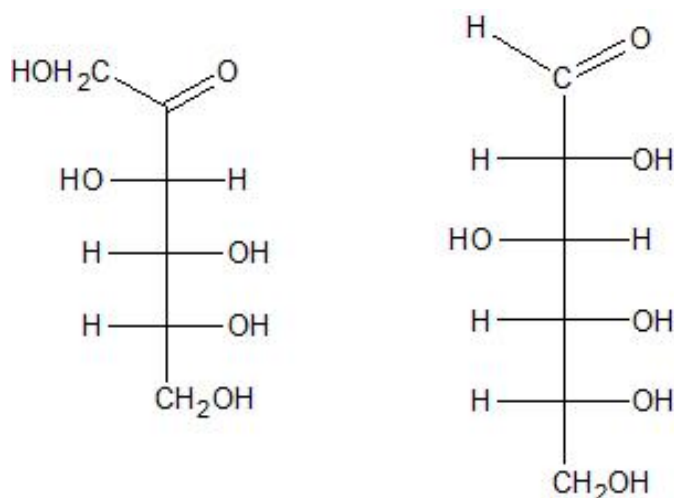
Sacharidy jsou velmi důležité přírodní látky, vyskytující se ve všech živých organismech, kde slouží jako zdroj energie. Pro sacharidy existuje také obecně zaužívaný termín cukry. Sacharidy patří do rozšířené skupiny polyhydroaldehydů a polyhydroxyketonů. Jejich struktura je složena pouze ze tří chemických prvků: uhlík, kyslík, vodík. Pro ulehčení zobrazování původně jen struktur sacharidů, byla zavedena Fischerova projekce, která je založena na projekci čtyřvazného atomu uhlíku do roviny [10].

Obecně se sacharidy dělí na hlavní skupiny, avšak jejich další dělení je rozmanité. Jednou nich jsou monosacharidy (jednoduché sacharidy) a řadí se mezi ně např. glukosa, fruktosa. V přírodě jsou velmi rozšířeny, nejvíce v rostlinné říši, kde se při fotosyntéze vyskytují ve formě glukosy. Tyto krystalické, ve vodě rozpustné sacharidy jsou typické pro svou sladkou chuť. Monosacharidy se dělí na dvě skupiny (aldosy a ketosy), kdy dle jejich názvu lze rozpoznat, o jaký druh karbonylové skupiny se jedná [10][29].

Druhou skupinou jsou složené sacharidy. Tato skupiny je dělena ještě na dvě podskupiny, a to na oligosacharidy a polysacharidy. U složených cukrů jsou sacharidové jednotky propojeny acetalovými vazbami. Mezi oligosacharidy řadíme všechny cukry, které jsou složeny ze dvou až deseti navzájem propojenými monosacharidy, což je například laktosa, maltosa nebo sacharosa. Složení polysacharidů je pak ze stovek až tisíců monosacharidů, mezi které patří např. celulóza [10].

2.2.8.1 Ovocné cukry

V ovoci se nejvíce vyskytují monosacharidy jako glukosa, fruktosa. Glukosa je monosacharid vznikající při fotosyntéze, procesu zelených rostlin. Glukosa slouží také jako vstupní cukr pro důležitou metabolickou dráhu glykolýzu. Tento cukr je přezdíván hroznovým cukrem, jelikož jeho podíl v hroznovém víně je velký. Další ovoce s větším podílem glukosy jsou třešně, švestky a neposlední řadě datle, kde podíl glukosy dosahuje okolo 32 %. Fruktosa je přezdívána jako ovocný cukr a patří mezi hexosy (šestiuhlíkaté monosacharidy). Vyskytuje se v jahodách, jablkách, hruškách, hroznovém víně, banánech i datlích [10][24].



Obrázek 4: D-fruktosa a glukosa ve Fischerově projekci

2.3 Využití a účinky růže šípkové

V posledních letech byly vytvořeny četné studie a výzkumy o Růži šípkové a jejím plodu, proto její využití v různých průmyslech stoupá. Jedná se hlavně o potravinářský průmysl, kosmetický průmysl, farmacie, ale také o domácí spotřebu. Tyto průmysly využívají Růži šípkovou hlavně pro její bioaktivní složky, antioxidační vlastnosti, které mají pozitivní vliv na zdraví člověka. V potravinářském průmyslu se růže šípková a její plody používají na výrobu džemů, pyré, želé, sirupů, kompotů, ale i nápojů (čaje, víno) a olejů. V dnešní době se využívá i odpad ze zpracovaných částí růže šípkové, buď jako krmivo pro zvířata, nebo jako biomasa ke spalování. Spotřeba a využití růže šípkové je populární jak v celé Evropě (Německo, Portugalsko, Bulharsko, Turecko, skandinávské země aj.), tak i různě ve světě (Chile) [8][30].

2.3.1 Čaj

Čaj je nealkoholický nápoj, který se hned po vodě nejčastěji konzumuje. Vzhledem k tomu, že denní konzumování čajů má blahodárné účinky na zdraví, jeho spotřeba celosvětově stále stoupá. Populárními čaji se staly i čaje bylinných směsí s přídavkem sušeného šípkového ovoce. Z růže šípkové jsou do čajů zpracovány zejména její plody a okvětní lístky. Dle studie bylo zjištěno, že takové čaje disponují hojným obsahem bioaktivních látek prospěšné pro lidský organismus [31].

2.3.2 Hospodářství

Růže šípková se také využívá jako přídavek do výživ pro hospodářské zvířata. Některé studie *in vivo* a *in vitro* prokázaly, že přidání šípků ve vhodné dávce do výživy pro drůbež mají příznivé účinky, jelikož poté výživa obsahuje potřebné biologicky aktivní sloučeniny. Bylo zjištěno, že díky těmto biologicky aktivním látkám se zlepšil růst i zdravotního stav drůbeže a zlepšila se i kvalita samotného masového produktu. Podobné výsledky byly zaznamenány i u rozborů vajec slepic, kterým byla podávána výživa s obsahem šípků a tím prokázány antioxidační účinky. Nejen že samotná vejce byla hmotnostně těžší, ale také žloutek v nich obsahoval méně špatného cholesterolu [32].

2.3.3 Potraviny

V potravinářském průmyslu se vědci snaží zjistit, jak zlepšit kvalitu a skladování potravin. Studie provedena v Belgii přidala výtažky z růže šípkové do klobás. Oxidace lipidů a bílkovin je pro masné výrobky dobře známý negativní jev. Jelikož šípky obsahují fenolické látky i vitamín C, prokázaly se tak jejich antioxidační účinky. Po přidání extraktů z šípků do klobás se zlepšila kvalita i jejich trvanlivost při skladování. Dále pak bylo v již zmíněné studii provedené v Belgii zjištěno, že extrakty z růže šípkové pozitivně přispívali k tvorbě lepší chuti a vzniku růžovější barvy masa, což je pro klobásy typické [33].

2.3.4 Farmacie a kosmetický průmysl

Jedním z produktů hojně používaný jak ve farmacii, tak v kosmetickém průmyslu je šípkový olej. K extrakci olejů ze semen plodů růže šípkové se nejčastěji používají dvě základní techniky, a to lisování nebo metoda extrakce rozpouštědlem. V posledních letech se však začali užívat i modernější extrakční techniky jako například extrakce pomocí ultrazvuku nebo extrakce pomocí superkritických látek, zejména pomocí superkritického oxidu uhličitého. Ten se nejčastěji využívá v kosmetickém průmyslu. Tyto modernější metody jsou používány hlavně protože umožňují získat olejů ve vysoké kvalitě. Šípkový olej má příznivé zdravotní účinky a obsahuje mnoho funkčních látek (vitamín C, karotenoidy, minerály, fenolové sloučeniny, nenasycené mastné kyseliny). Díky těmto látkám se šípkový olej v kosmetickém průmyslu využívá pro jeho terapeutické účinky na kožní onemocnění. Šípkový olej lze také užívat při prevenci některých typů rakoviny, očním i srdečním onemocněním [34][35].

2.4 Čerstvé ovocné šťávy

Jak je již známo, samotné ovoce má hojně příznivé účinky na lidský organismus. Lidé ho začali více zařazovat nejen do své stravy, ale i do svého pitného režimu. Proto se posledních letech výroba a konzumace čerstvých ovocných či zeleninových šťáv staly velkým trendem. V současné době trh nabízí nespočet různých druhů čerstvých ovocných šťáv i džusů. Vyrábí se nejen z ovoce, ale i ze zeleniny citrusových plodů apod. Také lze na trhu najít ovocné šťávy vyrobené z koncentrátů nebo různé druhy nektarů apod. Typ označení pro konkrétní šťávy je určen zejména podle podílu ovocné složky, cukru nebo přidaných látek. Některé ovocné šťávy mohou být syceny oxidem uhličitým [36][37].

Ovocné čerstvé šťávy se obecně řadí mezi nealkoholické nápoje, které dle legislativy nesmí obsahovat více než 0,5 % obj. ethanolu. Ovocná šťáva je výrobek, který může být vyrobena z jednoho druhu přiměřeně zralého ovoce. Ovocná šťáva může být také vícesložková a vyrobená z více druhů přiměřeně zralého ovoce v různém poměru. Ovoce použité na výrobu čerstvých čirých šťáv by mělo být ovoce, které má větší obsah šťávy jako například jablka a nemělo by být přezrálé. Vhodné jsou i další druhy ovoce jako hrušky, hrozny nebo višně. Tyto další druhy ovoce však nejsou pro výrobu ovocných šťáv tak časté a vyrábí se většinou na zakázku [21][37][38].

Ovocná šťáva se vyrábí nejen z čerstvého zralého ovoce, ale i z ovoce zmrazeného, což není v České republice zatím velmi využíváno. Obsah ovoce ve šťávách je určen legislativou a musí obsahovat 100 % ovocného podílu. Pokud se nejedná o ovocnou šťávu s obsahem 100 % ovocného podílu, ale jedná se například o nektar, výrobce musí tento údaj viditelně uvést na obalu [37][38].

2.4.1 Výroba čerstvých ovocných šťáv

Produktem výroby čirých ovocných šťáv, jsou šťávy neobsahující žádný zákal, musí být zcela jiskrné a vyrábí se pouze z ovoce. V současné době se takové šťávy spíše zahušťují na ovocné koncentráty [37].

