

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognosie

Diplomová práce

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakognosie

Diplomová práce

Antioxidační vlastnosti extraktů z květů
Sambucus nigra

Vypracovala: Zuzana Štěpánová
Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.
Oponent: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré literární zdroje jsem řádně citovala a uvedla v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při vypracovávání této práce.

V Hradci Králové

5. 5. 2013

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	3
3. Teoretická část.....	4
3.1. Sambucus nigra	4
3.1.1. Taxonomické zařazení	4
3.1.2. Charakteristika rodu <i>Sambucus</i>	4
3.1.3. <i>Sambucus nigra</i> L.....	5
3.1.4. Sambuci flos	6
3.1.5. Obsahové látky květů	7
3.1.5.1. Flavonoidy	7
3.1.5.2. Hydroxyskořicové kyseliny	8
3.1.5.3. Triterpeny.....	8
3.1.5.4. Steroly.....	9
3.1.5.5. Silice.....	9
3.1.5.6. Další látky	9
3.1.6. Obsahové látky ostatních částí rostliny	10
3.1.7. Využití květů bezu černého	11
3.1.7.1. Lidové léčitelství.....	11
3.1.7.2. Současné využití	12
3.1.8. Farmakologické studie	12
3.2. Volné radikály a antioxidanty v lidském těle	15
3.2.1. Reaktivní formy vznikající v organismu	15
3.2.1.1. ROS – reaktivní formy kyslíku	16
3.2.1.2. RNS – reaktivní formy dusíku	18
3.2.2. Příznivé účinky a funkce volných radikálů	19
3.2.3. Patologické vlivy a poškození volnými radikály.....	20
3.2.4. Antiradikálové působení	21
3.2.4.1. Systémy zabraňující tvorbě	21
3.2.4.2. Antioxidační systémy	21
3.2.5. Metody stanovení antioxidační aktivity <i>in vitro</i>	22
3.2.5.1. Metoda TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity	22

3.2.5.2.	Metoda používající DPPH.....	23
3.2.5.3.	Metoda ORAC – Oxygen radical absorbance capacity	23
3.2.5.4.	Metoda FRAP – Ferric reducing antioxidant potencial	23
3.2.5.5.	Metoda PCL – Photochemiluminescent	24
4.	Experimentální část.....	25
4.1.	Chemikálie a přístroje.....	25
4.2.	Rostlinný materiál.....	25
4.3.	Stanovení antiradikálové aktivity	26
4.4.	Výsledky	28
4.4.1.	Tabulky.....	28
4.4.2.	Grafy.....	41
5.	Diskuze.....	45
6.	Závěr.....	47
7.	Literatura	48
8.	Abstrakt.....	52
9.	Abstract	53

1. Úvod

Kořeny fytoterapie sahají až na samý počátek lidstva. Oproti minulosti její uplatnění mírně upadlo s nástupem syntetických léčiv. Rostlinná terapie je však stále nedílnou součástí léčebných procedur bezpočtu neduhů a chorob. Podkladem pro dnešní využití jsou zkušenosti a tradice lidového léčitelství předávané z generace na generaci. Poznatky lidového léčitelství se staly podnětem pro nesčetné výzkumy hodnotící skutečný vliv rostlin na organismus a původ těchto účinků skrze výčet a charakterizaci jednotlivých obsahových látek.

Jednou z rostlin přírodního lidového léčitelství je i Bez černý. Jeho účinků bylo využíváno zejména při nemocech z nachlazení, chřipkách, zánětech dutin, nebo při bolestech a neuralgiích. Dnešní výzkumy jsou zaměřeny převážně na jeho antioxidační aktivitu a obsah flavonoidů. Flavonoidy jsou považovány za nejvýznamnější látky obsažené v bezu černém a jsou zřejmě zodpovědné za většinu jeho biologických účinků. Jsou také známé svým účinkem proti negativnímu působení volných radikálů.

Problematika radikálů je v současnosti hojně studována. Ačkoliv mají v lidském organismu nezastupitelný fyziologický účinek při mnoha elementárních dějích, jejich nadprodukce může působit velmi nepříznivě. Volné radikály se podílejí na vzniku a rozvoji četných onemocnění a chorobných stavů. Někdy mohou přímo vznik onemocnění vyvolávat, jindy zhoršují či komplikují jeho průběh. Mezi onemocnění, v jejichž etiopatogenezi hrají radikály důležitou úlohu, patří ateroskleróza, diabetes mellitus, zhoubné novotvary, syndrom ischemie-reperfuze, selhání ledvin, neurologické onemocnění, oční choroby, onemocnění trávicího traktu a plic a také zánětlivé procesy.

(46)

Volné radikály v těle vznikají řadou exogenních a endogenních vlivů. K těmto procesům dochází v dnešní době stále častěji díky znečištěnému ovzduší a škodlivým látkám v nápojích a potravinách, ale i díky nesprávnému životnímu stylu většiny obyvatelstva. Lidský organismus se proto nalézá častěji pod vlivem oxidačního stresu, který může vést až k závažnému poškození. Z tohoto důvodu se odborníci z oblasti biochemie a klinické medicíny zabývají zejména ochranou před oxidačním stresem, vhodností a účinností antioxidační terapie v medicínské praxi.

Díky tomu, že flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny obsažené v bezu černém vykazují antioxidační vlastnosti, může jeho konzumace pozitivně působit na zdravotní stav jedince a předcházet některým chorobám.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo prokázat a stanovit antioxidační aktivitu extraktů květů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) pocházejících ze sběrů ve volné přírodě a sestavit přehled jeho hlavních obsahových látek a účinků.

3. Teoretická část

3.1. *Sambucus nigra*

3.1.1. Taxonomické zařazení

Říše:	Plantae
Podříše:	Tracheobionta
Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Asteridae
Řád:	Dipsacales
Čeleď:	Sambucaceae (6) Adoxaceae (7)
Rod:	<i>Sambucus</i>
Druh:	<i>Sambucus nigra</i>

(6)

3.1.2. Charakteristika rodu *Sambucus*

Rod *Sambucus* L. – bez zahrnuje přibližně 40 druhů. Jedná se o opadavé keře, popřípadě stromy nebo vytrvalé byliny s bohatým mělkým zpravidla do velké plochy rozloženým kořenovým systémem nebo podzemními výběžky. Větve jsou většinou silné s nápadně vytvořenými lenticelami a s bohatě vytvořenou dřevinou. Listy vstřícné, lichospeřené, řapíkaté, palistnaté nebo s palisty přeměněnými v nektáριοvé útvary; popřípadě palisty chybí. Květenství koncová, nejčastěji 3-5 ramenné ploché vrcholíky nebo vrcholičnaté laty. Květy malé, bílé, žlutavé až zelenavě bílé, kalich i koruna krátce trubkovité, většinou 5 cípé, tyčinky se žlutými nebo fialově nachovými prašníky vyčnívajícimi z koruny. Plod je dužnatá, kulovitá, černé nebo červená peckovice, zpravidla s 5 peckami. Plodenství přímá nebo nicí. (1)

3.1.3. *Sambucus nigra* L.

Bez černý je keř nebo malý strom dosahující výšky až 10 m. Borka šedohnědá, korkovitá, s hojnými lenticelami a bílou porézni dřevní („bezová duše“). Větve od báze větvené, obloukem vystoupavé. (2) V mládí jsou lysé nebo roztroušeně krátce chlupaté, zelenavé až šedozeleň s početnými tmavými, podlouhlými lenticelami, starší větve jsou šedozeleň až šedohnědá s nepravidelně rozbrázděnou borkou. Pupeny vejcovité se zelenými až červenohnědými šupinami kryjící pupeny jen v dolní polovině; mladé listy na vrcholu pupenu vyčnívají a často jsou na jaře poškozovány mrazem. (1) Lístky ve 2-3 jařmech, nejčastěji kopinaté nebo vejčité eliptické, na bázi celokrajné, ostnatě nestejně pilovité, náhle zašpičatělé. (2) Na svrchní straně jsou lístky olysalé až lysé, tmavozelené, na spodní straně sivozelené až šedavé, roztroušeně jemně chlupaté, především na žilkách. Po rozedmutí nepříjemně páchnou. (1) Květenství chocholičnaté, ploché, 10-25 cm v průměru („kosmatice“), s 5 hlavními paprsky. Květy vonné, koruna bílá nebo slabě nažloutlá, v průměru 6-9 mm, prašníky bledě žluté. Plodenství nicí, plodové stopky červeně fialové, peckovice kulovité, červené až tmavě červenofialové, se třemi peckami. (2)

Bez je hojně rozšířen po celé české republice, kromě nejvyšších horských poloh. Vyskytuje se na lesních okrajích, světlinách a pasekách, křovinatých porostech, ve světlých listnatých a lužních lesích, podél komunikací, v obcích a sídlištích, podél zdí a plotů, na zbořeništích a skládkách, zahradách, podél potoků a řek, u sloupů elektrického vedení, rumišťích a podobně; především na vlhkých, humózních, dusíkem bohatých, hlubokých půdách. Semena jsou roznášena na nejrůznější stanoviště. Roste ve společenstvech svazů *Prunion spinosae*, *Sambuco-Salicion capreae* (zejm. v komplexu společenstev *Sambucetum nigrae*), dále ve společenstvech třídy *Robinietae* a řádu *Fagetalia sylvaticae*. (1) Protože jsou plody atraktivní pro ptáky, semena se často šíří jejich pomocí, přičemž distribuce semen výrazně klesá se vzrůstající vzdáleností od keře. (3)

Z hlediska morfologických znaků se může vyskytnout u druhu určitá variabilita. Projevuje se především ve tvaru, velikosti a zbarvení listů. Lístky mohou být nápadně úzké až naopak velmi široké, vzácněji ještě dále členěné nebo i různě panašované. Proměnlivost se může projevit i na květech. Nejčastěji jsou bílé, mnohdy se však vyskytují celé populace s květy mírně nažloutlými. Velikost květenství se také může lišit, na jednom keři mohou být květenství velká hustá, jindy menší řidší. Podobně je to

i s velikostí semen. Většina těchto odchylek je stálá na jednom jedinci, někdy se vyskytují uvedené odchylky i v celých populacích. Taxonomická hodnota těchto odlišností je však pravděpodobně nízká.

Na území České republiky se vyskytují i jiní zástupci tohoto rodu, zejména *Sambucus ebulus* – Bez chebdí a *Sambucus racemosa* – Bez červený. Nejvýznamnější a nejužívanější je však *Sambucus nigra*, pro jeho rozmanité použití v potravinářství i farmacii a medicíně. (4)

3.1.4. Sambuci flos

Bez černý je rostlinou hojně využívanou v lidovém léčitelství i současné přírodní medicíně. Pro terapeutické účely se používá zejména plod a květ, přičemž květenství poskytuje surovinu pro lékopisnou drogu *Sambuci nigrae flos*. Jedná se o květy o průměru asi 5 mm se třemi malými čočkovitými listeny, které mohou mít stopku; kalich je malý, s pěti ušty; koruna je světle žlutá s pěti široce oválnými korunními lístky na bázi srostlými. Nitky pěti světle žlutých tyčinek se střídají s korunními lístky. Koruna se vyskytuje často samostatně nebo spolu s tyčinkami, které jsou k bázi koruny přirostlé. Semeník je spodní, trojpouzdrý, s přisedlou trojlaločnou bliznou.

Upráškováná droga má zelenožlutou barvu a je charakteristická četnými kulovitými, někdy oválnými pylovými zrny o průměru asi 30 µm, se třemi klíčními póry a velmi jemně tečkovanou exinou; pokožkou kalicha s buňkami s rýhovanou kutikulou, a občasnými jednobuněčnými, okrajovými zoubky bazální oblasti; úlomky koruny s četnými malými kapkami silice; buňkami pokožky se stěnami zprohýbanými, na svrchní straně slabě ztlustlými, s růžencovými stěnami a rýhovanou kutikulou; v mezofylu koruny a kalicha jsou idioblasty obsahující četné pískovité krystaly šřavelanu vápenatého. Tyto znaky lze pozorovat pod mikroskopem v chloralhydrátu RS. (5)

Dle Českého lékopisu 2009 se jako zkoušky totožnosti používá právě makroskopické a mikroskopické vyšetření drogy, společně s tenkovrstvou chromatografií, která umožňuje detekci obsahových látek. Ve zkouškách na čistotu se stanovuje obsah cizích příměsí, který má být nejvýše 8% úlomků květních stopek a jiných cizích příměsí, a nejvýše 15% zhnědlých květů. Ztráta sušením je požadována nejvýše 10% při sušení 1,000 g upráškováné drogy po dobu 2 hodin v sušárně při

105°C. Množství celkového popelu se požaduje nejvýše 10%. Droga má obsahovat minimálně 0,80% flavonoidů, vyjádřeno jako isokvercitosid, počítáno na vysušenou drogu. Stanovení obsahu se provádí za pomoci spektrofotometrie při 425 nm.(5)

3.1.5. Obsahové látky květů

V celé rostlině se vyskytuje velké množství látek, přičemž řada z nich má významný vliv na lidský organismus. Mezi nejdůležitější obsahové látky květu patří zejména flavonoidy; dále jsou v květech obsaženy triterpeny, steroly, fenolické kyseliny, sliz, silice, třísloviny a látky s fytoncidním účinkem. (8) Charakteristická je pro květy také výrazná vůně, za kterou jsou zodpovědné těkavé aromatické látky. (9)

3.1.5.1. Flavonoidy

Mezi hlavní charakteristické sloučeniny obsažené v květech patří zejména flavonoidy. Jedná se o sekundární metabolity, jejichž strukturním základem je fenylypropanové jádro sestávající ze dvou aromatických kruhů spojených tříuhlíkatým řetězcem. Nejčastěji se vyskytují jako glykosidy. (11, 12) Mezi hlavní skupiny flavonoidů patří flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, isoflavony, dihydroflavonoly, anthokyaniny, a chalkony. (13)

Český lékopis požaduje obsah flavonoidů v droze Sambuci flos nejméně 0,8 %; jejich obsah je ale často mnohem vyšší, až 3,5%. (10) Ze zástupců zde můžeme nalézt kaempferol, astragalin (kempferol-3-O-glukosid), kvercetin, rutin (kvercetin-3-O-rutinosid), isoquercitrin (kvercetin-3-O-glukosid), hyperosid (quercetin-3-O-galaktosid). (8) Dále isorhamnetin-3-O-rutinosid a isorhamnetin-3-O-glukosid. (10). Také byla zjištěna přítomnost kempferol-3-O-rutinosidu v květech bezu černého volně rostoucího v Portugalsku. (14)

Nejvýznamnějším flavonoidem je rutin, jehož obsah dosahuje až 2,5%. (10) Spolu s jeho aglykonem kvercetinem je jedním z nejstudovanějších flavonoidů. Rutin má v medicíně uplatnění hlavně díky schopnosti snižovat fragilitu kapilár a jejich permeabilitu. Zkoumány jsou jeho možné antioxidační, antivirové, protinádorové, protizánětlivé a antiagregační účinky. Diskutován je jeho pozitivní efekt při léčbě onemocnění srdce, nebo při prevenci cytotoxicity a peroxidace lipidů, které jsou

indukovány volnými radikály a jsou spojeny s buněčným stárnutím a řadou chronických onemocnění. (15)

3.1.5.2. Hydroxyskořicové kyseliny

Jedná se o polyfenolické látky, které jsou v rostlinné říši hojně rozšířeny a často se nalézají ve formě esterů. (11) V květech bezu černého se nachází zejména kyseliny chlorogenová, ferulová, kávová, p-kumarová a jejich estery s β -glukózou. Celkový obsah těchto látek se pohybuje okolo 5%. (10) Podle některých studií vykazují hydroxyskořicové kyseliny a jejich deriváty silné antioxidační a protizánětlivé účinky. (16,17)

3.1.5.3. Triterpeny

Jako další sekundární metabolity jsou v květech zastoupeny triterpeny. Jejich obsah činí přibližně 1 % a jedná se zejména o triterpenické alkoholy a triterpenické kyseliny. (10) Pentacyklické triterpenické alkoholy α - a β -amyrin nalézající se v květech této rostliny jsou známé pro své výrazné protizánětlivé účinky. (18) Podle některých studií vykazují tyto alkoholy také příznivý vliv na neuropatickou, chronickou a zánětlivou bolest. Předpokládá se, že tento účinek je zapříčiněn přímou aktivací cannabinoidních receptorů CB_1 a CB_2 nebo jejich nepřímým ovlivněním prostřednictvím inhibice degradace endocannabinoidu 2-AG. Po orálním podání α,β -amyrinu dochází ke značnému snížení zánětu a persistující neuropatické bolesti u myší. (19,20) Také triterpenické kyseliny vykazují jisté farmakologické účinky. V květech bezu se vyskytuje kyselina ursolová, oleanolová a 20- β -hydroxyursolová. (10) Výzkumy ukázaly, že tyto kyseliny mohou vykazovat hepatoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační a protinádorové účinky a mohou snižovat hladiny krevních lipidů. (21) Některé laboratorní studie však odhalily, že efekt ursolové kyseliny na normální buňky a tkáň může být někdy i prozánětlivý. (22)

3.1.5.4. Steroly

Rostlinné steroly jsou esenciální složkou membrán všech eukaryotických organismů. Jejich pomocí je zajišťována proměnlivost a propustnost membrán, některé mají specifické funkce při přenosu signálů. (23) Tyto látky jsou také v malém množství obsaženy v květech bezu (okolo 1 %). Jedná se zejména o β -sitosterol, campesterol a stigmasterol. (8) Jejich hlavním farmakologickým efektem je schopnost snižovat hladinu cholesterolu inhibicí jeho vstřebávání. Ačkoli dochází ke kompenzační stimulaci syntézy cholesterolu, výsledným efektem je snížení sérových hladin cholesterolu. (23) Mohou mít také příznivý vliv na krevní tlak a spolu s účinkem na krevní lipidy mohou pozitivně ovlivnit důležité rizikové faktory kardiovaskulárního onemocnění. (24)

3.1.5.5. Silice

Květy bezu jsou známé svou výraznou vůní. Obsah silice v květech dosahuje až 0,15 %. Skládá se z volných mastných kyselin, n-alkanů C_{14} - C_{31} a monoterpenů. Dohromady obsahuje přibližně 60 složek. (10) Na charakteristické bezové vůni se podílejí zejména cis-rose oxid, nerol oxid, hotrienol a nonalol, ke květinovým tónům přispívají linalool, α -terpineol, 4-methyl-3-penten-2-on a (Z)- β -ocimen, ovocná vůně je spojena s obsahem pentanal, heptanal a β -damascenonu, zatímco svěží trávová vůně je způsobena hexanalem, hexanolem a (Z)-3-hexenolem. (9)

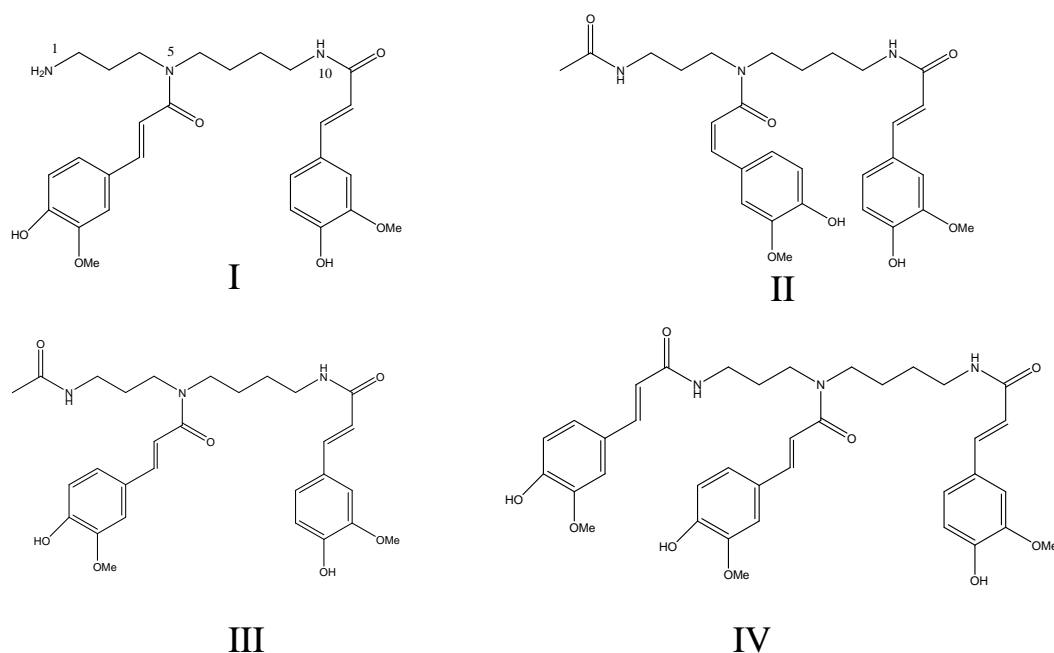
3.1.5.6. Další látky

V malém množství se v květech vyskytuje také kyanogenní glykosid sambunigrin (mandelonitril- β -glukosid). (10) Kyanogenní glykosidy jsou obecně látky složeny z aglykonu α -hydroxynitrilového typu a cukerné části (nejčastěji D-glukosy). Hydrolytickou reakcí se z těchto molekul může uvolňovat toxická kyselina kyanovodíková. (3, 25)

Některé buňky koruny a kalicha obsahují písek šřavelanu vápenatého. Jeho obsah se může pohybovat kolem 4 – 12 %. (5, 10)

V květních extraktech byla objevena přítomnost řady acyl spermidinů. Jejich hlavním zdrojem jsou pylová zrna. Nejvíce zastoupeny jsou izomery N,N-

diferuloylspermidinu a N-acetyl-N,N-diferuloylspermidinu. (7) Z chemického hlediska jsou spermidiny triaminové polykationty, které se vyskytují velmi hojně ve všech organismech a mají funkce v mnoha biologických procesech. Vznikají konverzí putrescinu a dále se přeměňují na spermin. (26) U květů jsou důležitou součástí jejich vývoje a reprodukce. Zřejmě hrají také roli jako obranné sloučeniny proti virům, bakteriím a houbám. Spermidinové amidy vykazují strukturální podobnost s určitými pavoučími a vosími jedy a mohly by tímto odrazovat hmyz od požívání rostliny. Nicméně se jejich toxicita po požití hmyzem zdá být relativně nízká. (7)



Obr 1.: Struktury izolovaných acyl spermidinů z květů bezu černého – N^5,N^{10} -di-(E,E)-feruloylspermidin (I), N^1 -acetyl- N^5,N^{10} -di-(Z,E)-feruloylspermidin (II), N^1 -acetyl- N^5,N^{10} -di-(E,E)-feruloylspermidin (III), N^1,N^5,N^{10} -tri-(E,E,E)-feruloylspermidin (IV) (7)

3.1.6. Obsahové látky ostatních částí rostliny

Bezové plody („bezinky“) obsahují velké množství flavonoidů (kvercetin, rutin), antokyanů (glykosidy kyanidinu), vitamínů (C, A), cukrů (fruktóza, glukóza) a organických kyselin (citronová, jablečná, shikimová, fumarová). (27) Dále se v plodech vyskytují lektiny a kyanogenní glykosid sambunigrin. (28)

Kůra této rostliny obsahuje především lektiny (SNA I, SNA II) a ribosom-inaktivující proteiny (nigrin-b), dále triterpeny (methylester kyseliny ursolové, betulin, α -amyrin, β -sitosterol). (3, 29)

Listy obsahují také velké množství flavonoidů (rutin, isoquercitrin, astragalín), kyanogenní glykosidy a fytoncidní látky. (3)

3.1.7. Využití květů bezu černého

Bez černý byl po generace významnou rostlinou lidového léčitelství. V historii byly k léčebným i jiným účelům používány listy, kůra, kořeny, květy a plody. (28) V dnešní době se používají květy a plody, a to pro nejrůznější účely, včetně farmaceutických, potravinářských a terapeutických.

Pro získání květů se sbírají celá květenství na počátku kvetení za suchého, slunného počasí. Suší se nejlépe ve stínu. Po usušení se květy oddělí od květenství spolu se stopkami. Sušená droga má nažloutlou barvu a silný charakteristický pach, chuť zprvu nasládlé slizovitou, později škrábavě hořkou. Příměsí tlustých stopek a zahnělých květů jsou na závadu. Lékopis proto požaduje obsah nejvýše 15 % zhnělých květů a nejvýše 8 % úlomků květních stopek. (8, 30)

3.1.7.1. Lidové léčitelství

Bez černý je významnou rostlinou s hlubokou tradicí nejen v Evropě. Uplatňoval se jako léčivá rostlina i jako součást pokrmů. Téměř každá jeho část byla v historii používána pro nějaký účel. (7)

Z historie je známé tradiční používání čajových nálevů pro jejich diaforetické, expektorační, diuretické a protizánětlivé účinky. Uplatnění nacházely při léčbě horečky a zimnice, jako expektorans při léčbě mírných zánětů horních cest dýchacích, pro symptomatickou léčbu chřipky a nemocí z nachlazení. (8) V lidové medicíně se droga používala také pro účinky slabě uklidňující a antineuralgické při bolestech zubů, zad, hlavy, revmatismu a nespavosti. Podle lidového léčitelství má také příznivý vliv na zažívací systém. Lze ji využít proti nadýmání, křečím trávicího traktu a také při zácpě nebo průjmeh. Díky protizánětlivým účinkům se odvar doporučoval k vyplachování očí při zánětu spojivek, jako kloktadlo při zánětu mandlí, dásní a nosohltanu, nebo jako

obklad při spáleninách. (8, 30, 31) Některé z těchto účinků jsou využívány i v současné fytoterapii.

3.1.7.2. Současné využití

Použití květů bezu černého v dnešní době navazuje na jejich tradiční používání v lidovém léčitelství. Květy se používají samostatně nebo jako součást čajových směsí. Jako močopudný prostředek při onemocnění močových cest jsou součástí Species urologicae a čajové směsi Leros Urcyston, na podporu pocení a vykašlávání při nachlazení se nachází například v čajové směsi Pulmoran a v mnoha dalších. Dále jsou používány také jako korigens chuti a vůně. Květy jsou používány i pro výrobu sirupů, které jsou taktéž používány při nachlazení a kašli.

Extrakty z květů jsou součástí přípravků vhodných k léčbě rýmy, zánětů dutin nebo kašle, například v přípravku Sinupret (Bionorica, Německo), Nasivin sinus (Merck, Německo) nebo Biotussil (Biomedica, Česká republika). Jeho potenciální uklidňující a uvolňující účinky jsou využity v přípravku Novo-passit (Teva Pharmaceuticals, Česká republika).

3.1.8. Farmakologické studie

Výzkumy zabývající se biologickými efekty květů a jejich extraktů jsou jen ojedinělé. Z větší části se studie zabývají spíše účinky jednotlivých obsahových látek, zejména flavonoidů. Vzhledem k tomu, že flavonoidy jsou z hlediska účinků nejvýznamnější látkou obsaženou v květech bezu černého, uvádím zde alespoň krátký přehled jejich potencionálních efektů zjištěných v experimentech prováděných *in vitro* a *in vivo*. Nejvíce studované jsou jejich antioxidační vlastnosti. Dále bylo při analýzách odhaleno jejich možné protirakovinné, protizánětlivé, antiagregační, antiischemické, protialergenní působení a ochrana před peroxidací lipoproteinů. Jsou uváděny také zprávy o schopnosti flavonoidů inhibovat aktivitu celé řady enzymů včetně lipooxygenázy, cyklooxygenázy, monooxygenázy, xanthin-oxidázy, mitochondriální sukcinoxidázy, NADH-oxidázy, fosfolipázy A₂ a protein kinázy. (32) Výzkumy však také ukazují, že flavonoidy v některých případech vykazují i pro-oxidační účinky. (33, 34) Tyto účinky mohou přispívat k celkovému působení květů a jejich extraktů.