2.4.1.1 Předběžné přípravné operace

Nejprve se při výrobě provedou tzv. předběžné přípravné operace, mezi které patří sklizeň, skladování, čištění a třídění ovoce, odstranění nepoživatelných částí (odstopkování, odpeckování, loupání). Zralost ovoce pro výrobu šťáv se hodnotí dle zbarvení plodu a semen jádrového ovoce, tvaru, chemického složení plodů (obsah cukru, vitamínu C, pH apod.) i podle tvrdosti dužiny, která se měří pomocí jednoduchých přístrojů jako je penetrometr nebo tenderometr. Pokud je tedy zralost ovoce na výrobu ovocných šťáv již vyhovuje dochází ke sklizni. Dále se ovoce skladuje. Nesmí však docházet k množení mikroorganismů, proto zpracovatelé preferují co nejkratší dobu skladování [37][38][39].

Následně se ovoce čistí a zbavuje případných kontaminantů. Čištění se provádí dvěma způsoby, a to suchým čištěním nebo mokřím čištěním, které se nazývá také praním. Oba způsoby čištění mají své výhody i nevýhody. Suché čištění je levnější, ale méně účinné a funguje na principu využití proudů vzduchu. Naopak mokré čištění je finančně náročnější, ale více účinné a funguje na principu využití oplachování pitnou vodou [38][39].

Dalším krokem je třídění, kdy se ovoce třídí podle kvality, barvy, zralosti a velikosti. Nakonec se odstraní nepoživatelné části. Nejprve se plody odstopkují, a to buď mechanicky nebo strojově v závislosti na tvaru a měkkosti ovoce. Dále se ovoce odpeckuje nebo se odstraní jadřince například u jablek. Posledním krokem je loupání, které se provádí jen u některých druhů ovoce a provádí se buď mechanicky, chemicky nebo termicky [38][39].

2.4.1.2 Výroba čirých ovocných šťáv

Jak již bylo zmíněno, čirá ovocná šťáva je šťáva, neobsahující žádný zákal. Při výrobě šťáv se nejdříve provedou výše uvedené předběžné přípravné operace. Následuje proces zvaný drcení, který se provádí například pomocí hrotů nebo kladívkových mlýnků. Dochází k drcení ovocného pletiva a napomáhá se tak většímu výtěžku šťáv. Pro zvýšení ještě vyšší výtěžnosti se drť podrobí působení enzymových preparátů, tzv. pektolýze. Tyto enzymové preparáty obsahují hlavně pektolytické enzymy, které napomáhají štěpit buněčné membrány. Nejčastěji pektolýza probíhá při pokojové teplotě cca 20 °C [37].

Po pektolýze je drť připravena k lisování. Lisování se provádí hlavně mechanicky pomocí tlaku. Lisování ze šťávy odstraní také hrubé kaly odstředěním nebo filtrací. Po tomto procesu je získána surová ovocná šťáva, která je jemně zakalená. Pro odstranění těchto kalů se používá proces zvaný číření. Produktem je tedy čirá jiskrná ovocná šťáva, která se poté konzervuje. Produkty těchto procesů, tedy číré ovocné šťávy mají pak dle svého složení svou charakteristickou barvu, vůni i chuť. V současnosti se však drtivá většina čirých ovocných šťáv konzervují zahuštěním na šťávní koncentráty [36][37].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a pracovní pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- spektrofotometr – UV/VIS SPEKOL 1300 – Analytik Jena, Německo
- spektrofotometr – NanoPhotometer Pearl, Německo
- automatické pipety – VITRUM, Česká republika
- magnetická míchačka s ohřevem – LAVAT, MM7, Česká republika
- vortex – HEIDOLPH, REAX TOP, Německo
- analytické váhy – Ohaus, Švýcarsko
- stolní centrifuga – EBA 200, Hettich, Německo
- sítko
- odšťavňovač

3.2 Použité chemikálie

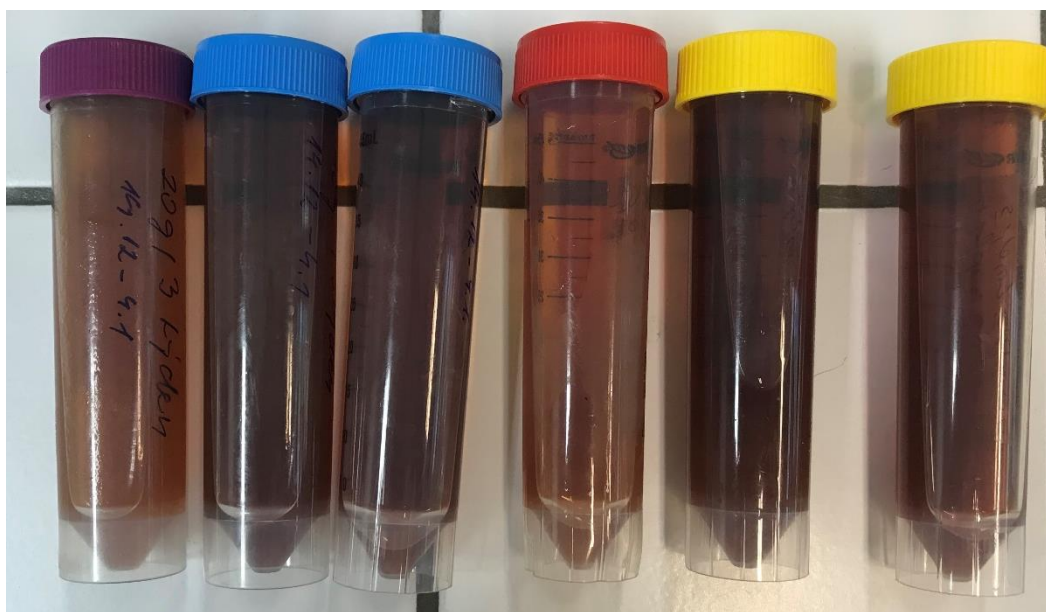
- destilovaná voda
- 5% Folin-Ciocalteovo činidlo – Penta,
- kyselina gallová monohydrát – Penta
- uhličitan sodný bezvodý p.a. – Lach-ner
- dusitan sodný – Penta
- chlorid hlinitý bezvodý p.a. – Lach-ner
- hydroxid sodný p.a. – Penta
- katechin hydrát p.a. – Sigma Aldrich
- kyselina askorbová – Sigma Aldrich
- 2,6-dichlorfenolindofenol dihydrát p.a. – Sigma Aldrich
- monohydrogenfosforečná kyselina – VWR Prolabo Chemicals
- ABTS – Sigma Aldrich
- trolox – Sigma Aldrich
- UV–VIS ethanol 96% – Penta
- peroxidisíran draselný – Sigma Aldrich
- ethanol 99,9% p.a. – Merck
- hydrogenuhlíčan sodný p.a. – Lach-ner
- síran sodný bezvodý p.a. – Lach-ner
- vinan sodno-draselný p.a. – Lachema
- pentahydrát síranu měďnatého p.a. – Penta
- molybdenan amonný p.a. – Lach-ner
- kyselina sírová 96% p.a. – Lach-ner
- hydrogenarseničan sodný heptahydrát – Lachema
- D-glukosa monohydrát p.a. – Lach-ner
- kyselina gallová monohydrát – Penta

3.3 Použitý software

- Operační systém Windows
- MS Word
- MS Excel
- OriginPro

3.4 Příprava ethanolových extraktů

Pro experimentální část bakalářské práce byly sesbírány plody růže šípkové ze dvou různých oblastí, a to ze Zlínského a Jihomoravského kraje. Plody růže šípkové byly sesbírány na přelomu září a října v roce 2020. Sesbírané plody růže šípkové byly smíchány, následně propláchnuty vodou, očištěny a uchovány v mrazničce pro další postup. Poté byly šípky sušeny při teplotě 50 °C na Petriho misce v sušárně po dobu jednoho týdne. Takto usušené šípky byly naváženy (20 g; 40 g; 60 g) do 12 skleněných nádob. Do již připravených skleněných nádob s naváženými plody růže šípkové bylo přidáno vždy 100 ml připraveného 40 obj.% ethanolového roztoku. Takto připravené vzorky byly extrahovány při pokojové teplotě po dobu 7, 14, 21 a 28 dní. Následně byly ethanolové extrakty scezovány během čtyř týdnů do centrifugačních zkumavek. Po uplynutí jednoho týdne byly scezeny první tři skleněné nádoby s ethanolovými extrakty (20 g; 40 g; 60 g). Stejný postup byl proveden i pro zbylé vzorky po druhém, třetím a čtvrtém týdnu. Scezené ethanolové extrakty po jednotlivých týdnech byly uchovány v lednici pro následující analýzu.



Obrázek 5: Ukázka ethanolových extraktů z plodů růže šípkové

3.5 Stanovení sacharidů

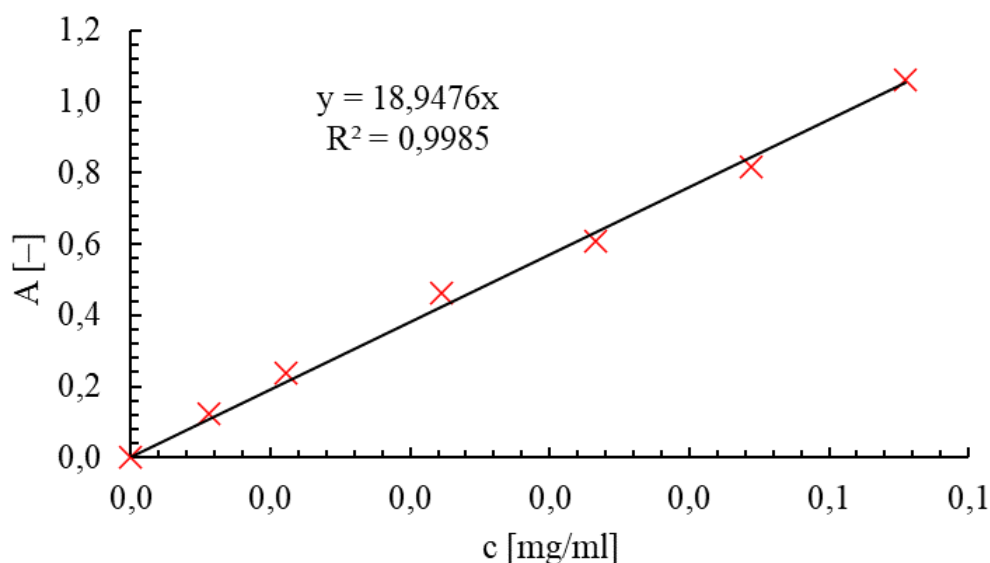
Stanovení sacharidů bylo provedeno podle metody Somogyiho-Nelsona. Metoda je založena na principu redukce měďnatých iontů na ionty měďné. Vzniklé měďné ionty dále redukuje komplex arsenomolybdenanu za vzniku molybdenové modři. Při reakci původně světle zelenomodrá barva změní na tmavě modrou [34].