Literatura uvádí různé experimentální studie popisující vlastnosti a vlivy květů bezu černého a jejich extraktů. Protizánětlivá aktivita byla hodnocena za použití 80 % ethanolového extraktu u potkanů. Bylo zjištěno mírné protizánětlivé působení – došlo ke zmírnění edému vyvolaného podáním karrageenanu o 27 %, kontrolní látka indometacin snížila edém o 45 %. (35) Jiná studie ukázala schopnost inhibice biosyntézy zánětlivých cytokinů IL-1 α , IL-1 β a TNF- α na lidských buněčných kulturách *in vitro* za použití 100 % methanolového extraktu. (36)

Květy bezu vykazují také diuretickou aktivitu. Diuretický efekt byl u potkanů hodnocen po podání extraktu rozpuštěného v hypotonickém solném roztoku v jednotlivých dávkách 50 mg/ kg tělesné váhy zvířete. Byl zjištěn výrazný diuretický efekt, téměř srovnatelný s porovnávací látkou hydrochlorothiazidem. (37) Studie používající jako porovnávací látku theofylin ukázala, že intragastrické podání nálevu z květů bezu černého (20 ml/kg tělesné váhy) nebo jejich extraktu vykazuje u potkanů vyšší diuretický efekt než theofylin (5 mg/kg tělesné váhy). (8)

U zdravých dobrovolníků byly sledovány diaforetické účinky. Analýza ukázala, že květ bezu je schopný zvýšit odpověď potních žláz na tepelný podnět a zvýšit produkci potu. (8)

Použití květů bezu černého v lidovém léčitelství při diabetu se stalo předlohou dalších studií. Ty ukázaly, že vodné extrakty jsou schopné přímé stimulace sekrece insulinu a vykazují účinky na metabolismus cukrů jemu podobné (zkoumáno na tkáňových kulturách). (38) Extrakt z květů zvyšuje vychytávání glukózy a její oxidaci a také glykogenezi. (28) Další pokusy na tkáňových kulturách odhalily schopnost extraktů aktivovat jaderné receptory PPAR α , δ , γ bez stimulace diferenciací adipocytů. Ukázalo se, že zřejmě obsahují sloučeniny vykazující biologickou aktivitu jako parciální agonisté PPAR γ a tím zvyšují insulinem stimulované vychytávání glukózy. (38, 39)

Příznivé účinky extraktů byly také zkoumány při redukci nadváhy. Dobrovolným účastníkům, kteří chtěli snížit svou tělesnou hmotnost, byly podávány přípravky obsahující extrakty a šťávy z květů bezu černého. Pravidelně byl sledován jejich krevní tlak a také se hodnotila jejich fyzická a psychická kvalita života. Výsledky ukazují, že došlo ke snížení jejich BMI a krevního tlaku a zároveň ke zlepšení jejich duševní pohody. (40)

Droga je považována za bezpečnou, z literatury nejsou známy žádné informace o toxických nebo nežádoucích účincích. Protože však nejsou k dispozici žádné informace týkající se drogy a lékových interakcí; karcinogenních, mutagenních a teratogenních účinků v těhotenství a u kojících matek, je doporučeno používat květ bezu černého po poradě s lékařem. (8)

3.2. Volné radikály a antioxidanty v lidském těle

V lidském organismu se odehrává řada složitých oxido-redukčních dějů. Pro lidský organismus jsou tyto děje a jejich následky nedílnou součástí mnoha životně důležitých pochodů. Při oxido-redukčních reakcích obecně dochází k přenosu elektronů mezi dvěma molekulami, přičemž jedna elektron přijímá (oxiduje se) a druhá elektron odevzdává (čímž se redukuje). Tento transfer elektronů může být jednou z příčin vzniku volných radikálů. (11) Radikály mají v organismu důležitou roli při uvolňování a přeměně energie, jsou součástí enzymových mechanismů a některé hrají roli jako signální molekuly v buněčném informačním systému. (41) Pokud však dojde k porušení rovnováhy mezi produkcí volných radikálů a schopností antioxidantních obranných mechanismů odstranit reaktivní meziprodukty, nazývá se takovýto stav oxidačním stresem. (42) Nekontrolovaná nadměrná produkce reaktivních sloučenin může vést k poškození všech buněčných složek, včetně proteinů, lipidů, nukleových kyselin a může stát na počátku mnoha onemocnění a předčasného buněčného stárnutí. Závažnější oxidativní působení může vyvolat spuštění buněčné apoptózy a nekrózy. (42, 43)

3.2.1. Reaktivní formy vznikající v organismu

Volné radikály jsou definovány jako atomy nebo molekuly obsahující jeden nebo více nepárových elektronů ve svém elektronovém obalu, které jsou schopné samostatné existence. Vzhledem k tomu, že jsou atomy i molekuly nejstabilnější v základním stavu, radikály jsou málo stabilní a vysoce reaktivní sloučeniny, které nejsou v tomto stavu schopny dlouho setrvat a snaží si chybějící elektrony doplnit. (11, 46) Jedná se především o reaktivní formy kyslíku (ROS - reactive oxygen species) a reaktivní formy dusíku (RNS - reactive nitrogen species). (41, 44) Mezi tyto reaktivní formy se však neřadí pouze samotné radikály, ale také sloučeniny, ze kterých volné radikály mohou vznikat. (45)

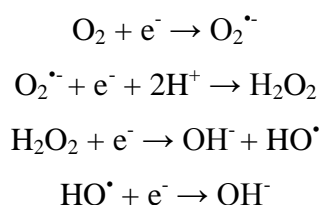
Volné radikály mohou vznikat z normálních molekul homolytickým štěpením kovalentních vazeb, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron. Tento způsob však vyžaduje velké množství energie, například vysokou teplotu, UV nebo ionizační záření, proto se v biologických systémech téměř neuplatňuje. Častější a energeticky snadnější cestou je vznik oxidační nebo redukční reakcí. (41) Protože takto vzniklý radikál je charakteristický svým nepárovým elektronem, jeho životnost končí

v momentu získání párového elektronu. K tomu může dojít, setká-li se radikál s jiným radikálem. Častěji však radikál získá elektron jeho vytržením z normální molekuly. Tímto jeden radikál zanikne, ale druhý vznikne z ochuzené molekuly a dochází tak k řetězové reakci, která vede k poškození velkého množství molekul. K ukončení řetězového sledu reakcí dochází setkáním dvou radikálů, nebo reakcí radikálu s molekulou nebo atomem, jejichž radikál je stabilní a může delší dobu přetrvávat. (46)

3.2.1.1. ROS – reaktivní formy kyslíku

Nejčastěji se v organismu setkáváme s reaktivními formami kyslíku. Mezi volné radikály se řadí superoxid $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál HO^{\cdot} , peroxy ROO^{\cdot} , alkoxy RO^{\cdot} a hydroperoxy HO_2^{\cdot} . K látkám, které nejsou volnými radikály, ale umožňují jejich vznik, patří peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná $HOCl$, ozon O_3 a singletový kyslík 1O_2 . (41)

Nejběžnější superoxidový radikál (superoxid) $O_2^{\cdot-}$ vzniká redukcí molekuly kyslíku přijetím jednoho elektronu. Z něho se může stát přijetím jednoho elektronu a dvou protonů peroxid vodíku H_2O_2 , který se v přítomnosti dalšího elektronu může rozpadnout na vodu a hydroxylový radikál HO^{\cdot} (má o jeden elektron méně než hydroxidový ion OH^-). Další elektron může redukovat hydroxylový radikál na další molekulu vody (disociovaná molekula). (41, 45) Následující rovnice popisují sled reakcí uvedených výše. (41)

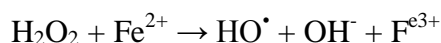


Excitací elektronů v molekule tripletového kyslíku spojenou se změnou spinu jednoho z vnějších elektronů vzniká velmi reaktivní forma označovaná jako singletový kyslík 1O_2 . (45)

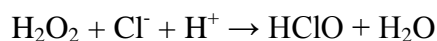
Zvláštností superoxidu $O_2^{\cdot-}$ jsou jeho zároveň redukční i oxidační vlastnosti při vzájemné reakci. Tato schopnost se nazývá dismutace. Při jejím průběhu jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé za vzniku kyslíku O_2 a peroxidu vodíku H_2O_2 . (41) Tato reakce probíhá v organismu spontánně a také za urychlení enzymem superoxidodismutázou.



Peroxid vodíku H_2O_2 pak může společně se superoxidem $\text{O}_2^{\cdot-}$ v přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^+ iontů (tzv. transičních kovů) vytvářet hydroxylový radikál. (45) Reakce katalyzovaná železem se nazývá Haberova-Weissova nebo také Fentonova a vzniká při ní již zmíněný hydroxylový radikál HO^{\cdot} , který je vysoce toxický a v živé hmotě ihned reaguje s okolními molekulami. (41)



Důležitá je také reakce peroxidu vodíku s chloridy katalyzovaná myeloperoxidázou v granulocytech, při které vzniká silné oxidační činidlo – kyselina chlorná. (45) Ta je granulocyty používána spolu s dalšími reaktivními sloučeninami jako baktericidní prostředek. (41)



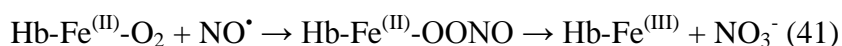
V organismu ROS vznikají v mnoha enzymových i neenzymových reakcích. Mezi takové reakce patří například vznik kyseliny močové z hypoxanthinu pomocí xanthinoxidázy nebo vznik chlornanů v neutrofilních granulocytech. Dále mohou volné radikály vznikat při reakcích kyslíku s chinony a katecholaminy, z toxických látek s nitroaromatickými sloučeninami či tetrachlormethanem, při syntéze eikosanoidů, metabolizaci estrogenů a glykaci bílkovin. Velké množství radikálů produkují také fagocytující buňky. (45) Mezi další endogenní příčiny vzniku volných radikálů patří vznik methemoglobinu, autooxidace thiolů, hyperglykémie nebo reperfuze po předchozí ischemii. (46) Radikály mohou v organismu vznikat také exogenními vlivy, například vysokoenergetickým zářením v ovzduší ze smogu, výfukových plynů i cigaretového kouře. (45) Dále vlivem ionizujícího záření (rentgenové, γ záření), UV-zářením, toxickými látkami (polychlorované bifenyly, chloroform, alkohol) při jejich metabolismu, a také přijímanou potravou, ve které vznikají radikály při různé fyzikální nebo chemické úpravě. (46)

3.2.1.2. RNS – reaktivní formy dusíku

V organismu se vyskytují i radikály, jejichž volný elektron patří jinému atomu než kyslíku, nejčastěji dusíku. Nejběžnějším představitelem je oxid dusnatý NO^\bullet . (46) Další látka charakteru volného radikálu je oxid dusičitý NO_2^\bullet . Reaktivní sloučeniny dusíku zahrnují také neradikálové sloučeniny, a to nitrosyl NO^+ , nitroxid NO, kyselinu dusitou HNO_2 , oxid dusitý N_2O_3 , oxid dusičitý N_2O , nitronium NO^{2+} , peroxyinitrit ONOO a alkylperoxyinitrit ROONO. (41)

Výchozí látkou pro vznik RNS je aminokyselina arginin. Z guanidinové skupiny argininu se působením „NO“-syntázy vytvoří citrulin a koncový dusík se transformuje na skupinu látek označovanou jako oxidy dusíku, která zahrnuje kromě molekuly NO^\bullet i další reaktivní sloučeniny. Jejich obecný účinek spočívá ve stimulaci syntézy cGMP, což vede ke svalové relaxaci, inhibici agregaci krevních destiček a ovlivnění neurotransmise. (45) Mechanismem tohoto účinku je pohotová vazba na hemové železo guanylylcyklázy. (41)

Molekula NO^\bullet je považována za vysoce reaktivní a toxickou, avšak její biologický poločas je pouze několik sekund, což je zapříčiněno rychlým vychytáváním v erythrocytech. (41) Velmi ochotně (5-6x více než kyslík) se vážně na hemoglobin za vzniku methemoglobinu a nitrátu NO_3^- . Tato reakce je důležitou cestou odstraňování reaktivní formy oxidu dusnatého. (45)



Oxid dusnatý NO^\bullet může reakcí se superoxidem $\text{O}_2^{\bullet-}$ vytvářet peroxinitrit OONO, silné oxidační činidlo, které může po protonizaci poskytnout hydroxylový radikál HO^\bullet a NO_2 . (45) Fyziologické podmínky pro uskutečnění této reakce nejsou příznivé z důvodu nízké koncentrace NO^\bullet a $\text{O}_2^{\bullet-}$, avšak při určitých podmínkách (například jejich intenzivní syntéza aktivovanými granulocyty) může taková reakce proběhnout. (41) Některé sloučeniny mohou sloužit jako přenašeče nitrosylu NO^+ . Takto se chovají nitrosaminy RNH-NO , alkyl- či arylinitrity RO-NO nebo komplexy kov/ NO^+ . Citlivé jsou také thioly, ze kterých vznikají reakcí s NO nitrosothioly RS-NO . (45)

3.2.2. Příznivé účinky a funkce volných radikálů

Vliv volných radikálů na lidský organismus je všeobecně vnímán jako negativní. Nesmíme však zapomínat, že mají také své pozitivní fyziologické úlohy.

Jak bylo uvedeno již dříve, jsou součástí celé řady enzymatických systémů. Reaktivní kyslíkové formy se tvoří jako běžná součást dýchacího řetězce na vnitřní straně mitochondriální membrány. Zde se také nachází enzym cytochromoxidáza, která přijímané elektrony ze živin přesunuje na molekulární kyslík, který tímto redukuje kaskádou reakcí přes reaktivní meziprodukty, až na molekuly vody za uvolnění energie potřebné pro vytvoření ATP. Při těchto dějích nedochází k poškozování okolních biomolekul, protože reaktivní sloučeniny zůstávají po celou dobu navázány na enzym. (41) Monooxygenázy využívají hydroxylový radikál HO^\bullet k hydroxylačním reakcím při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin, nebo při odstraňování xenobiotik, včetně mnohých léků, které jsou po hydroxylaci konjugovány s hydrofilními látkami a vyloučeny z organismu.

V membráně fagocytů a neutrofilních leukocytů se nachází NADPH-oxidáza, která katalyzuje vznik superoxidového radikálu $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ten reakcí s chloridovými anionty působením myeloperoxidázy z azurofilních granulí polymorfonukleárů dává vzniknout kyselině chlorné HOCl , která je využívána k usmrcování fagocytovaných mikroorganismů a odstraňování zbytků mrtvých buněk. (46)

Volné radikály mohou také působit jako signální molekuly za účelem regulace různých biologických pochodů. Peroxid vodíku H_2O_2 a superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$ je nezbytný pro úspěšné oplodnění vajíčka spermii. Napomáhají proniknutí spermie do vajíčka a zabraňují vniknutí další spermie. Také při oxidaci jodidu na jod, který se využívá při jodaci tyroninu je nezbytný peroxid vodíku. (46)

Biologické efekty reaktivních sloučenin dusíku jsou velmi rozsáhlé. Působí na téměř všechny metabolické procesy, regulují činnost některých enzymů, regulují imunitní pochody a cytotoxicitu makrofágů, mají vliv na exkreci sodíku v ledvinových tubulech a modifikaci sekrece hormonů. Jejich aktivita bývá značně zvýšena při bakteriální sepsi, naopak jejich snížený počet zvyšuje cévní tonus a podněcuje rozvoj aterosklerózy. (45)

3.2.3. Patologické vlivy a poškození volnými radikály

Reaktivní radikály mohou napadnout a poškodit jakoukoli molekulu v lidském organismu. Jejich vlivem molekuly mění nebo ztrácí svou strukturu i funkci. Změny mohou být natolik rozsáhlé, že mohou ovlivnit struktury celých buněk a tím způsobit poškození až zánik celých tkání, orgánů a důležitých funkcí. (44) Základem jejich nežádoucích účinků je tedy poškozování biomolekul.

Oxidační poškození lipidů, tzv. lipoperoxidace, je nejintenzivněji vyvolávána hydroperoxylovým HO_2^\bullet a hydroxylovým radikálem HO^\bullet , méně také superoxidem $\text{O}_2^{\bullet-}$. Nejcitlivějším místem je fosfolipidová dvojvrstva všech biologických membrán, v nich především místa dvojných vazeb volných nenasycených mastných kyselin. (45) Díky těmto dvojným vazbám podléhají lipidy snadněji peroxidaci než jiné biomolekuly. Při těchto reakcích dochází k vytváření dalších radikálů, dokud nedojde k terminaci. Avšak i poté zůstávají stabilnější reaktivní formy v pohotovosti k dalším reakcím, vyvolaným zejména tranzitními kovy. Výsledkem všech těchto dějů jsou změny v permeabilitě a fluiditě membrán, ovlivnění membránových enzymatických systémů a tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy. (41) Viditelným projevem oxidačního poškození lipidů je také vytváření pigmentů ve stařeckých skvrnách.

K poškozování bílkovin a enzymů dochází především napadáním SH-skupin aminokyselin, které poškozují u enzymů a také hemoglobinu jejich metabolické funkce. Takto také dochází k modifikaci bílkovin pojiva kolagenu a elastinu. (45) Dále dochází vlivem oxidačního působení ke zvýšenému síťování a agregaci proteinů, a k jejich fragmentaci a štěpení. Celkovým výsledkem jsou změny v transportu iontů a aktivitě enzymů. Modifikací aminokyselin vznikají nové antigenní faktory, které mohou způsobovat autoimunitní reakce.

Významné je také oxidační postižení nukleových kyselin. Deoxyribonukleové kyseliny jsou poškozovány především hydroxylovým radikálem HO^\bullet . Reaguje s deoxyribózou za vzniku malondialdehydu a dalších produktů, modifikuje a uvolňuje purinové a pyrimidinové báze. Výsledkem je přerušení polynukleotidového řetězce nebo vytvoření křížových vazeb což vede ke zlomům DNA, mutacím, translačním chybám a inhibici proteosyntézy. (41)

Cílem působení volných radikálů mohou být dále polysacharidy a glykosaminoglykany, také látky nízkomolekulární jako polyfenoly, katecholaminy, thioly nebo cholesterol. (45)

3.2.4. Antiradikálové působení

Aby se zabránilo škodlivému a toxickému vlivu volných radikálů a reaktivních forem sloučenin dusíku a kyslíku, vyvinula se v organismu řada ochranných mechanismů. Ty působí proti jejich nadměrné tvorbě, zachytávají a odstraňují již vzniklé radikály a také opravují poškozené molekuly a různé buněčné složky. (41)

3.2.4.1. Systémy zabraňující tvorbě

Nejbezpečnějším způsobem zabránění nežádoucích účinků volných radikálů je zabránění jejich nadměrné tvorby. Jednou z cest je regulace aktivity enzymů, které je tvoří (například indukovatelná syntéza NO^{*}). Další možností je vychytávání tranzitních prvků (železo, měď) a změna jejich oxidoredukčních vlastností tak, že přestanou katalyzovat radikálové reakce. Takto působí například transportní a zásobní bílkoviny transferin, laktoferin nebo ferritin. (41)

3.2.4.2. Antioxidační systémy

Pokud se nebezpečné radikály již vytvořily, mohou být odstraněny takzvanými „vychytávači“ či „zametači“ (scavengers), „lapači“ (trappers) a „zhášeči“ (quenchers). Z chemického hlediska se jedná o látky enzymatické povahy a látky, poskytující s reaktivními formami stálejší a tudíž méně toxické produkty. (41)

Zřejmě nejdůležitějším enzymatickým faktorem chránící tělo před oxidačním stresem jsou superoxid-dismutázy (SOD). Jedná se o skupinu metaloproteinů, které jsou schopny dismutovat superoxid O₂⁻ za vzniku peroxidu H₂O₂ a kyslíku O₂. U aerobních organismů jsou SOD přítomny v každé buňce. Součástí cytosolových SOD je měď a zinek, v mitochondriální matrix se nachází SOD obsahující mangan. (45) Dalším enzymovým nástrojem proti volným radikálům jsou glutathionperoxidázy, které odstraňují intracelulární hydroperoxydy. Cytosolová GSH-glutathionperoxidáza rozkládá několik typů hydroperoxidů mastných kyselin, je velmi aktivní i v dismutaci peroxidu vodíku H₂O₂ a jejím substrátem jsou také 1-monoacylglycerolhydroperoxydy. Fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza dokáže redukovat přímo v membránách fosfolipidové hydroperoxydy. Kataláza má za následek zejména katalyzaci

dvouelektronové dismutace peroxidu vodíku H_2O_2 na dioxygen O_2 a vodu H_2O . (41) Z dalších enzymů účastnících se likvidace volných radikálů jsou v těle využívány glutathiontransferázy, peroxydázy nebo myeloperoxidáza. (45)

Neenzymové faktory obvykle působí redukčním účinkem. Jedná se o látky, které mohou poskytnout radikálu elektron, čímž zastaví jeho škodlivé působení a samy se na radikál změň. Takto vzniklé radikály jsou však mnohem více stabilní, a proto méně nebezpečné. (46) Tímto mechanismem působí četné látky endogenního i exogenního (přijímané potravou) původu. Významnou skupinou antioxidantů jsou vitamíny. Z nich nejúčinnější jsou tokoferoly (vitamin E), dále kyselina askorbová (vitamin C) a karotenoidy (zejména provitamin β -karoten a retinoly – vitaminy A). (45) Mezi endogenní antioxidační molekuly patří koenzym Q (ubichinon), glutathion, kyselina lipopová, melatonin, kyselina močová a bilirubin. (41)

3.2.5. Metody stanovení antioxidační aktivity *in vitro*

Pro stanovení efektivnosti antioxidačního působení bylo vyvinuto mnoho různých metod. Jejich odlišnost spočívá v rozdílných mechanismech účinku jednotlivých antioxidantů. Nejčastěji se jedná o přímou reakci antioxidantu s radikálem (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Protože přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je často problematické, liší se i metody hodnotící antioxidační aktivitu svými principy. (44) Výsledky získané různými metodami se mohou od sebe vzájemně značně lišit, vzhledem k variabilitě mechanismů stanovení a různého složení vzorků. (11) Mezi metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů patří TEAC a DPPH, na eliminaci kyslíkových radikálů je založena metoda ORAC a PCL, pro stanovení neenzymatických antioxidantů lze použít metody založené na hodnocení jejich redoxních vlastností, například metoda FRAP. (44)

3.2.5.1. Metoda TEAC - Troxol equivalent antioxidant capacity

Je jednou z nejzákladnějších a nejvyužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Je založena na schopnosti antioxidantu zhášet kation-radikál $ABTS^{+}$ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Pomocí spektrofotometrie se sledují změny absorpčního spektra $ABTS^{+}$. Výsledná aktivita vzorku je srovnávána s aktivitou Troxolu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-

karboxylová kyselina). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troxolu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mm/l. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troxolu v mm/l, která je rovna antioxidační aktivitě vzorku. (44)

3.2.5.2. Metoda používající DPPH

Tato metoda je považována za jednu z nejstarších základních metod pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i směsných vzorků. Dochází při ní k reakci vzorku se stabilním radikálem DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Sleduje se pokles absorbance při 517 nm po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu. (11, 44)

3.2.5.3. Metoda ORAC – Oxygen radical absorbance capacity

Při použití této metody se v testovaném systému vytváří kyslíkové radikály a hodní se schopnost zkoušené látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Pro generaci peroxylových radikálů ROO^{\bullet} se používá degradace AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimid)-dihydrochlorid), pro generaci hydroxylových radikálů HO^{\bullet} pak systém $H_2O_2 + Cu^{2+}$. Detekce se provádí pomocí β -PE sondy (β -phycoerythrin) nebo fluoresceinu, který je výhodnější zejména pro stanovení antioxidační aktivity polyfenolů. (44)

3.2.5.4. Metoda FRAP – Ferric reducing antioxidant potencial

Je založena na principu redoxní reakce, kdy antioxidanty ze vzorku redukuje komplex Fe^{3+} - TPTZ (Fe-2,4,6-tripyridyl-s-triazin) na Fe^{2+} - TPTZ. (11) Mírou antioxidační aktivity je nárůst absorbance při 593 nm způsobený vznikajícím komplexem Fe^{2+} - TPTZ. Toto stanovení má však své nevýhody. Probíhá za nefyziologicky nízkého pH a nejsou zachyceny pomalu reagující polyfenolické látky a thioly. Navíc, vznikající železnaté ionty jsou *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy radikálové reakce. (44)

3.2.5.5. Metoda PCL – Photochemiluminescent

Toto stanovení je kombinací fotochemické generace radikálů a citlivé detekce pomocí chemiluminescence. Tato reakce je vyvolána optickou excitací, která vede k produkci superoxidového radikálu $O_2^{\cdot-}$. Volné radikály jsou částečně eliminovány přítomnými antioxidanty a zbylé jsou detekovány pomocí chemiluminescenčního činidla luminolu. (47) Touto metodou lze stanovit aktivitu lipofilních i hydrofilních antioxidantů. (11)

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie a přístroje

Chemikálie

DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazy, Sigma, St. Louis, USA

MeOH – methanol, Penta Chrudim, *Česká Republika*

Přístroje

Analytické váhy, *Kern (Německo)*

Dvoupaprskový spektrofotometr UV 1601, *Shimatzu (Japonsko)*

Laboratorní síta, *Retsch (Německo)*

Ultrazvuková lázeň, *Bandelin Sonorex(Německo)*

4.2. Rostlinný materiál

Květy bezu černého pochází z volného sběru ze dvou lokalit – obec Kunčice nad Labem (nadmořská výška asi 460 m. n. m.) a Jeseník (nadmořská výška asi 430 m. n. m.). Sběr v Kunčicích byl prováděn odstřížením vrcholíků ze stejného keře ve dnech následujících po sobě v období 2. 6. – 16. 6. 2011, celkem 15 sběrů. V Jeseníku pak byly vybírány květenství z jednoho keře podle stádia kvetení (květy s poupaty, květy rozvité, květy rozvité až odkvétající) ve třech různých oblastech od sebe vzdálených (Česká Ves, Lázně Jeseník, Bukovice), v termínech 2. 6., 4. 6., 6. 6. 2012, celkem 9 sběrů. Celé vrcholíky byly sušeny volně na vzduchu při pokojové teplotě. Pro přípravu vzorků k analýze byly květy odděleny spolu s květními stopkami, následně rozdrobněny v laboratorním mlýnku a částice větších rozměrů odstraněny na sítu číslo 355. Uchovávány byly v uzavřených obalech chráněných před světlem.

4.3. Stanovení antiradikálové aktivity

Příprava extraktů

Ke stanovení byly použity methanолоvé extrakty, připravené z 0,5 g upráškované drogy *Sambuci nigrae flos* a 25 ml methanolu. Po 30 minutách extrakce v ultrazvukové lázni při pokojové teplotě za občasného míchání byl výluh zfiltrován a filtrát převeden do 25,0 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Z tohoto roztoku se dále odebral 1,0 ml, který byl zředěn methanolem do 25,0 ml. Tento extrakt o koncentraci 0,8 mg/ml byl použit ke stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH.