3.5.1 Měření vzorků a kalibrační křivky

Pro měření obsahu sacharidů byly nejprve připraveny tři roztoky:

- Roztok I byl připraven smícháním 24 g bezvodého Na_2CO_3 , 144 g bezvodého Na_2SO_4 , 16 g NaHCO_3 s 12 g vinanu sodno-draselného. Nakonec bylo vše dobře rozmícháno v 800 ml destilované vody.
- Roztok II byl připraven smícháním 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ s 24 g bezvodého Na_2SO_4 , vše bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody.
- Roztok III byl připraven rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného v 450 ml destilované vody. Do takto připraveného roztoku bylo přidáno 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ rozpuštěného v 25 ml destilované vody a 21 ml koncentrované H_2SO_4 . Takto připravený roztok III byl ponechán stát 48 hodin při laboratorní teplotě.

Do skleněných zkumavek bylo napipetováno vždy 1 ml vzorku a 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Zkumavky byly umístěny do vroucí lázně po dobu 10 minut. Po uplynutí 10 minut byly zkumavky ochlazeny proudem studené vody a bylo k jejich obsahu napipetováno ještě 0,5 ml roztoku III. Takto připravené zkumavky byly dobře promíchány, aby došlo k úplnému rozpuštění oxidu měďného. Vzniklý tmavě modrý roztok byl naředěn 7,5 ml destilované vody a byla změřena absorbance proti slepému vzorku při 720 nm. Kalibrační křivka byla připravena obdobně jako vzorky, pouze místo analyzovaného vzorku byl napipetován roztok glukosy o požadovaných koncentracích.



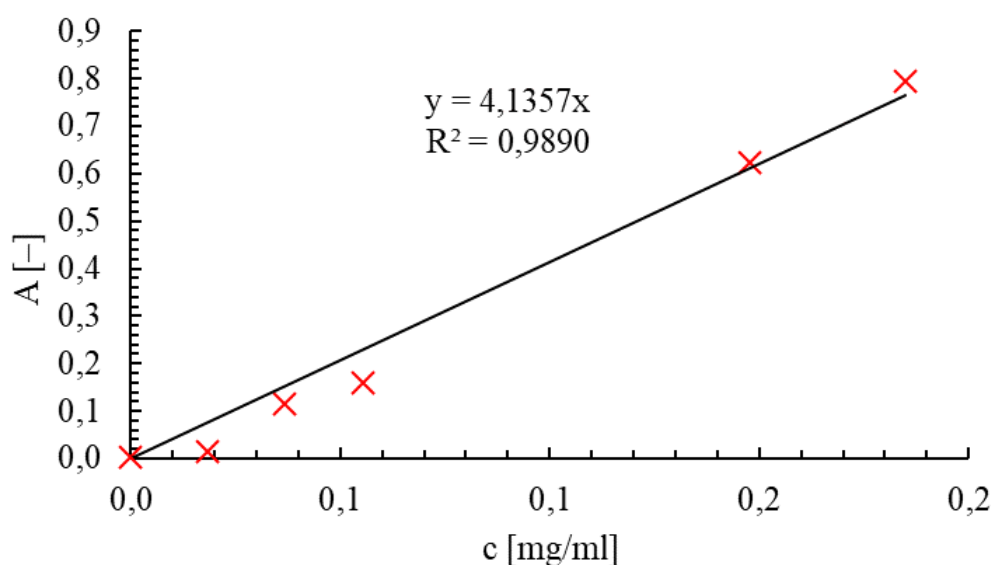
Obrázek 6: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [mg/ml]

3.6 Stanovení celkových polyfenolů

Principem metody stanovení celkových polyfenolů je reakce fenolických látek s Folin-Ciocalteovým činidlem. Jedná se o spektrofotometrickou metodu, kde je aktivita reakce úměrná koncentraci hydroxylových skupin přítomných na aromatickém jádře. Tyto hydroxylové skupiny na aromatickém jádře ovlivňují redukční potenciál na molekule látky [40].

3.6.1 Měření vzorků a kalibrační křivky

Folin-Ciocalteovo činidlo bylo rozředěno destilovanou vodou v poměru 1:9. Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného Folin-Ciocalteova činidla a 1 ml destilované vody. K takto připravenému roztoku bylo napipetováno automatickou pipetou 100 μl analyzovaného vzorku. Poté byl celý roztok promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí 5 minut bylo k celkovému roztoku přidáno ještě 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Nově vzniklý roztok byl promíchán a poté ponechán 15 minut stát při laboratorní teplotě. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 750 \text{ nm}$. Jako slepý vzorek byla destilovaná voda. Kalibrační křivka byla připravena stejně jako vzorky, pouze místo analyzovaného vzorku byl napipetován roztok kyseliny gallové o požadovaných koncentracích.



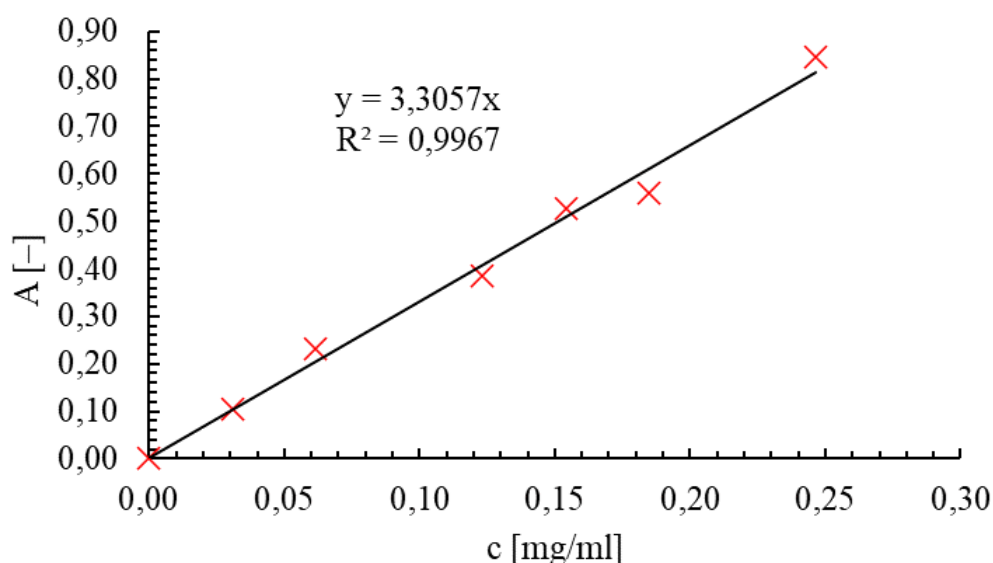
Obrázek 7: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [mg/ml]

3.7 Stanovení flavonoidů

Metoda stanovení obsahu flavonoidů v ethanolových extraktech byla provedena spektrofotometricky, kdy principem metody je reakce s chloridem hlinitým a dusitanem sodným [41].

3.7.1 Měření vzorků a kalibrační křivky

Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 0,2 ml dusitanu sodného, 1,5 ml destilované vody a 0,5 ml analyzovaného vzorku. Takto připravený roztok byl ihned důkladně promíchán a ponechán stát 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 5 minut bylo přidáno 0,2 ml chloridu hlinitého. Roztok byl opět ihned promíchán a nechán stát 5 minut při laboratorní teplotě. Poté se do roztoku napipetovalo 1,5 ml hydroxidu sodného a ještě 1 ml destilované vody. Nakonec byl roztok znovu důkladně promíchán a ponechán stát 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 15 minut byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 510$ nm. Jako slepý vzorek pro tuto analýzu byla použita destilovaná voda. Pro stanovení a přípravu kalibrační křivky byl použit stejný postup jako u měření analyzovaného vzorku s výjimkou, že místo analyzovaného vzorku byl přidán roztok katechinu o koncentracích 0,05-0,3 g/l.



Obrázek 8: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [mg/ml]

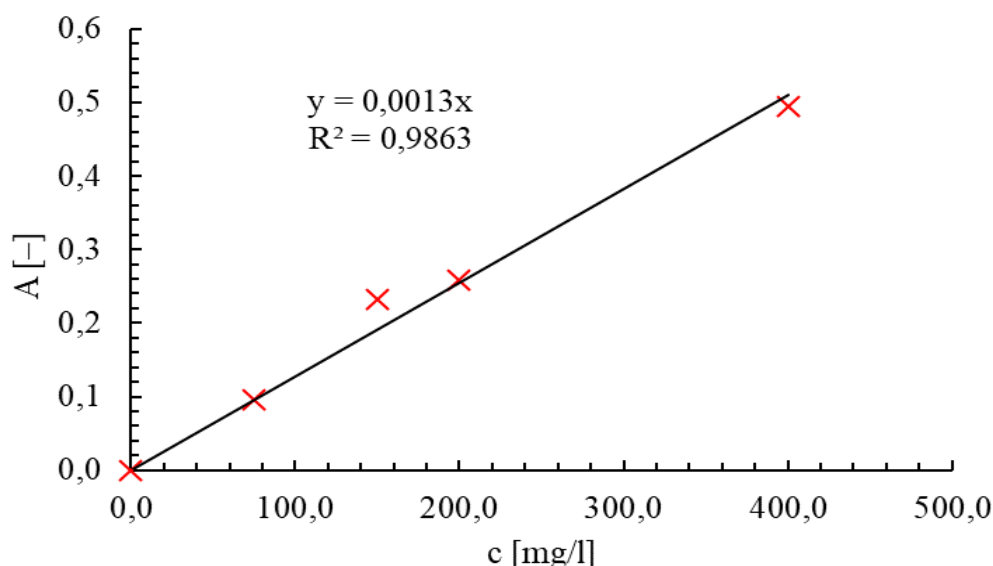
3.8 Stanovení vitamínu C

3.8.1 Měření vzorků titrační metodou

Při stanovení obsahu vitamínu C byla nejprve provedena standardizace roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu. Tato standardizace byla provedena tak, že k 1 ml standardního roztoku kyseliny askorbové bylo přidáno 10 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné. Takto připravený roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu do bodu ekvivalence, tedy růžového zbarvení. Dále bylo napipetováno 10 ml analyzovaného vzorku do titrační baňky a k těmto 10 ml vzorku bylo napipetováno 10 ml 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Byla provedena titrace, a to vždy třikrát [42].