Příprava roztoku DPPH

0,05 g DPPH bylo rozpuštěno v methanolu pomocí ultrazvukové lázně, kam byla tato směs na 30 minut umístěna. Takto připravený roztok byl poté uložen do chladu a temna, aby se zabránilo rozkladným procesům.

Postup stanovení

Do odměrných zkumavek bylo odměřeno odpovídající množství připraveného extraktu od koncentrace 320 $\mu\text{l/ml}$ až 1200 $\mu\text{l/ml}$. Dále bylo přidáno 0,2 ml roztoku DPPH a tato směs byla doplněna methanolem do celkového objemu 5 ml. Obsah zkumavky byl po uzavření zátkou promíchán a umístěn při laboratorní teplotě do temna na dobu 30 minut.

Příprava slepého vzorku

Pro stanovení bylo nutno vytvořit slepý vzorek. Do odměrné zkumavky bylo odměřeno 0,2 ml roztoku DPPH a doplněno do 5 ml methanolem. Směs byla uzavřena, promíchána a umístěna do temna spolu s ostatními vzorky.

Měření absorbance

Po uplynutí inkubační doby 30 minut byla u stanovovaných vzorků i slepého vzorku měřena absorbance při vlnové délce 517 nm proti methanolu. Získané hodnoty byly použity na výpočet, udávající kolik procent radikálu DPPH bylo redukováno extraktem při daných koncentracích. Byl použit následující vzorec

$$\%_{\text{zreduk.DPPH}} = (1 - A_{\text{vz}}/A_{\text{sl}}) \times 100,$$

kde A_{vz} je absorbance měřeného extraktu a A_{sl} je absorbance slepého vzorku.

Dále byla z grafu odečtena hodnota IC_{50} udávající koncentraci extraktu, při které dojde k 50% redukci radikálu DPPH.

Každé stanovení bylo provedeno třikrát.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 1 – 27 a Grafech 1 – 8.

4.4. Výsledky

4.4.1. Tabulky

Vysvětlivky k tabulkám:

AA = antioxidační aktivita

Asl = absorbance slepého vzorku

J = Lokalita Jeseník; K = Lokalita Kunčice nad Labem

% = % inhibice DPPH

Tabulka 1–AA extraktů květů - lokalita K, sběr 2.6.2011

(V) ml	C (mg/ml)	m ₁ =0,5000 g		m ₂ =0,5002 g		m ₃ =0,5003 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,227		Asl=1,176		Asl=1,153			
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	1,018	17,03	0,998	15,14	0,983	14,74	15,64	0,99
0,5	0,40	0,972	20,78	0,954	18,88	0,934	18,99	19,55	0,87
0,6	0,48	0,942	23,23	0,909	22,70	0,915	20,64	22,19	1,16
0,7	0,56	0,862	29,75	0,875	25,60	0,847	26,54	27,30	1,76
0,8	0,64	0,814	33,66	0,842	28,40	0,802	30,44	30,83	2,14
0,9	0,72	0,788	35,78	0,789	32,91	0,786	31,83	33,51	1,69
1,0	0,80	0,742	39,53	0,761	35,29	0,728	36,86	37,23	1,73
1,1	0,88	0,714	41,81	0,699	40,56	0,654	43,28	41,88	1,10
1,2	0,96	0,694	43,44	0,682	42,01	0,631	45,27	43,57	1,35
1,3	1,04	0,627	48,90	0,638	45,75	0,599	48,05	47,57	1,33
1,4	1,12	0,587	52,16	0,566	51,87	0,570	50,56	51,53	0,69
1,5	1,20	0,538	56,15	0,552	53,06	0,549	52,39	53,87	1,67
IC ₅₀ (mg/ml)		1,067		1,090		1,100		1,086	0,014

Tabulka 2 – AA extraktů květů - lokalita K sběr, 8.6. 2011

V (ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5006 g		m ₂ =0,5002 g		m ₃ =0,5004 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		AsI=1,068		AsI=1,094		AsI=1,087			
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	0,832	22,10	0,844	22,85	0,864	20,52	21,82	0,97
0,5	0,40	0,799	25,19	0,812	25,78	0,831	23,55	24,84	0,94
0,6	0,48	0,746	30,15	0,746	31,81	0,793	27,00	29,65	1,99
0,8	0,64	0,672	37,08	0,644	41,13	0,691	36,40	38,20	2,09
1,0	0,80	0,541	49,34	0,591	45,98	0,611	43,79	46,37	2,28
1,2	0,96	0,495	53,65	0,497	54,57	0,482	55,66	54,64	0,84
1,3	1,04	0,452	57,68	0,457	58,23	0,466	57,13	57,68	0,46
1,4	1,12	0,414	61,24	0,376	65,63	0,381	64,90	63,92	1,92
1,5	1,20	0,351	67,13	0,326	70,20	0,310	68,70	68,68	1,25
1,6	1,28	0,302	71,72	0,291	73,40	0,295	72,90	72,67	0,70
1,7	1,36	0,265	75,19	0,285	73,95	0,270	75,20	74,78	0,59
1,8	1,44	0,223	79,12	0,274	74,95	0,235	78,40	77,49	1,82
IC ₅₀ (mg/ml)		0,825		0,874		0,880		0,860	0,025

Tabulka 3 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 14.6. 2011

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5003 g		m ₂ =0,5007 g		m ₃ =0,5005 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,023		Asl=1,058		Asl=1,043			
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	0,784	23,36	0,865	18,24	0,824	21,00	20,87	2,09
0,5	0,40	0,753	26,39	0,776	26,65	0,760	27,13	26,72	0,31
0,6	0,48	0,703	31,28	0,728	31,19	0,712	31,74	31,40	0,24
0,7	0,56	0,674	34,12	0,689	34,88	0,647	37,97	35,66	1,67
0,8	0,64	0,636	37,83	0,616	41,78	0,618	40,75	40,12	1,67
0,9	0,72	0,582	43,11	0,541	48,87	0,572	45,16	45,71	2,38
1,0	0,80	0,491	52,00	0,499	52,84	0,513	50,81	51,88	0,83
1,1	0,88	0,439	57,09	0,421	60,21	0,469	55,03	57,44	2,13
1,2	0,96	0,420	58,94	0,393	62,85	0,403	61,36	61,05	1,61
1,3	1,04	0,394	61,49	0,379	64,18	0,375	64,05	63,24	1,24
1,4	1,12	0,366	64,22	0,353	66,64	0,349	66,54	65,80	1,12
1,5	1,20	0,302	70,48	0,311	70,60	0,310	70,28	70,45	0,13
IC ₅₀ (mg/ml)		0,780		0,745		0,788		0,771	0,019

Tabulka 4 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 2. 6. 2011

Sběr 2.6.								
C (mg/ml)	Asl=1,227		Asl=1,176		Asl=1,153		φ	Směrodatná odchylka (±)
	m ₁ =0,5002 g		m ₂ =0,5005 g		m ₃ =0,5003 g			
	A	%	A	%	A	%		
1,04	0,627	48,90	0,638	45,75	0,599	48,05	47,57	1,33
1,12	0,587	52,16	0,566	51,87	0,570	50,56	51,53	0,69
1,20	0,538	56,15	0,552	53,06	0,549	52,39	53,87	1,67
IC ₅₀ (mg/ml)	1,067		1,090		1,100		1,086	0,014

Tabulka 5 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 3. 6. 2011

Sběr 3.6.								
A _{DPPH} =1,040								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5008 g		m ₂ =0,5008 g		m ₃ =0,5003 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,88	0,522	49,81	0,539	48,17	0,544	47,70	48,56	0,90
0,96	0,508	51,15	0,499	52,02	0,514	50,58	51,25	0,59
1,04	0,466	55,19	0,476	54,23	0,459	55,87	55,10	0,67
IC ₅₀ (mg/ml)	0,896		0,916		0,949		0,920	0,022

Tabulka 6 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 4. 6. 2011

Sběr 4.6.								
A _{DPPH} =1,063								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5008 g		m ₂ =0,5007 g		m ₃ =0,5011 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,534	49,76	0,544	48,82	0,540	49,20	49,26	0,39
0,88	0,480	54,84	0,476	55,22	0,469	55,88	55,31	0,43
0,96	0,445	58,14	0,433	59,27	0,419	60,58	59,33	1,00
IC ₅₀ (mg/ml)	0,804		0,815		0,810		0,810	0,004

Tabulka 7 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 5. 6. 2011

Sběr 5.6.								
A _{DPPH} =1,058								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5015 g		m ₂ =0,5014 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,564	46,69	0,557	47,35	0,562	46,88	46,97	0,28
0,88	0,535	49,43	0,528	50,09	0,540	48,96	49,49	0,46
0,96	0,492	53,50	0,491	53,59	0,488	53,88	53,66	0,16
IC ₅₀ (mg/ml)	0,893		0,878		0,900		0,890	0,009

Tabulka 8 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 6. 6. 2011

Sběr 6.6.								
A _{DPPH} =1,063								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5008 g		m ₂ =0,5009 g		m ₃ =0,5008 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,539	49,29	0,538	49,39	0,543	48,92	49,20	0,20
0,88	0,443	58,33	0,478	55,03	0,465	56,26	56,54	1,36
0,96	0,412	61,24	0,439	58,70	0,421	60,40	60,11	1,06
IC ₅₀ (mg/ml)	0,806		0,809		0,812		0,809	0,002

Tabulka 9 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 7. 6. 2011

Sběr 7.6.								
A _{DPPH} =1,040								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5013 g		m ₂ =0,5016 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,72	0,547	47,40	0,560	46,15	0,551	47,02	46,86	0,52
0,80	0,522	49,81	0,524	49,62	0,530	49,04	49,49	0,33
0,88	0,494	52,50	0,473	54,52	0,488	53,08	53,37	0,85
IC ₅₀ (mg/ml)	0,806		0,807		0,822		0,812	0,007

Tabulka 10 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 8. 6. 2011

Sběr 8.6.								
C (mg/ml)	Asl=1,068		Asl=1,094		Asl=1,087		φ	Směrodatná odchylka (±)
	m ₁ =0,5002 g		m ₂ =0,5005 g		m ₃ =0,5003 g			
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,541	49,34	0,591	45,98	0,611	43,79	46,37	2,28
0,96	0,495	53,65	0,497	54,57	0,482	55,66	54,63	0,84
1,04	0,452	57,68	0,457	58,23	0,466	57,13	57,68	0,46
IC ₅₀ (mg/ml)	0,825		0,874		0,880		0,860	0,025

Tabulka 11 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 9. 6. 2011

Sběr 9.6.								
A _{DPPH} =1,058								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5003 g		m ₂ =0,5005 g		m ₃ =0,5002 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,555	47,54	0,544	48,58	0,549	48,11	48,08	0,43
0,88	0,509	51,89	0,510	51,80	0,522	50,66	51,45	0,56
0,96	0,450	57,47	0,428	59,55	0,467	55,86	57,63	1,51
IC ₅₀ (mg/ml)	0,848		0,845		0,864		0,852	0,008

Tabulka 12 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 10. 6. 2011

Sběr 10.6.								
A _{DPPH} =1,040								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5007 g		m ₂ =0,5005 g		m ₃ =0,5005 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,72	0,599	42,40	0,618	40,58	0,612	41,15	41,38	0,76
0,80	0,550	47,11	0,563	45,87	0,537	48,37	47,12	1,02
0,88	0,422	59,42	0,469	54,90	0,445	57,21	57,18	1,85
IC ₅₀ (mg/ml)	0,823		0,839		0,816		0,826	0,010

Tabulka 13 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 11. 6. 2011

Sběr 11.6.								
A _{DPPH} =1,045								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5003 g		m ₂ =0,5003 g		m ₃ =0,5006 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,72	0,528	49,47	0,532	49,09	0,536	48,71	49,09	0,31
0,80	0,493	52,82	0,506	51,58	0,514	50,81	51,74	0,83
0,88	0,467	55,31	0,470	55,02	0,489	53,21	54,51	0,93
IC ₅₀ (mg/ml)	0,734		0,753		0,770		0,752	0,015

Tabulka 14 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 12. 6. 2011

Sběr 12.6.								
A _{DPPH} =1,045								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5012 g		m ₂ =0,5013 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,72	0,550	47,37	0,543	48,04	0,557	46,70	47,37	0,55
0,80	0,468	55,22	0,472	54,83	0,484	53,68	54,58	0,65
0,88	0,442	57,70	0,429	58,95	0,433	58,56	58,40	0,52
IC ₅₀ (mg/ml)	0,746		0,743		0,757		0,749	0,006

Tabulka 15 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 13. 6. 2011

Sběr 13.6.								
A _{DPPH} =1,045								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5017 g		m ₂ =0,5013 g		m ₃ =0,5012 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
	A	%	A	%	A	%		
0,64	0,547	47,66	0,558	46,60	0,554	46,99	47,08	0,44
0,72	0,506	51,58	0,519	50,33	0,517	50,53	50,81	0,55
0,80	0,494	52,73	0,504	51,77	0,486	53,49	52,66	0,70
IC ₅₀ (mg/ml)	0,685		0,711		0,708		0,701	0,012

Tabulka 16 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 14. 6. 2011

Sběr 14.6.								
C (mg/ml)	Asl=1,023		Asl=1,058		Asl=1,043		ϕ	Směrodatná odchylka (\pm)
	m ₁ =0,5002 g		m ₂ =0,5005 g		m ₃ =0,5003 g			
	A	%	A	%	A	%		
0,72	0,582	43,11	0,541	48,87	0,572	45,16	45,71	2,38
0,80	0,491	52,00	0,499	52,84	0,513	50,81	51,88	0,83
0,88	0,439	57,09	0,421	60,21	0,469	55,03	57,44	2,13
IC ₅₀ (mg/ml)	0,780		0,745		0,788		0,771	0,019