3.9 Stanovení antioxidační aktivity

Nejprve bylo ABTS rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7mM. Pro získání radikálového kationtu $ABTS^{•+}$ byl přidán peroxodisíran draselný o koncentraci 2,45 mM. Poté byl roztok ponechán stát po dobu 12 hodin ve tmě. Po uplynutí 12 hodin byl $ABTS^{•+}$ roztok naředěn pomocí UV-VIS ethanolu na absorbanci $0,70 \pm 0,02$ při vlnové délce $\lambda = 734$ nm. Následně bylo do zúžené kyvety napipetován 1 ml zředěného roztoku $ABTS^{•+}$ a 10 μ l destilované vody. Byla ihned změřena absorbance v čase 0 (A_0). Nakonec byl do zúžené kyvety opět napipetován zředěný roztok $ABTS^{•+}$ a 10 μ l analyzovaného vzorku. Celý roztok byl promíchán a byla změřena absorbance v čase 10 (A_{10}). Jako slepý vzorek byl použit ethanol. Pro výpočet absorbance analyzovaného vzorku byla použita rovnice $A = A_0 - A_{10}$. Pro přípravu kalibrační křivky byl jako standard použit roztok Troloxu, který byl naředěn 60% ethanolem na požadované koncentrace [40] [43].

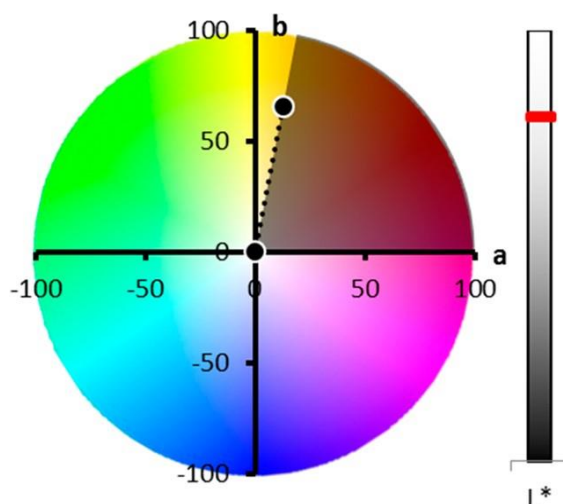


Obrázek 9: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci [mg/l]

3.10 Stabilizace čerstvé hruškové šťávy extraktem z plodů šípků

Ověření antioxidačního účinku extraktů na stabilizaci čerstvé šťávy bylo provedeno kolorimetricky pomocí spektrofotometru. V této závěrečné práci bylo toto ověření provedeno na ovocné čerstvé šťávě z hrušek, jelikož obecně čerstvé šťávy z hrušek rychle vlivem za přístupu vzduchu hnědnou, a to díky enzymům, železu a mědi vyskytujícím se ve šťávě, které reagují s kyslíkem. Konkrétně se jednalo o hrušky typu „Williamsova“ a o hrušky zelené. Kolorimetrie je metoda, kterou je možné definovat barvu jako kombinaci tří hodnot. Tyto kombinace hodnot jsou známy jako „barevné souřadnice“. Pro vyhodnocení výsledků byl použit Microsoft Excel a Microsoft Visual Basic. Hodnocení barvy bylo provedeno pomocí modelu CIE $L^*a^*b^*$, kde L^* je parametr měrné svítivosti (stanovuje se, zda se jedná o světlou nebo tmavou barvu), parametr a^* definuje červenou nebo zelenou barvu a parametr b^* definuje modrou nebo žlutou složku. Dále pak byly pomocí Microsoft Excel vypočítány hodnoty C^* a H^* , kde C^* značí tzv. chroma, které určuje pestrost barvy v rozmezí od 0 do 100. Dále pak hodnota H^* značí odstín barvy [44].

Vzorky pro analýzu byly připraveny následujícím postupem. V odšťavňovači na ovoce byla odšťavena hruška a následně byla šťáva z hrušky (1 ml) napipetována do skleněných zkumavek o objemu 5 ml. Do takto připravených zkumavek byl napipetován ethanolový extrakt RŠ-40-2 o různých koncentracích od 40 do 160 l extraktu na 1 ml hruškové šťávy. Ihned po přidání ethanolového extraktu byla měřena absorbance v rozmezí od 380 nm do 780 nm a data byly označeny jako v čase t_0 a pak byly vzorky měřeny různých časových rozmezích. Následně byly hodnoty vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel, ve kterém byl předpřipravený pomocný model CIE $L^*a^*b^*$. Měření byly provedené při laboratorní teplotě 21 °C a v otevřených zkumavkách, čím se simulovali běžné podmínky např. při přímém prodeji čerstvých šťáv.



Obrázek 10: Ukázka koláčového grafu pro vyhodnocení kolorimetrického stanovení

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

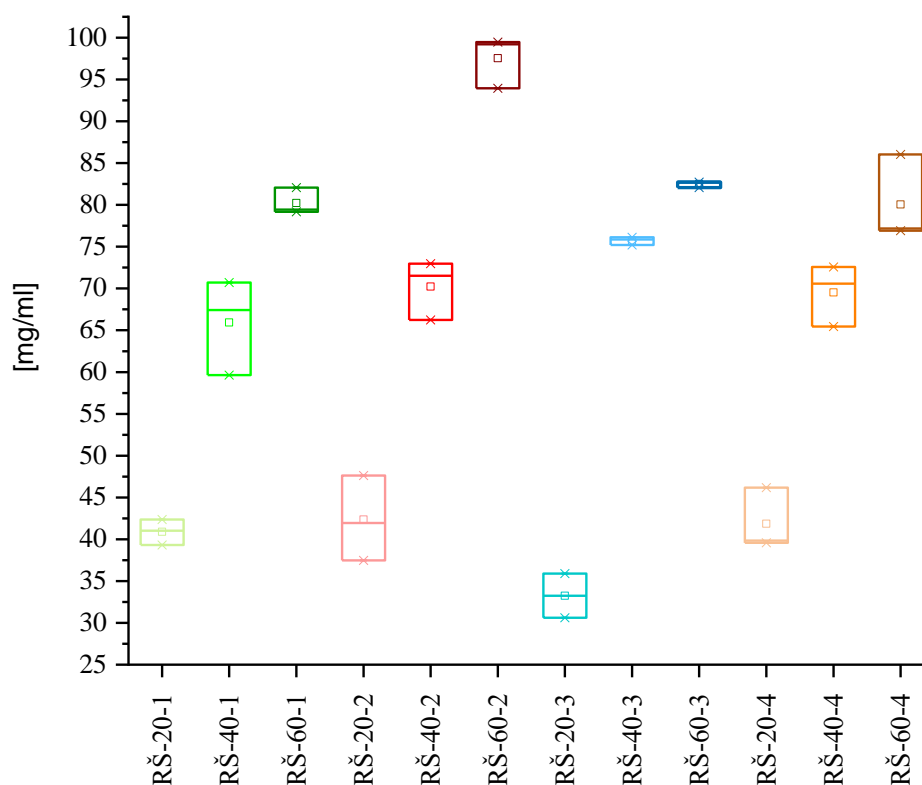
Hlavním cílem této práce byla produkce ethanolových extraktů z nasbíraných plodů růže šípkové a poté z provedených analýz stanovit celkové obsahy sacharidů, polyfenolů, flavonoidů, vitamínu C a stanovit antioxidační aktivitu v ethanolových extraktech z plodů růže šípkové. Poté ověřit antioxidační účinek na čerstvé šťávě z hrušky za pomoci přidání vybraného ethanolového extraktu z plodů růže šípkové s nejvyšší antioxidační aktivitou.

4.1 Stanovení sacharidů

Stanovení sacharidů bylo provedeno pomocí metody Somogyiho-Nelsona. Celkem bylo touto metodou proměřeno 12 ethanolových extraktů z šípků celkem třikrát. Dosazením naměřených hodnot absorbancí do rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v experimentální části (obrázek 6), byl stanoven celkový obsah sacharidů ve vzorcích. Všechny vypočítané hodnoty byly zprůměrovány a zapsány do tabulky 1 a byly vyneseny do grafu (obrázek 11).

Tabulka 1: Naměřené hodnoty pro stanovení sacharidů pomocí metody Somogyiho-Nelsona

vzorek	c [mg/ml]			průměr c [mg/ml]	SD [mg/ml]
	1. měření	2. měření	3. měření		
RŠ-20-1	39,3	41,0	42,4	41,0	1,5
RŠ-40-1	59,6	67,4	70,7	66,0	5,7
RŠ-60-1	82,1	79,2	79,4	80,2	1,6
RŠ-20-2	47,6	37,5	42,0	42,4	5,1
RŠ-40-2	71,5	73,0	66,2	70,2	3,5
RŠ-60-2	99,5	99,2	94,0	97,6	3,1
RŠ-20-3	30,6	33,3	35,9	33,3	2,6
RŠ-40-3	76,1	75,2	75,9	75,7	0,5
RŠ-60-3	82,7	82,1	82,7	82,5	0,4
RŠ-20-4	46,2	39,9	39,6	41,9	3,7
RŠ-40-4	72,6	70,6	65,4	69,5	3,7
RŠ-60-4	86,0	77,2	77,0	80,1	5,2



Obrázek 11: Výsledné koncentrace sacharidů v analyzovaných vzorcích

Z průměrných hodnot, které jsou uvedeny v tabulce 1 je zřejmé, že nejvyšší obsah sacharidů byl naměřen ve vzorku RŠ-60-2. Graf (obrázek 11) byl vytvořen pomocí programu Origin a v tomto programu byla také provedena statistická analýza ANOVA. Z vytvořeného grafu (obrázek 11) lze vyčíst, že koncentrace sacharidů ve vzorcích se zvyšovaly s narůstajícím množstvím navážky šípků. Naopak doba louhování ethanolových extraktů z šípků nemá z hlediska výsledné statistiky na množství sacharidů vliv, jelikož se průměrné množství sacharidů ve vzorcích RŠ-60-1, RŠ-60-3 a RŠ-60-4 od sebe liší jen zanedbatelně. Zastoupení sacharidů v ethanolových extraktech bylo v porovnání s ostatními stanovovanými látkami nejvyšší.