Tabulka 17 – AA extraktů květů – lokalita K, sběr 15. 6. 2011

Sběr 15.6.								
A _{DPPH} =1,075								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5001 g		m ₂ =0,5006 g		m ₃ =0,5003 g		ϕ	Směrodatná odchylka (\pm)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,546	49,21	0,551	48,74	0,544	49,40	49,12	0,28
0,88	0,472	56,09	0,495	53,95	0,486	54,79	54,95	0,88
0,96	0,424	60,56	0,432	59,81	0,437	59,35	59,91	0,50
IC ₅₀ (mg/ml)	0,809		0,819		0,809		0,812	0,005

Tabulka 18 – AA extraktů květů - lokalita K, sběr 16. 6. 2011

Sběr 16.6.								
A _{DPPH} =1,062								
C (mg/ml)	m ₁ =0,5001 g		m ₂ =0,5006 g		m ₃ =0,5003 g		ϕ	Směrodatná odchylka (\pm)
	A	%	A	%	A	%		
0,80	0,567	46,61	0,578	45,57	0,560	47,27	46,48	0,70
0,88	0,520	51,04	0,529	50,19	0,513	51,69	50,97	0,61
0,96	0,482	54,61	0,491	53,77	0,477	55,08	54,49	0,37
IC ₅₀ (mg/ml)	0,860		0,876		0,848		0,861	0,011

Tabulka 19 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Česká Ves*, sběr 2. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5012 g		m ₂ =0,5007 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,127							
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	0,888	21,21	0,863	23,43	0,856	24,05	22,89	1,22
0,5	0,40	0,850	24,58	0,833	26,09	0,828	26,53	25,73	0,84
0,6	0,48	0,737	34,61	0,782	30,61	0,791	29,81	31,68	2,10
0,7	0,56	0,703	37,62	0,728	35,40	0,755	33,01	35,34	1,88
0,8	0,64	0,689	38,86	0,672	40,37	0,728	35,40	38,21	2,08
0,9	0,72	0,637	43,48	0,625	44,54	0,691	40,46	42,83	1,73
1,0	0,80	0,552	51,02	0,584	48,18	0,596	47,12	48,77	1,65
1,1	0,88	0,480	57,41	0,522	53,68	0,543	51,82	54,30	2,32
1,2	0,96	0,461	59,09	0,482	57,23	0,521	53,77	56,70	2,21
1,3	1,04	0,388	65,57	0,403	64,24	0,433	61,58	63,80	1,66
1,4	1,12	0,354	68,59	0,341	69,74	0,364	67,70	68,68	0,83
1,5	1,20	0,286	74,62	0,307	72,76	0,327	70,98	72,79	1,49
IC ₅₀ (mg/ml)		0,788		0,825		0,846		0,820	0,024

Tabulka 20 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Česká Ves*, sběr 4. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5006 g		m ₂ =0,5009 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,148							
		A	%	A	%	A	%		
0,8	0,64	0,661	42,42	0,652	43,21	0,675	41,20	42,28	0,82
0,9	0,72	0,590	48,61	0,587	48,87	0,612	46,69	48,05	0,97
1,0	0,80	0,520	54,70	0,535	53,40	0,543	52,70	53,60	0,83
1,1	0,88	0,489	57,40	0,519	54,79	0,510	55,57	55,92	1,09
1,2	0,96	0,385	66,46	0,418	63,59	0,427	62,80	64,29	1,57
IC ₅₀ (mg/ml)		0,737		0,739		0,761		0,746	0,011

Tabulka 21 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Česká Ves*, sběr 6. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5006 g		m ₂ =0,5002 g		m ₃ =0,5007 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,083							
		A	%	A	%	A	%		
0,8	0,64	0,592	45,34	0,614	43,31	0,587	45,80	44,81	1,08
0,9	0,72	0,574	47,00	0,561	48,20	0,549	49,31	48,17	0,94
1,0	0,80	0,482	55,49	0,487	55,03	0,499	53,92	54,82	0,66
1,1	0,88	0,440	59,37	0,412	61,96	0,461	57,43	59,59	1,85
1,2	0,96	0,403	62,79	0,394	63,62	0,410	62,14	62,85	0,60
IC ₅₀ (mg/ml)		0,747		0,741		0,732		0,740	0,006

Tabulka 22 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Lázně Jeseník*,
sběr 2. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5010 g		m ₂ =0,5011 g		m ₃ =0,5008 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		AsI=1,069							
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	0,802	24,98	0,827	22,64	0,802	24,98	24,20	1,10
0,5	0,40	0,744	30,40	0,760	28,91	0,777	27,32	28,87	1,26
0,6	0,48	0,714	33,21	0,698	34,71	0,731	31,62	33,18	1,26
0,7	0,56	0,672	37,14	0,667	37,61	0,699	34,61	36,45	1,31
0,8	0,64	0,644	39,76	0,635	40,60	0,662	38,07	39,48	1,05
0,9	0,72	0,631	40,97	0,619	42,10	0,604	43,50	42,19	1,03
1,0	0,80	0,615	42,47	0,588	45,00	0,573	46,40	44,62	1,63
1,1	0,88	0,539	49,58	0,560	47,61	0,529	50,51	49,24	1,21
1,2	0,96	0,514	51,92	0,519	51,45	0,507	52,57	51,98	0,46
1,3	1,04	0,488	54,35	0,503	52,95	0,473	55,75	54,35	1,15
1,4	1,12	0,437	59,12	0,476	55,47	0,455	57,44	57,34	1,49
1,5	1,20	0,402	62,39	0,440	58,84	0,437	59,12	60,12	1,61
IC ₅₀ (mg/ml)		0,895		0,927		0,868		0,897	0,024

Tabulka 23 – AA extraktů květů – lokalita J, oblast *Lázně Jeseník*, sběr

4. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5008 g		m ₂ =0,5009 g		m ₃ =0,5004 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,094							
		A	%	A	%	A	%		
0,9	0,72	0,588	46,25	0,570	47,90	0,592	45,89	46,68	0,87
1,0	0,80	0,553	49,45	0,538	50,82	0,561	48,72	49,66	0,87
1,1	0,88	0,532	51,37	0,513	53,11	0,520	52,47	52,32	0,72
1,2	0,96	0,504	53,93	0,482	55,94	0,499	54,39	54,75	0,86
1,3	1,04	0,476	56,49	0,465	57,50	0,445	59,32	57,77	1,17
IC ₅₀ (mg/ml)		0,823		0,776		0,826		0,808	0,023

Tabulka 24 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Lázně Jeseník*, sběr

6. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5011 g		m ₂ =0,5013 g		m ₃ =0,5009 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,042							
		A	%	A	%	A	%		
0,8	0,64	0,576	44,72	0,568	45,49	0,580	44,34	44,85	0,48
0,9	0,72	0,549	47,31	0,532	48,94	0,542	47,98	48,08	0,67
1,0	0,80	0,529	49,23	0,514	50,67	0,512	50,86	50,26	0,73
1,1	0,88	0,499	52,11	0,502	51,82	0,495	52,50	52,14	0,28
1,2	0,96	0,479	54,03	0,495	52,50	0,477	54,22	53,58	0,77
IC ₅₀ (mg/ml)		0,821		0,767		0,774		0,787	0,024

Tabulka 25 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Bukovice*, sběr 2. 6. 2012

V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5011 g		m ₂ =0,5013 g		m ₃ =0,5010 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,076							
		A	%	A	%	A	%		
0,4	0,32	0,773	28,16	0,722	32,90	0,747	30,58	30,55	1,94
0,5	0,40	0,729	32,25	0,678	36,99	0,722	32,90	34,05	2,10
0,6	0,48	0,684	36,43	0,648	39,78	0,711	33,92	36,71	2,40
0,7	0,56	0,652	39,41	0,620	42,38	0,679	36,90	39,56	2,24
0,8	0,64	0,616	42,75	0,598	44,42	0,646	39,96	42,38	1,84
0,9	0,72	0,577	46,38	0,559	48,05	0,609	43,40	45,94	1,92
1,0	0,80	0,539	49,91	0,535	50,28	0,561	47,86	49,35	1,06
1,1	0,88	0,474	55,95	0,502	53,35	0,512	52,42	53,90	1,49
1,2	0,96	0,427	60,32	0,488	54,65	0,475	55,86	56,94	2,44
1,3	1,04	0,401	62,73	0,457	57,53	0,438	59,29	59,85	2,16
1,4	1,12	0,366	65,99	0,434	59,67	0,415	61,43	62,36	2,66
1,5	1,20	0,345	67,94	0,409	61,99	0,393	63,48	64,47	2,53
IC ₅₀ (mg/ml)		0,802		0,791		0,838		0,810	0,020

Tabulka 26 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Bukovice*, sběr 4. 6. 2012

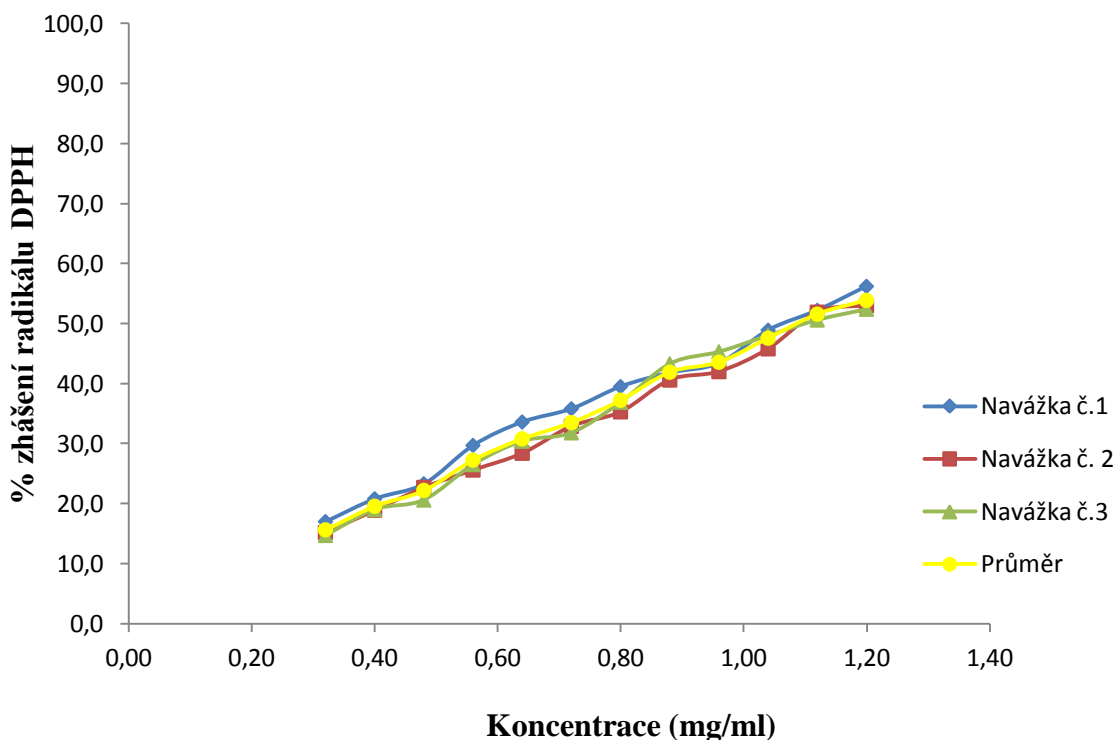
V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5007 g		m ₂ =0,5004 g		m ₃ =0,5002 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,058							
		A	%	A	%	A	%		
0,7	0,56	0,625	40,93	0,610	42,34	0,641	39,41	40,89	1,20
0,8	0,64	0,566	46,50	0,579	45,27	0,592	44,05	45,27	1,00
0,9	0,72	0,537	49,24	0,540	48,96	0,561	46,98	48,39	1,01
1,0	0,80	0,515	51,32	0,509	51,89	0,523	50,57	51,26	0,54
1,1	0,88	0,456	56,90	0,462	56,33	0,489	53,78	55,67	1,36
IC ₅₀ (mg/ml)		0,756		0,750		0,787		0,764	0,016

Tabulka 27 – AA extraktů květů - lokalita J, oblast *Bukovice*, sběr 6. 6. 2012

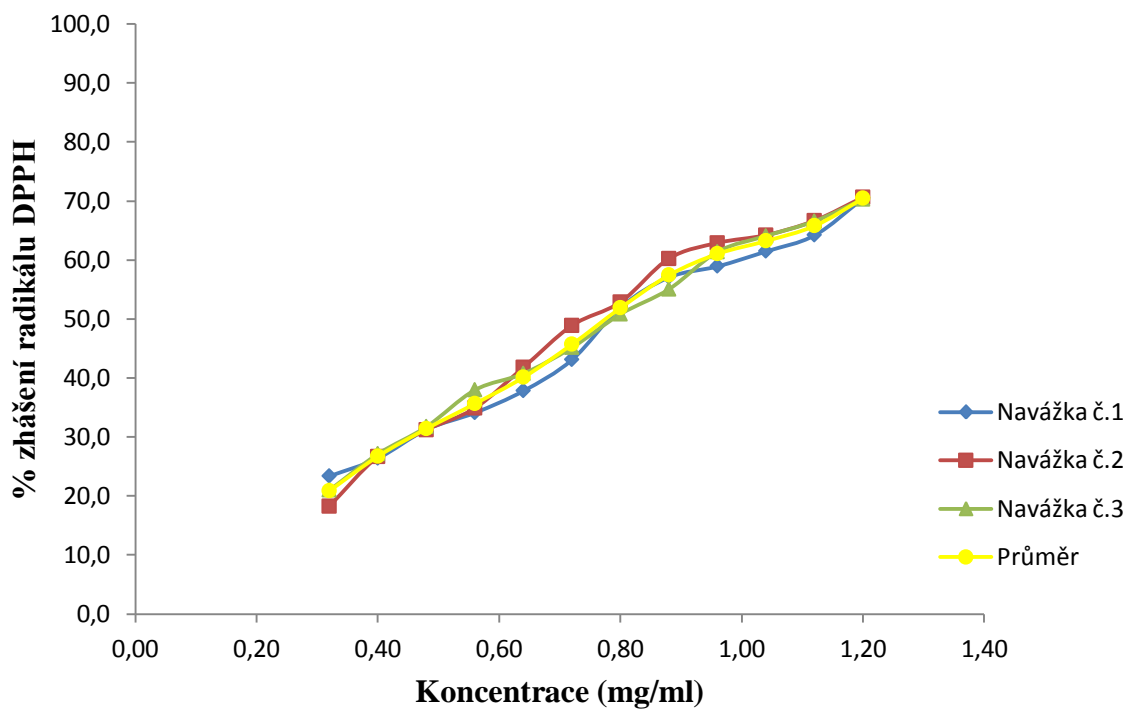
V(ml)	C (mg/ml)	m ₁ =0,5004 g		m ₂ =0,5009 g		m ₃ =0,5005 g		φ	Směrodatná odchylka (±)
		Asl=1,058							
		A	%	A	%	A	%		
0,7	0,56	0,632	40,26	0,646	38,94	0,641	39,41	39,54	0,55
0,8	0,64	0,594	43,86	0,608	42,53	0,584	44,80	43,73	0,98
0,9	0,72	0,542	48,77	0,563	46,79	0,557	47,35	47,64	0,83
1,0	0,80	0,498	52,93	0,503	52,46	0,483	54,35	53,25	0,80
1,1	0,88	0,456	56,90	0,467	55,86	0,452	57,28	56,68	0,60
IC ₅₀ (mg/ml)		0,755		0,766		0,754		0,758	0,005

4.4.2. Grafy

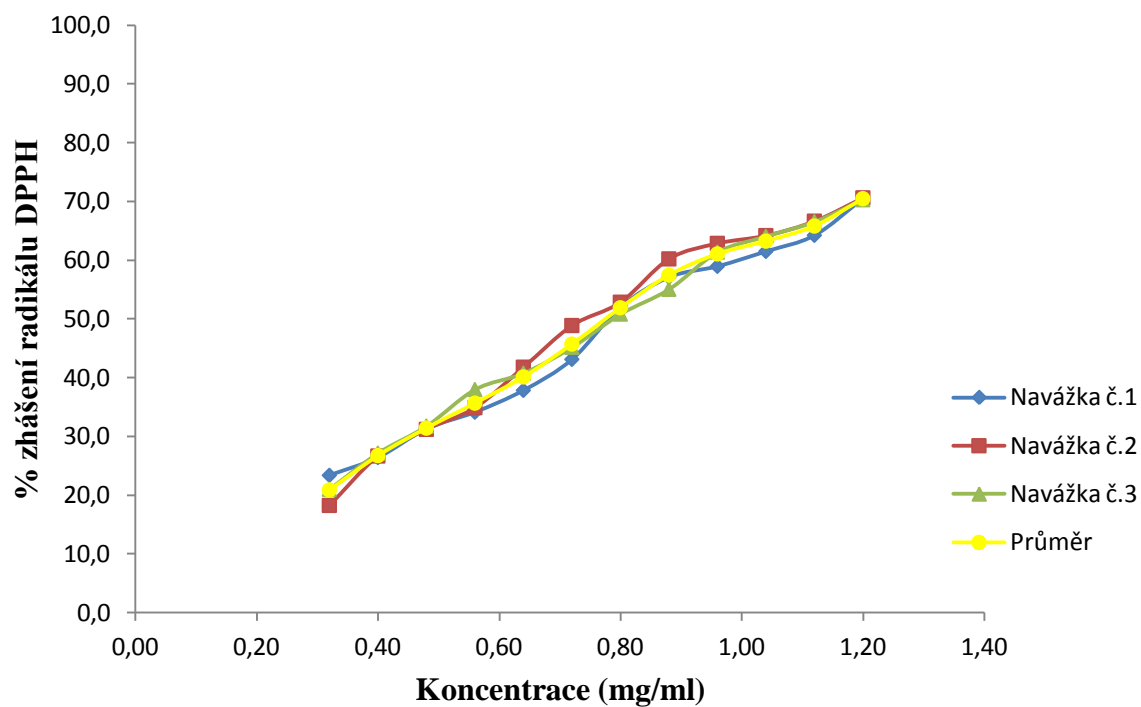
Graf 1 – Lokalita K sběr 2. 6. 2011, hodnoty vychází z Tabulky 1



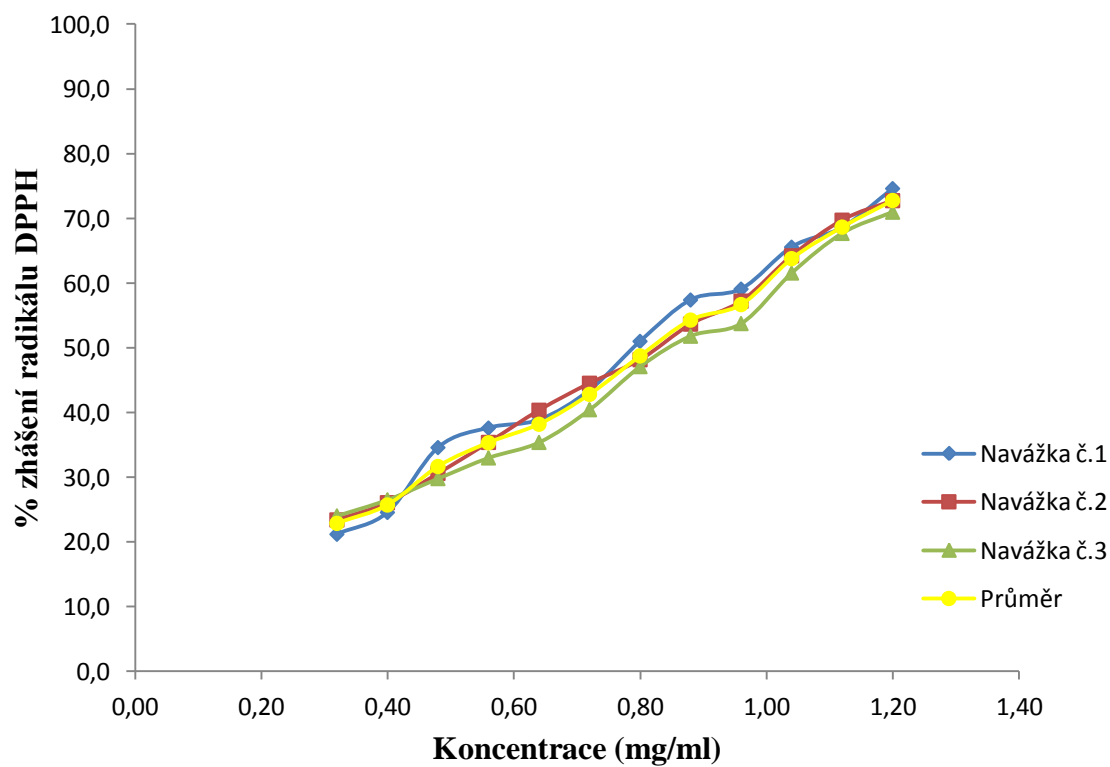
Graf 2 – Lokalita K sběr 8. 6. 2011, hodnoty vychází z Tabulky 2



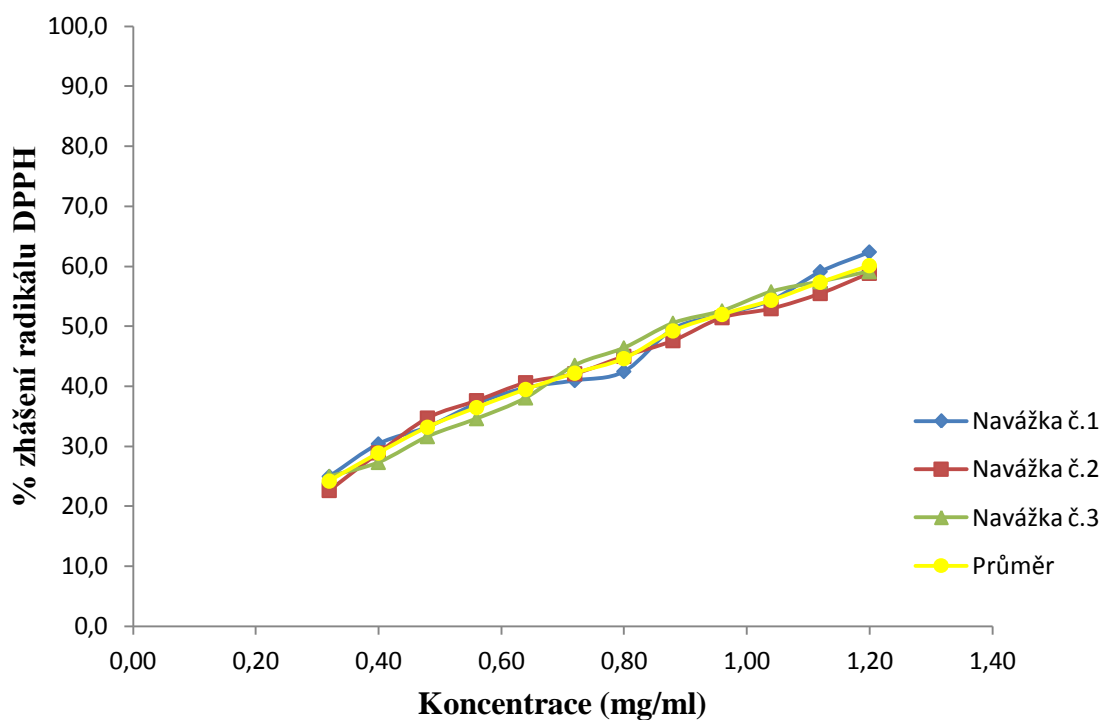
Graf 3 – Lokalita K sběr 14. 6. 2011, hodnoty vychází z Tabulky 3



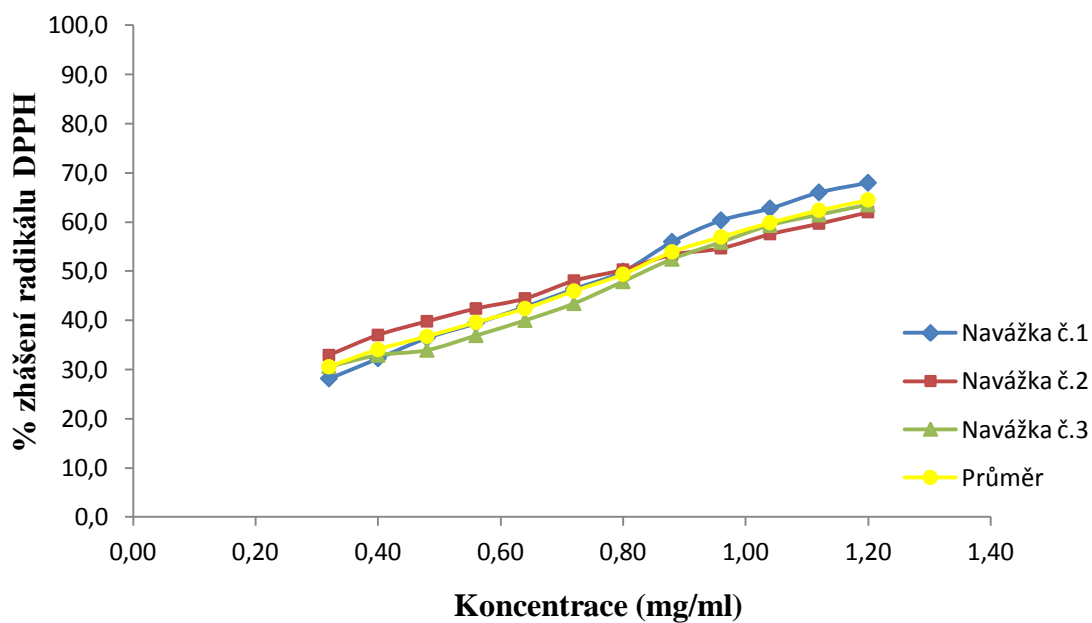
Graf 4 – Lokalita J, oblast Česká Ves, sběr 2. 6. 2012, hodnoty vychází z Tabulky 19



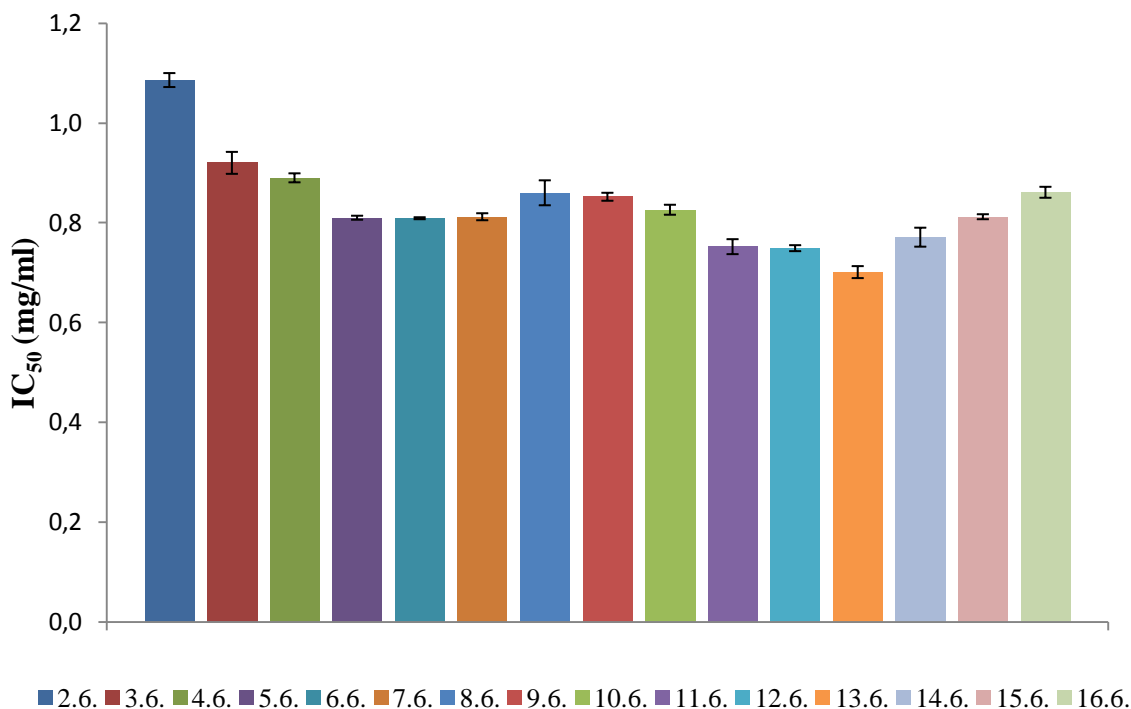
Graf 5 – Lokalita J, oblast *Lázně Jeseník*, sběr 2. 6. 2012, hodnoty vychází z Tabulky 22