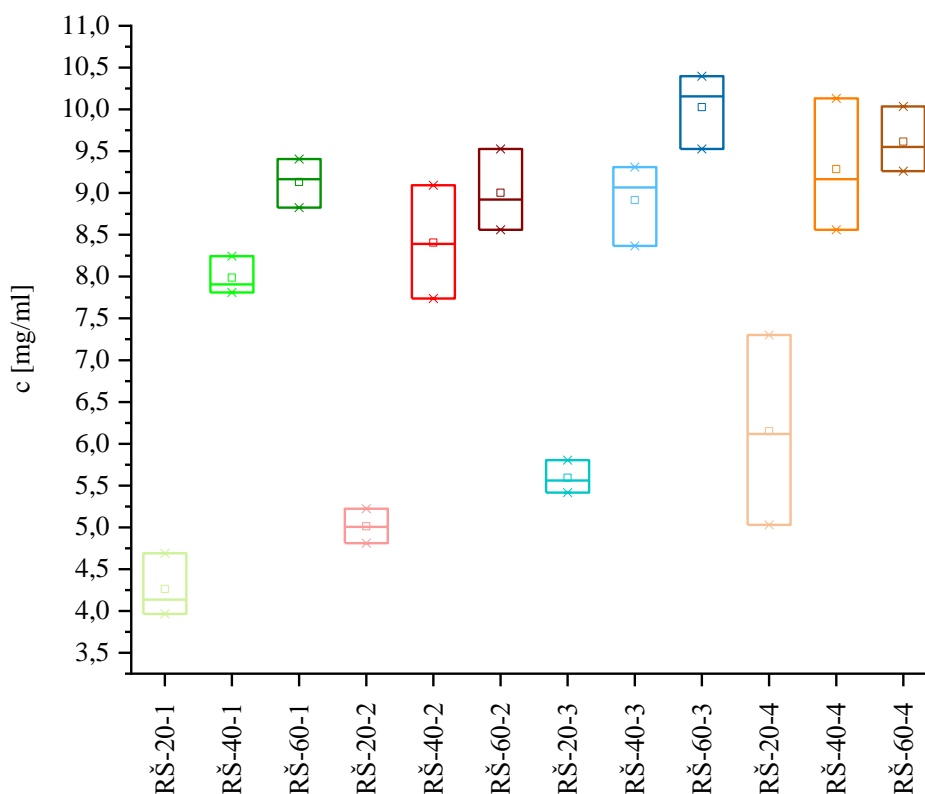
Ve studii provedené autory Cunja a kolektiv se uvádí, že na množství sacharidů v plodech růže šípkové má významný vliv počasí. Na obsah sacharidů měl největší vliv mraz. Šípky, které byly v článku použity na analýzu byly sesbírány ve dvou různých obdobích. První šípky byly sesbírány na přelomu září/říjen a druhé šípky byly sesbírány na konci listopadu, což způsobilo, že šípky prošly prvním mrazem. Při porovnání těchto dvou druhů šípků bylo zjištěno, že šípky sesbírány po udeření prvního mrazu obsahovaly až o polovinu menší množství sacharidů, než šípky sesbírány na přelomu září/říjen. V porovnání s literaturou je možné usoudit, že i v analyzovaných extraktech v předložené bakalářské práci je množství sacharidů značně vysoké, jelikož šípky byly sesbírány taktéž na přelomu září/říjen, a tudíž neprošly mrazem [46].

4.2 Stanovení celkových polyfenolů

Pro stanovení celkových polyfenolů byla použita metoda pomocí Folin-Ciocalteova činidla. Je to metoda založená na redukci polyfenolů a provádí se spektrofotometricky. Ve všech 12 ethanolových extraktech z plodů růže šípkové byla tato metoda provedena celkem třikrát. Z naměřených výsledků byla získána průměrná hodnota se statistickou odchylkou (SD). Z rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové (standard), která je uvedena v experimentální části (obrázek 7), byl vypočítán dosazením naměřených absorbancí celkový obsah polyfenolů v analyzovaných vzorcích. Naměřené hodnoty touto metodou jsou uvedeny v tabulce 2 a vyobrazeny v grafu (obrázek 12).

Tabulka 2: Naměřené hodnoty pro stanovení polyfenolů

vzorek	c [mg/ml]			průměr c [mg/ml]	SD [mg/ml]
	1. měření	2. měření	3. měření		
RŠ-20-1	4,13	3,97	4,69	4,26	0,38
RŠ-40-1	7,91	7,81	8,25	7,99	0,23
RŠ-60-1	9,41	8,82	9,16	9,13	0,29
RŠ-20-2	5,22	5,01	4,81	5,01	0,21
RŠ-40-2	9,09	7,74	8,39	8,41	0,68
RŠ-60-2	8,56	8,92	9,53	9,00	0,49
RŠ-20-3	5,56	5,80	5,41	5,59	0,20
RŠ-40-3	8,37	9,07	9,31	8,91	0,49
RŠ-60-3	9,53	10,16	10,40	10,03	0,45
RŠ-20-4	7,30	5,03	6,12	6,15	1,13
RŠ-40-4	8,56	9,16	10,13	9,29	0,79
RŠ-60-4	9,26	9,55	10,03	9,62	0,39



Obrázek 12: Výsledné koncentrace polyfenolů v analyzovaných vzorcích

Pomocí statistické analýzy ANOVA vytvořené v programu Origin byly mezi sebou porovnávány jednotlivé výsledky stanovení polyfenolů. Následně byl vytvořen graf (obrázek 12). Z průměrných hodnot vypsanych v tabulce 2 je vidět, že nejvyšší obsah celkových polyfenolů obsahoval analyzovaný vzorek RŠ-60-3. Bylo však zjištěno, že ze statistického hlediska není rozdíl mezi vzorkem RŠ-60-3 a RŠ-40-2 významný. Je tedy jasné, že delší louhování extraktu, nebo vyšší navážka šípků nemá na obsah celkových polyfenolů statistický význam. Proto byl vzorek RŠ-40-2 vybrán k porovnání se studiemi, jelikož použití vzorku RŠ-60-3 by bylo plýtvání jak samotnými šípkami, tak i časem (dobou louhování). Průměrná hodnota celkových polyfenolů analyzovaného vzorku RŠ-40-2 byla stanovena na hodnotu $8,41 \pm 0,68$ mg/ml.

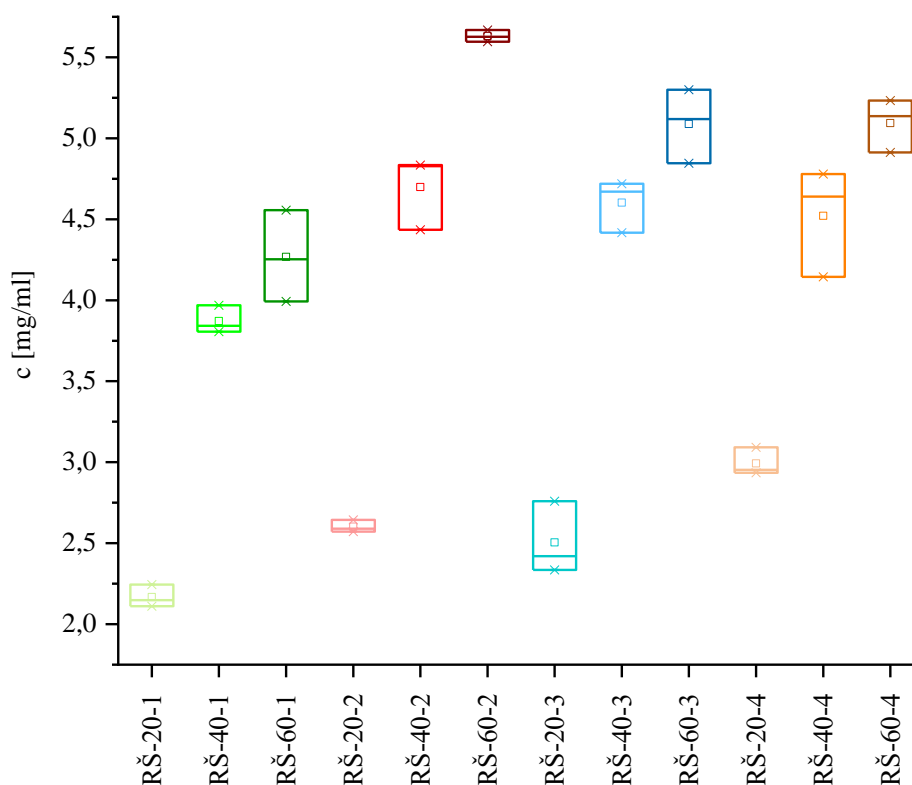
Autoři A. Czyzowska a kol. (2013) použili stejnou metodu pro stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteova činidla a jako standard taktéž použili kyselinu gallovou. V této studii stanovili touto metodou celkový obsah polyfenolů na hodnotu $9,07 \pm 0,35$ mg/ml. V porovnání s hodnotou naměřenou v této bakalářské práci se hodnoty od sebe liší velmi málo [47].

4.3 Stanovení flavonoidů

Stanovení flavonoidů bylo provedeno metodou, která je založena na reakci s dusitanem sodným a chloridem hlinitým. Metoda byla provedena ve všech 12 ethanolových extraktech z plodů růže šípkové. Opět byla tato metoda provedena spektrofotometricky. Všechny 12 vzorků bylo touto metodou proměřeno celkem třikrát a naměřené hodnoty byly zprůměrovány. Do kalibrační křivky flavonoidů (obrázek 8) byly dosazeny naměřené hodnoty absorpance a stanoveny hodnoty celkového obsahu flavonoidů v analyzovaných vzorcích. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3 a vyobrazeny v grafu (obrázek 13).

Tabulka 3: Naměřené hodnoty pro stanovení flavonoidů

vzorek	c [mg/ml]			průměr c [mg/ml]	SD [mg/ml]
	1. měření	2. měření	3. měření		
RŠ-20-1	2,15	2,25	2,11	2,11	0,07
RŠ-40-1	3,81	3,87	3,84	3,84	0,09
RŠ-60-1	4,25	3,99	3,84	4,27	0,28
RŠ-20-2	2,64	2,57	2,59	2,60	0,04
RŠ-40-2	4,83	4,43	4,82	4,70	0,23
RŠ-60-2	5,62	5,67	5,60	5,63	0,04
RŠ-20-3	2,76	2,42	2,33	2,50	0,22
RŠ-40-3	4,42	4,67	4,72	4,60	0,16
RŠ-60-3	5,12	4,85	5,30	5,09	0,23
RŠ-20-4	2,93	3,09	2,95	2,99	0,09
RŠ-40-4	4,14	4,64	4,78	4,52	0,33
RŠ-60-4	4,91	5,23	5,13	5,09	0,16



Obrázek 13: Výsledné koncentrace flavonoidů v analyzovaných vzorcích

Je všeobecně známo, že flavonoidy jsou menší podskupinou polyfenolů. Z tohoto tvrzení vyplývá, že celkový obsah flavonoidů by měl být oproti polyfenolům značně menší. Nejvyšší obsah flavonoidů byl naměřen ve vzorku RŠ-60-2. Hodnota u tohoto vzorku byla stanovena na $5,63 \pm 0,04$ mg/ml. Pokud porovnáme stanovenou hodnotu polyfenolů u vzorku RŠ-60-2 a hodnotu vzorku RŠ-60-2 u flavonoidů zjistíme, že flavonoidy splňují tvrzení, že jsou podskupinou polyfenolů. Po vytvoření statistické analýzy ANOVA v Originu bylo zjištěno, že tyto dvě hodnoty se od sebe znatelně liší. Koncentrace celkových polyfenolů u vzorku RŠ-60-2 byla stanovena na $9,00 \pm 0,49$ mg/ml. Ve studii [48] z roku 2017 je uvedeno, že na obsah polyfenolů i flavonoidů má vliv doba sklizně. Jelikož v této bakalářské práci byly šípky pro analýzu sesbírány ve dvou různých oblastech i za různého počasí, je možné, že jsou výsledky tímto faktem lehce ovlivněny.

4.4 Stanovení vitamínu C

Stanovení vitamínu C bylo provedeno pomocí dvou standardních laboratorních metod. Jedna z nich byla titrační, za použití kyseliny monohydroxyfosforečné a odměrného roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu. Celkem byly touto metodou proměřeny pouze tři vzorky. Důvodem, proč byly touto metodou proměřeny pouze tři vzorky byl ten, že nastal problém při přesném identifikování bodu ekvivalence u analyzovaných vzorků. Jelikož barva ethanolových extraktů byla světle oranžová, nebyl lehce rozpoznatelný přechod mezi oranžovou a světle růžovou barvou (obrázek 14).



Obrázek 14: Stanovení vitamínu C pomocí titrační metody, vlevo vzorek po titraci, uprostřed vzorek s pravděpodobným bodem ekvivalence, vpravo vzorek před titrací

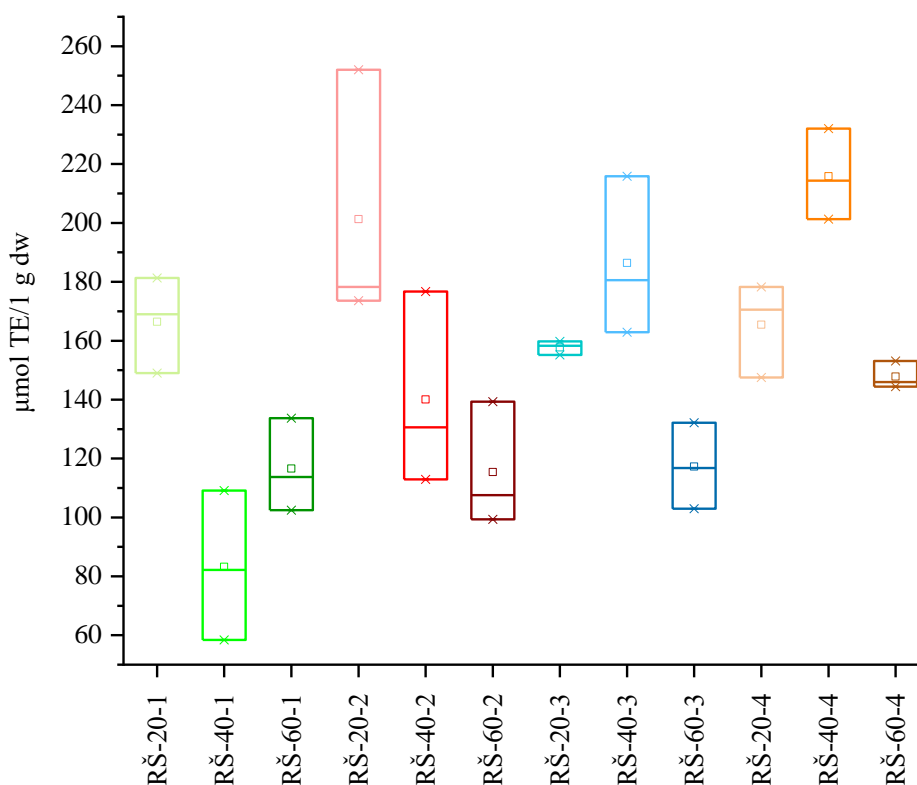
Poté byly ethanolové extrakty z růže šípkové podrobeny analýze pomocí HPLC. Avšak i tehdy nastal problém při identifikování přesného množství vitamínu C v analyzovaných vzorcích. Tato skutečnost byla způsobena z důvodu komplexnosti matrice vzorku, jelikož vzorek obsahoval velké množství sacharidů i proteinů. V analyzovaných vzorcích byla však přítomnost vitamínu C i vitamínu B prokázána. Bohužel nebylo možné určit přesný obsah těchto vitamínů z výše uvedených důvodů. Na tuto skutečnost má vliv právě počasí, jak již bylo zmíněno v kapitole stanovení sacharidů, kdy na množství sacharidů ve vzorcích měl vliv mráz. Pokud by analyzované šípky prošly prvním mrazem, snížil by se obsah sacharidů zhruba na polovinu a bylo by jednodušší vitamín C identifikovat. Mráz má ale také vliv i na obsah vitamínu C, a proto to není vhodný způsob, jak snížit obsah sacharidů v šípcích, a tak dosáhnout možného stanovení vitamínu C. Jednou z možností odstranění sacharidů ze vzorků by bylo použití extrakce pomocí SPE kolonek a následnou vícenásobnou extrakcí pročištěného vzorku polárními rozpouštědly jako je například methanol. Tento proces purifikace vzorku je však zdoluhavý a náročný a přesahoval cíle bakalářské práce. Tato bakalářská práce si neklade za cíl stanovit přesné množství vitamínu C, proto bylo od těchto metod upuštěno. Je však možné zhodnotit, že vitamín C v extraktech prokazatelně existuje.

4.5 Stanovení antioxidační aktivity

Pro celkové vyhodnocení antioxidační aktivity v analyzovaných vzorcích byla zvolena metoda zvaná ABTS, jež spočívá v reakci s peroxodisíranem draselným a získáním radikálového kationtu $ABTS^{\bullet+}$. Metoda pro stanovení antioxidační aktivity byla provedena spektrofotometricky na všech 12 ethanolových extraktech. Měření bylo pro každý vzorek provedeno celkem třikrát a vyhodnoceno v jednotkách $\mu\text{mol TE/g DW}$ (koncentrace troloxu přepočtena na roztok získaný z 1 gramu suchého šípku). Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4 a vyobrazeny v grafu (obrázek 15).

Tabulka 4: Naměřené hodnoty pro stanovení antioxidační aktivity

vzorek	c [$\mu\text{mol TE/g DW}$]			průměr c [$\mu\text{mol TE/g DW}$]	SD [$\mu\text{mol TE/g DW}$]
	1. měření	2. měření	3. měření		
RŠ-20-1	149,04	181,31	169,12	166,46	16,29
RŠ-40-1	109,09	82,20	58,39	83,23	25,37
RŠ-60-1	102,44	133,68	113,70	116,61	15,82
RŠ-20-2	178,24	251,99	173,63	201,29	43,97
RŠ-40-2	130,61	112,94	176,70	140,08	32,92
RŠ-60-2	99,36	139,31	107,56	115,41	21,10
RŠ-20-3	158,26	155,19	159,80	157,75	2,35
RŠ-40-3	180,54	162,87	215,88	186,43	26,99
RŠ-60-3	116,78	132,14	102,95	117,29	14,60
RŠ-20-4	170,56	147,51	178,24	165,43	15,99
RŠ-40-4	232,02	201,29	214,35	215,88	15,42
RŠ-60-4	145,97	144,43	153,14	147,85	4,65



Obrázek 15: Výsledné koncentrace antioxidantních vlastností v analyzovaných vzorcích

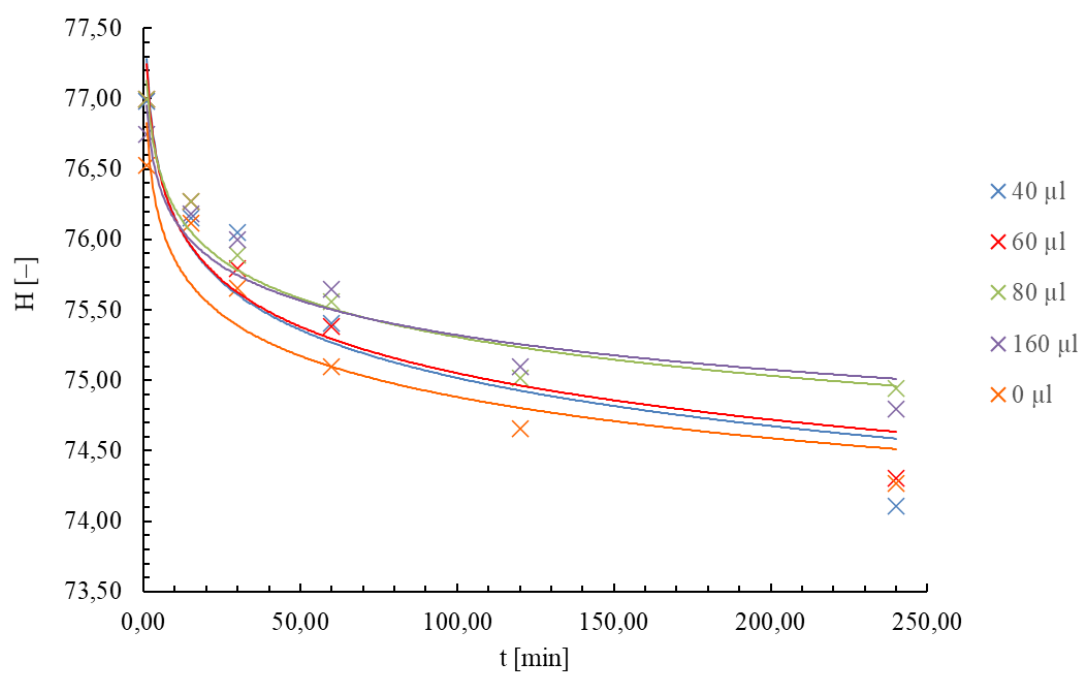
Opět byla v programu Origin vytvořena statistická analýza ANOVA. Na základě těchto výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší antioxidantní vlastnosti měl vzorek RŠ-40-4. Koncentrace antioxidantních vlastností byly naměřeny nejprve v mg/ml, poté ale byly výsledky přepočítány na $\mu\text{mol TE}/1 \text{ g dw}$. Z grafu (obrázek 15) je vidět, že větší množství šípku při kratší době louhování (1. a 2. týden) nemělo na antioxidantní aktivitu vliv. Taktéž při delší době louhování (3. a 4. týden) největší antioxidantní aktivitu vykazovaly vzorky s nižší navázkou šípků. Proto není nutné pro získání vysokých hodnot antioxidantní aktivity louhovat až 60 g šípků, jelikož by to bylo plýtvání materiálem a stačí vylouhovat pouze 40 g. Ethanolové extrakty z plodů růže šípkové prokazatelně mají antioxidantní vlastnosti. Z výše uvedených důvodů byl potom z ethanolových extraktů z růže šípkové vybrán extrakt RŠ-40-2 pro ověření jeho antioxidantního účinku na stabilizaci čerstvé ovocné šťávy.

4.6 Ověření antioxidantního účinku extraktu na stabilizaci čerstvé ovocné šťávy

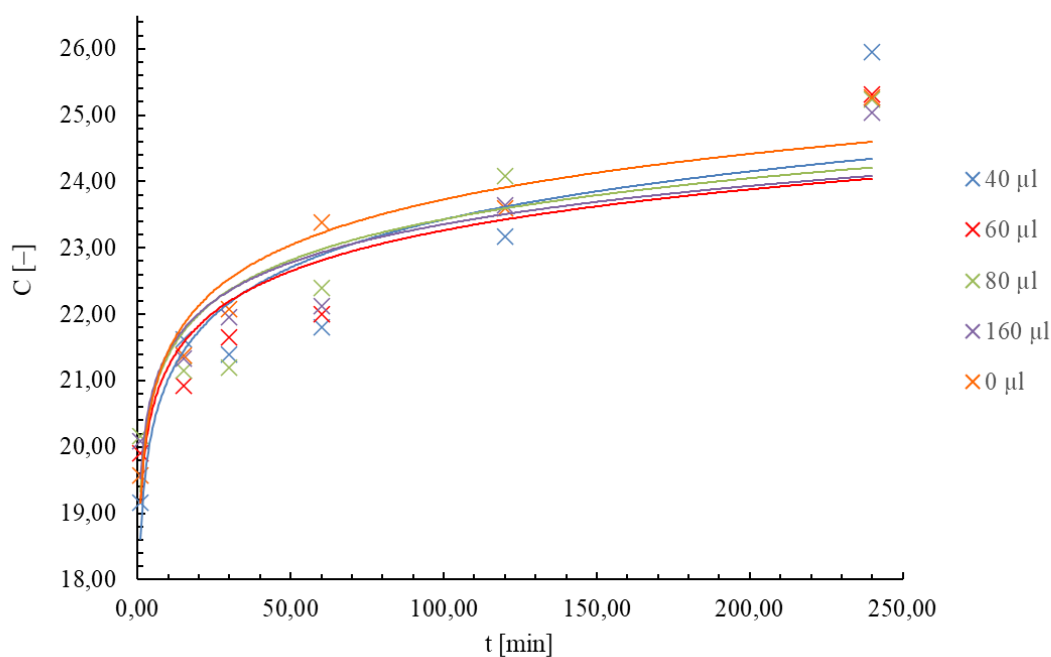
Kolorimetrické stanovení antioxidantního účinku na čerstvé ovocné šťávě z hrušky bylo analyzováno na ethanolovém extraktu RŠ-40-2. Do 1 ml čerstvé šťávy z hrušky bylo napipetováno vždy příslušné množství ethanolového extraktu. Příklady výsledků naměřených parametrů jsou uvedeny v tabulce 5. Pro kolorimetrické vyhodnocení vlivu oxidace hruškové šťávy byl vybrán parametr H (odstín barvy) a parametr C (pestrůst barvy), které jsou zobrazeny na obrázcích 16 a 17.

Tabulka 5: Naměřené parametry ve vzorcích s přidavkem 0 μl a 160 μl extraktu v čase 0 a 240 minut

čas [min]	množství extraktu [μl]	a	b	C	H	L
0	0	4,56	19,03	19,57	76,52	56,09
0	160	4,61	19,55	20,08	76,75	57,66
240	0	6,85	24,32	25,27	74,27	53,74
240	160	6,57	24,16	25,04	74,79	53,55



Obrázek 16: Závislost parametru H na čase a přidavku 0, 40, 60, 80 a 160 μl RŠ-40-2 extraktu do 1 ml hruškové šťávy



Obrázek 17: Závislost parametru C na čase a přídavku 0, 40, 60, 80 a 160 µl RŠ-40-2 extraktu do 1 ml hruškové šťávy

Z grafu (obrázek 16) je patrné, že parametr H (odstín barvy) se v závislosti na čase a závislosti na přidaném množství ethanolového extraktu RŠ-40-2 snižuje nejpomaleji, a to do koncentrace 160 µl na 1 ml čerstvé hruškové šťávy. Dále pak graf (obrázek 17) znázorňuje, že parametr C (pestitost barvy) s časem roste. Díky přídavku extraktu RŠ-40-2 je však nárůst parametru C pomalejší. Parametr H vyjadřuje pomyslný úhel (šedá část koláčového grafu na obrázku 10) a parametr C je dán vzdáleností bodu od průsečíku os. Z grafu (obrázek 16) je patrné, že parametr H exponenciálně klesá a snižuje se tedy pomyslný úhel a barva šťávy se mění ze zelenožluté na žlutohnědou. Dále pak čím blíže je parametr C k průsečíku od, tím se jedná o světlejší odstín.

Z provedených měření je zřejmé, že po přidání ethanolového extraktu došlo k inhibici oxidace čerstvé hruškové šťávy. Avšak je nutné podotknout, že studovaný efekt šípkového extraktu by bylo potřeba ještě hlouběji prostudovat pro vytvoření obecně platných závěrů např. týkajících se různých podmínek skladování čerstvých šťáv. Dále je třeba brát do úvahy, že samotný šípkový extrakt měl tmavě hnědé zbarvení (obrázek 5) a po jeho přimíchání do hruškové šťávy došlo k částečnému ztmavnutí celé směsi. Tento fakt zkomplikoval zamýšlený efekt extraktu, a to zpomalování změny barvy hruškové šťávy. Použití extraktu bylo vyhodnoceno jako potenciálně nejvhodnější do maximální koncentrace 160 µl na 1 ml hruškové šťávy. Přidáním vyššího množství šípkového extraktu, které byly také zkoušeny se jevil jeho efekt v důsledku jeho výrazného vlastního zbarvení méně patrný.

Také by bylo možné použít sofistikovanější metody na měření antioxidačního efektu připravených extraktů na čerstvou hruškovou šťávu např. pomocí metody elektronové paramagnetické rezonance (EPR).

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit množství bioaktivních látek v ethanolových extraktech z plodu růže šípkové (*Rosa canina L.*). Následně bylo za cíl vybrat jeden z těchto ethanolových extraktů pro ověření antioxidačních účinků na stabilizaci čerstvé ovocné šťávy. Ethanolové extrakty byly vytvořeny z nasbíraných plodů růže šípkové. Tyto šípkové extrakty pak byly louhovány v různém časovém rozmezí a zároveň byly naváženy do extraktů různé navážky šípků.

Konkrétně bylo v šípkových extraktech analyzováno celkové množství sacharidů, celkových polyfenolů, flavonoidů, vitamínu C a jejich antioxidační vlastnosti. Při těchto stanoveních bylo zjištěno, že nejvyšší obsah ze všech bioaktivních látek byl obsah sacharidů. Tento fakt byl způsobem tím, že šípky pro výrobu šípkových extraktů byly sesbírány na přelomu září/říjen, a tak šípky neprošly prvním mrazem. Dále byl stanoven obsah fenolických látek, kdy se potvrdilo, že flavonoidy jsou podskupinou polyfenolů. Obsah celkových polyfenolů byl v extraktech naměřen až dvakrát vyšší než obsah flavonoidů. V neposlední řadě byla prozkoumána antioxidační aktivita těchto šípkových extraktů. Antioxidační aktivita se v extraktech potvrdila a byla v rozsahu od 53,2 do 215,9 μmol troloxu/g suchého šípku.

Následně byl vybrán vzorek s nejvyšší antioxidační aktivitou pro ověření stabilizačního účinku vůči oxidaci čerstvé ovocné šťávy. Pro tuto analýzu byl vybrán vzorek RŠ-40-2, a to z důvodů nejlepších výsledků antioxidační aktivity tak i vzhledem optimalizace navážky a době louhování.

Pro ověření antioxidačních účinků na čerstvou ovocnou šťávu bylo vybráno ovoce hruška. Hrušky lehce podléhají oxidačním procesům a neenzymatickému hnědnutí. Vybraný extrakt RŠ-40-2 měl za úkol tento proces inhibovat. Spektrofotometricky bylo zjištěno, že analyzovaný vzorek inhibuje proces oxidace čerstvé hruškové šťávy.

Předložená bakalářská práce odpovídá trendu nahrazovat přísadami umělých aditiv do potravin, nebo alespoň do biopotravin pomocí přírodních látek. V tomto případě se jedná o přísadku ethanolového extraktu z plodů růže šípkové ve funkci antioxidantu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TABASZEWSKA, Małgorzata a Dorota NAJGEBAUER-LEJKO, 2020. The content of selected phytochemicals and in vitro antioxidant properties of rose hip (*Rosa canina* L.) tinctures. *NFS Journal* [online]. 21, 50-56 [cit. 2020-11-29]. ISSN 23523646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.09.003>
- [2] TURAN, Ibrahim, Selim DEMIR, Kagan KILINC, et al., 2018. Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 8(6), 394-399 [cit. 2020-11-29]. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.12.005>
- [3] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS, 1985. *Naše rostliny v lékařství*. Praha: Avicenum.
- [4] ERDELSKÁ, Olga, 2008. *Atlas léčivých rostlin. Příroda*. ISBN 978-80-07-01528-9.
- [5] ALBERTS, Andreas, 2006. *Léčivé stromy a keře*. Prostějov: Beta Dobrovský. ISBN 978-80-7306-230-9.
- [6] AL-YAFEAI, Ahlam, Angelika MALARSKI a Volker BÖHM, 2018. Characterization of carotenoids and vitamin E in *R. rugosa* and *R. canina*: Comparative analysis. *Food Chemistry* [online]. 242, 435-442 [cit. 2020-11-29]. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.070>
- [7] ILYASOĞLU, Huri, 2014. Characterization of Rosehip (*Rosa canina* L.) Seed and Seed Oil. *International Journal of Food Properties* [online]. 17(7), 1591-1598 [cit. 2020-11-29]. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.777075>
- [8] PAUNOVIĆ, Dragana, Ana KALUŠEVIĆ, Tanja PETROVIĆ, Tijana UROŠEVIĆ, Dušica DJINOVIĆ, Viktor NEDOVIĆ a Jelena POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ. Assessment of Chemical and Antioxidant Properties of Fresh and Dried Rosehip (*Rosa canina* L.) [online]. [cit. 2021-04-21]. ISSN 0255-965X. Dostupné z: <https://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/11221/8165>
- [9] RÁCLAVSKÁ, H., J. KUCHAROVÁ a D. PLACHÁ, 2008. Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd [online]. Praha [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: https://irz.cz/dokumenty/irz/metody_mereni/puda/Fenoly.pdf
- [10] MCMURRY, John, 2015. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [11] FREJ, David. Fenoly [online]. [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: <https://dr.frej.cz/zdravi/fenoly-protirakovinne-a-protizanetlive-latky>
- [12] VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK, 2008. *Biosynthesis of food components*. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-12-1.

- [13] MLADĚNKA, Přemysl, Libuše ZATLOUKALOVÁ, Tomáš FILIPSKÝ a Radomír HRDINA, 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 49(6), 963-975 [cit. 2020-11-29]. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010>
- [14] INGR, Ivo, 1999. *Základy konzervace potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7396-5.
- [15] SHARMA, Kanti Prakash, 2019. Tannin degradation by phytopathogen's tannase: A Plant's defense perspective. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 21 [cit. 2020-11-29]. ISSN 18788181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101342>
- [16] Tannins are Astringent, 2012. 1. ISSN 2278- 4136. Dostupné také z: <https://www.phytojournal.com/search/?q=tannins+are+astringent>
- [17] MOO-YOUNG, Murray, 2019. *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon. ISBN 978-0-444-64047-5.
- [18] MAX, Belén, José Manuel SALGADO, Noelia RODRÍGUEZ, Sandra CORTÉS, Attilio CONVERTI a José Manuel DOMÍNGUEZ, 2010. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 41(4), 862-875 [cit. 2020-11-29]. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005>
- [19] MARQUES, Caroline, Anne Raquel SOTILES, Fabiane Oliveira FARIAS, Grazielle OLIVEIRA, Marina Leite MITTERER-DALTOÉ a Maria Lucia MASSON, 2020. Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 41(4), 862-875 [cit. 2020-11-29]. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.10.036>
- [20] WINTER, Ruth, 2009. *A consumer's dictionary of food additives*. 7. New York: Three Rivers Press. ISBN 978-030-7452-597.
- [21] DOBIÁŠ, Doc. Ing. Jaroslav, 2004. *Technologie zpracování ovoce a zeleniny II*. Praha. Skripta. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- [22] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ, 2004. *Vitaminy*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0373-4.
- [23] MINDELL, Earl a Libuše OPLTOVÁ, 2000. *Vitaminová bible pro 21. století: vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat*. Praha: Knižní klub. ISBN 80-242-0406-1.
- [24] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin: vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.

- [25] GEORGIEVA, Silviya, George ANGELOV a Stanislava BOYADZHIEVA. Concentration of vitamin C and antioxidant activity of rosehip extracts. In: <https://dl.uctm.edu/journal> [online]. 2014 [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: <https://dl.uctm.edu/journal/node/j2014-5/ST-5.pdf>
- [26] CHEN, Yuanyuan, Lulu WANG, Fei SHANG, et al., 2019. Structural insight of the 5-(Hydroxyethyl)-methylthiazole kinase ThiM involving vitamin B1 biosynthetic pathway from the *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 518(3), 513-518 [cit. 2020-11-29]. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.086>
- [27] LI, Chuanrun, Guifang WANG, Hongyan FENG, et al., 2015. Cleaner production of Niacin using bipolar membranes electro dialysis (BMED). *Separation and Purification Technology* [online]. 156(3), 391-395 [cit. 2020-11-29]. ISSN 13835866. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.027>
- [28] MACHMUDAH, Siti, Yukari KAWAHITO, Mitsuru SASAKI, et al., 2008. Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 44(3), 308-314 [cit. 2020-11-29]. ISSN 08968446. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089684460700349X>
- [29] ŠORM, František, 1968. *Organická chemie pro 2. a 3. ročník středních všeobecně vzdělávacích škol*. Praha: SNP.
- [30] OSOJNIK ČRNIVEC, Ilja Gasan, Petra MURI, Petar DJINOVIĆ a Albin PINTAR, 2014. Biogas production from spent rose hips (*Rosa canina* L.): Fraction separation, organic loading and co-digestion with N-rich microbial biomass. *Bioresource Technology* [online]. 171, 375-383 [cit. 2020-11-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.085>
- [31] PETKOVA, Nadezhda, Manol OGNJANOV, Mihail KIRCHEV a Mihaela STANCHEVA, 2014. Bioactive compounds in water extracts prepared from rosehip-containing herbal blends: Fraction separation, organic loading and co-digestion with N-rich microbial biomass. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 171, 375-383 [cit. 2020-11-29]. ISSN 0145-8892. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.14645>
- [32] VLAICU, Alexandru P., Raluca P. TURCU, Dumitra T. PANAITTE a Mihaela STANCHEVA, 2020. Rosehip (*Rosa canina*) as a Beneficial Dietary Feed in Poultry Nutrition: Review. *Advanced Research in Life Sciences* [online]. 4(1), 11-15 [cit. 2020-11-29]. ISSN 2543-8050. Dostupné z: <https://content.sciendo.com/view/journals/arls/4/1/article-p11.xml>

- [33] VOSSSEN, Els, Mariana UTRERA, Stefaan DE SMET, David MORCUENDE a Mario ESTÉVEZ, 2012. Dog rose (*Rosa canina* L.) as a functional ingredient in porcine frankfurters without added sodium ascorbate and sodium nitrite: Review. *Meat Science* [online]. **92**(4), 451-457 [cit. 2020-11-29]. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917401200174X>
- [34] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ, 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0586-2.
- [35] Laboratorní cvičení z analytické chemie pro 3. a 4. ročník, 2010. In: [Http://studenti.podskalska.cz/](http://studenti.podskalska.cz/) [online]. Praha [cit. 2021-02-25]. Dostupné z: <http://studenti.podskalska.cz/eucebnice/labcvzach3.pdf>
- [36] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC, 2014. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [37] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH, 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [38] HRABĚ, Jan, František BUŇKA a Ignác HOZA, 2007. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: pro kombinované studium*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-520-6.
- [39] KADLEC, Pavel, 2002. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0510-2.
- [40] MEDINA, Marjorie B., 2011. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **59**(5), 1565-1571 [cit. 2021-02-28]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf103711c>
- [41] AL-FARSI, Mohamed, Abeer AL-AMRI, Ahlam AL-HADHRAMI a Sharifa AL-BELUSHI, 2018. Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. *Heliyon*. **4**(10). ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00874
- [42] DAVÍDEK, Jiří, 1981. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd. Praha: SNTL.
- [43] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **26**(9-10), 1231-1237 [cit. 2021-02-28]. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>
- [44] PANÁK, Ondřej. Měření barevnosti. In: [Https://www.upce.cz/](https://www.upce.cz/) [online]. Pardubice [cit. 2021-7-15]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/kpf/studenti-kpf/merenibarevnosti.pdf

- [45] DELGADO-GONZÁLEZ, M. J., Y. CARMONA-JIMÉNEZ, M. C. RODRÍGUEZ-DODERO a M. V. GARCÍA-MORENO, 2018. Color Space Mathematical Modeling Using Microsoft Excel. *Journal of Chemical Education* [online]. **95**(10), 1885-1889 [cit. 2021-7-15]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jchemed.7b00681>
- [46] CUNJA, Vlasta, Maja MIKULIC-PETKOVSEK, Anka ZUPAN, Franci STAMPAR a Valentina SCHMITZER, 2015. Frost decreases content of sugars, ascorbic acid and some quercetin glycosides but stimulates selected carotenes in *Rosa canina* hips. *Journal of Plant Physiology* [online]. **178**, 55-63 [cit. 2021-7-19]. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25768262/>
- [47] CZYZOWSKA, A., E. KLEWICKA, E. POGORZELSKI a A. NOWAK, 2015. Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* Thunb. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. **39**, 62-68 [cit. 2021-7-22]. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.009>
- [48] ELMASTAŞ, Mahfuz, Ayşe DEMİR, Nusret GENÇ, Ümit DÖLEK a Mehmet GÜNEŞ, 2017. Changes in flavonoid and phenolic acid contents in some *Rosa* species during ripening. *Food Chemistry* [online]. **235**, 154-159 [cit. 2021-7-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617307793>

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- HPLC: Vysokoučinná kapalinová chromatografie
- UV: Ultrafialové záření
- ABTS: 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
- Trolox: (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
- TE: (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
- SD: směrodatná odchylka
- DW: dry weight
- SPE: extrakce na tuhou fázi

7 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 6: Označení jednotlivých vzorků

vzorek	produkt	navážka [g]	doba extrakce
RŠ-20-1	plod růže šípkové	20	1 týden
RŠ-40-1	plod růže šípkové	40	1 týden
RŠ-60-1	plod růže šípkové	60	1 týden
RŠ-20-2	plod růže šípkové	20	2 týdny
RŠ-40-2	plod růže šípkové	40	2 týdny
RŠ-60-2	plod růže šípkové	60	2 týdny
RŠ-20-3	plod růže šípkové	20	3 týdny
RŠ-40-3	plod růže šípkové	40	3 týdny
RŠ-60-3	plod růže šípkové	60	3 týdny
RŠ-20-4	plod růže šípkové	20	4 týdny
RŠ-40-4	plod růže šípkové	40	4 týdny
RŠ-60-4	plod růže šípkové	60	4 týdny