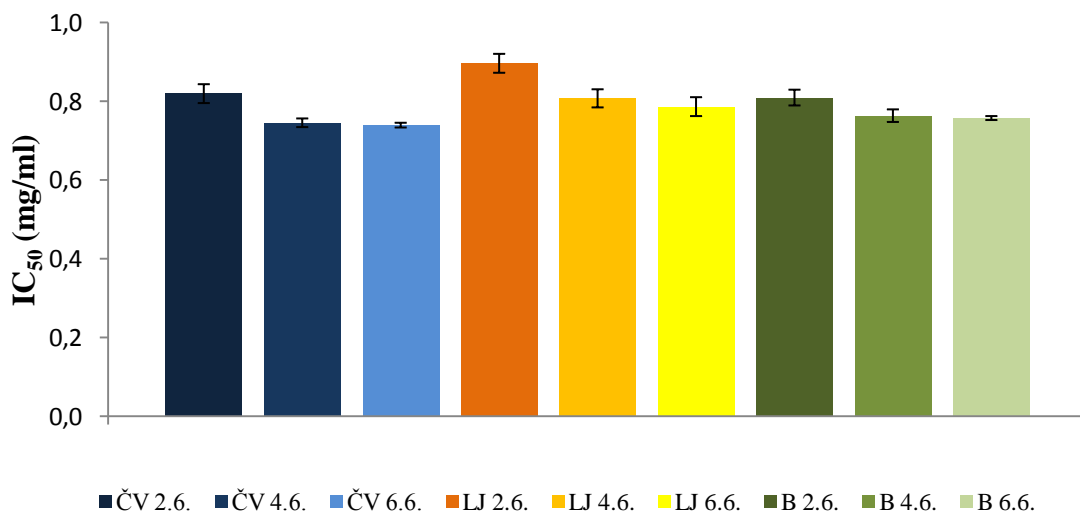
Graf 6 – Lokalita J, oblast *Bukovice*, sběr 2. 6. 2012, hodnoty vychází z Tabulky 25



Graf 7 – Porovnání IC_{50} u sběrů z 2. – 16. 6. 2011 z lokality K, hodnoty vychází z Tabulky 4 - 18



Graf 8 – Porovnání IC_{50} u sběrů z 2., 4., 6., 2012 z lokality J, hodnoty vychází z Tabulky 19 – 27



Datum sběru v lokalitě

Česká Ves = ČV, Lázně Jeneč = LJ, Bukovice = B

5. Diskuze

Sambucus nigra je jedním z nejvýznamnějších druhů rodu *Sambucus* v Evropě. Jeho použití sahá daleko do historie a své místo má i dnes, zejména v terapii a potravinářství. Droga *Sambuci nigrae flos* je dnes hojně využívána zejména pro své diaforetické, diuretické a expektorační účinky. Mezi nejdůležitější obsahové látky bezu černého patří flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny. Nejvýznamnějším flavonoidem je z hlediska obsahu i účinku rutin (kvercetin-3-O-rutinosid). Český lékopis požaduje obsah flavonoidů nejméně 0,80 %. Jejich účinek na lidský organismus je předmětem řady výzkumů, z nichž značná část se zabývá jejich antioxidační aktivitou, tedy schopností chránit buňky před škodlivými účinky volných radikálů. Květy se získávají sběrem z volně rostoucích rostlin. Doba kvetení je přibližně 2-3 týdny, v červnu a červenci (v závislosti na oblasti).

Kromě stanovení obsahových látek může ke zhodnocení kvality drogy přispět i určení antioxidační aktivity. V této práci jsem se zabývala měřením antioxidační aktivity květů pocházejících ze dvou sběrů z oblasti Kunčice nad Labem a Jeseníku. V prvním případě byl sběr prováděn z jednoho keře v průběhu celého období kvetení od 2. – 16. června 2011, v druhém případě byly vybírány z jednoho keře květenství podle stádia vývoje květu, s cílem postihnout všechny zásadní období ontogeneze květu (tvorba pupat, rozkvětání, kvetení až odkvétání).

Ke stanovení jsem použila metodu DPPH. Jedná se o rychlou, jednoduchou metodu založenou na reakci stabilního radikálu s antioxidantem, která poskytuje základní informace o aktivitě a účinku antioxidačních látek obsažených v květech. Stanovení jsem prováděla s methanolvými extrakty květů a methanolvým roztokem radikálu DPPH (2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl). Redukce radikálu se projevovala poklesem absorbance, kterou jsem spektrofotometricky sledovala při 517 nm po 30 minutách inkubace za pokojové teploty v temnu. Tyto podmínky byly stejné pro všechny vzorky z obou oblastí sběrů.

Výsledky stanovení u vzorků z oblasti Kunčice nad Labem jsem zanesla do Tabulek 1 – 18 a znázornila v Grafech 1 – 3. Přehled průměrných hodnot IC_{50} (koncentrace extraktu v mg drogy na ml, která způsobí inhibici 50 % DPPH) jsem vynesla do Grafu 7, spolu s vyznačenými směrodatnými odchylkami. Nejprve jsem analyzovala tři vzorky postihující vegetační průběh a vyhodnotila komplexní závislost

antioxidační aktivity na koncentraci extraktu. U zbylých vzorků jsem provedla měření při koncentracích očekávané IC_{50} . Z výsledků vyplývá, že antioxidační aktivita byla na počátku kvetení nejnižší (2. 6. 2011, $IC_{50}=1,086$ mg/ml), dále se zvyšovala, prvního maxima dosáhla u vzorku ze 6. 6. 2011 ($IC_{50}=0,809$ mg/ml). U vzorku ze 7. 6. a 8. 6. 2011 se antioxidační aktivita mírně snížila. Od 9. 6. se začala opět zvyšovat, druhého maxima dosáhla 13. 6. ($IC_{50}=0,701$ mg/ml) a poté se snižovala.

Výsledky stanovení antioxidační aktivity u vzorků z lokality Jeseník jsem zanesla do Tabulek 19 – 27 a znázornila v Grafech 4 – 6, hodnoty IC_{50} jsem shrnula do Grafu 8. Vzorky sbírané 2. 6. 2012 ze všech tří oblastí (Česká Ves, Lázně Jeseník, Bukovice), které měly postihnout antioxidační aktivitu květů s nerozkvetlými poupaty, vykazovaly nejnižší antioxidační aktivitu. U následujících fází kvetení u vzorků ze 4. a 6. 6. 2012 ze všech lokalit se antioxidační aktivita vždy mírně zvýšila. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u vzorků z oblasti Lázně Jeseník. Obecně lze říci, že se hodnoty IC_{50} pohybují průměrně kolem 0,83 mg/ml u vzorků z lokality Kunčice nad Labem a 0,79 mg/ml u vzorků z lokality Jeseník. Z výsledků je patrné, že nejnižší antioxidační aktivitu vykazují květy na počátku kvetení a poupata. Je tomu zřejmě proto, že obsah látek, které odpovídají za antioxidační aktivitu je na počátku kvetení nízký, avšak s vývojem květu syntéza pokračuje a jejich obsah se zvyšuje.

Stanovením antioxidační aktivity u extraktů z květů bezu černého se zabývaly i další studie. Výsledky stanovení se však liší v závislosti na použité metodě, způsobu extrakce a extrakčním činidle. (48). Většina studií se ovšem shoduje, že květy bezu černého vykazují významnou antioxidační aktivitu. (43, 48, 49, 50).

6. Závěr

Sambucus nigra patří mezi významné rostliny současné fytoterapie. Z historie je známo používání téměř všech částí tohoto keře nebo stromu, dnes se však používají pouze květy a plody. Tato práce byla zaměřena na vlastnosti, obsahové látky a účinky květů bezu černého. Literatura uvádí množství pozitivních vlivů přisuzovaných bezu, mezi nejčastější patří diuretický, diaforetický, analgetický a expektorační efekt při nemocech z nachlazení, horečkách a chřipkách. Charakteristickými obsahovými látkami květů jsou flavonoidy. Těmto sekundárním metabolitům jsou přisuzovány účinky antioxidační, antivirové, antibakteriální, protizánětlivé a protinádorové.

V této práci byla stanovována antioxidační aktivita methanolových extraktů z květů bezu černého. Použita byla metoda zhášení DPPH, která je považována za jednu ze základních metodik vhodných ke stanovení antioxidační aktivity čistých látek i směsných vzorků. Výsledky stanovení byly vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} (koncentrace extraktu v mg/ml, při které dojde k redukci 50% radikálu). Stanovení bylo provedeno s květy původem ze dvou lokalit, sbírány byly od stadia tvorby pupat do odkvětu, avšak ještě nebyly patrné plody. Jejich výsledné průměrné hodnoty IC_{50} se vzájemně výrazněji nelišily, u vzorku z lokality sběru Kunčice byla IC_{50} zhodnocena na 0,79 mg/ml a u sběru Jeseník 0,83 mg/ml. Antioxidační aktivita se však během ontogeneze květů měnila, zřejmě v důsledku tvorby sekundárních metabolitů. Jednotlivé hodnoty IC_{50} se pohybovaly mezi 1,086 mg/ml a 0,701 mg/ml u obou sběrů.

Předpokládá se, že nejvíce k antioxidační aktivitě přispívá obsah flavonoidů, avšak výsledná aktivita je ovlivněna obsahem všech látek vyskytujících se v květech a jejich vzájemnými interakcemi a synergistickým působením.

7. Literatura

- (1) Slavík B., a kol.: Květena České republiky 5. Praha: Academia 1997; s. 503-506.
- (2) Dostál J.: Nová květena ČSSR 2. Praha: Academia 1989; s. 779-780.
- (3) Atkinson M. D., Atkinson E.: *Sambucus nigra* L.. J. Ecol. 2002; 90, 895-923.
- (4) Jahodář L.: Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl). Praha: Havlíček Brain Team 2010; 16-18.
- (5) Český lékopis 2009. Praha: Grada Publishing 2009; s. 3118-3119.
- (6) <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SANI4.24.4.2013>.
- (7) Kite G. C., Larsson S., Veitch N. C., Porter E. A., Ding N., Simmonds M. S. J.: Acyl Spermidines in Inflorescence Extracts of Elder (*Sambucus nigra* L., Adoxaceae) and Elderflower Drinks. J. Agric. Food Chem. 2013; 61, 3501-3508.
- (8) WHO Monographs on Selected Medicinal Plants – Volume 2. 2004, <http://apps.who.int/medinedocs/en/d/Js4927e/>. 22. 4. 2013.
- (9) Jörgensen U., Hansen M., Christensen L. P., Jensen K., Kaack K.: Olfactory and Quantitative Analysis of Aroma Compounds in Elder Flower (*Sambucus nigra* L.) Drink Processed from Five Cultivars. J. Agric. Food Chem. 2000; 48, 2376-2383.
- (10) Wichtl M.: Teedrogen und Phytopharmaka. 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2009; p. 598-600.
- (11) Craft B. D., Kerrihard A. L., Amarowicz R., Pegg R.B.: Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2012; 11, 148-173.
- (12) Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. 2002; 13, 572-584.
- (13) Cook N. C., Samman S.: Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. J. Nutr. Biochem. 1996; 7, 66-76.
- (14) Barros L., Dueñas M., Carvalho A. M., Ferreira I. C. F. R., Santos-Buelga C.: Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. Food Chem. Toxicol. 2012; 50(5), 1576-1582.
- (15) Barcelos G. R. M., Grotto D., Angeli J. P. F., Serpeloni J. M., Rocha B. A., Bastos J. K., Barbosa F. Jr.: Evaluation of Antigenotoxic Effects of Plant Flavonoids Quercetin and Rutin on HepG2 Cells. Phytother. Res. 2011; 25, 1381-1388.

- (16) Nagasaka R., Chotimarkorn Ch., Shafiqul I. Md., Hori M., Ozaki H., Ushio H.: Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; *358*, 615-619.
- (17) Medina I., Gonzáles M. J., Iglesias J., Hedges N. D.: Effect of hydroxycinnamic acids on lipid oxidation and protein changes as well as water holding capacity in frozen minced horse mackerel white muscle. *Food Chem.* 2009; *114*, 881-888.
- (18) Vitor C., Figueiredo C., Hara D., Bento A., Mazzuco T., Calixto J.: Therapeutic action and underlying mechanism of a combination of two pentacyclic triterpens, α - and β -amyrin, in a mouse model of colitis. *Br. J. Pharmacol.* 2009; *157*, 1034-1044.
- (19) Chicca A., Marazzi J., Gertsch J.: The antinociceptive triterpene β -amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2012; *157*, 1596-1608.
- (20) Simão da Silva K. A. B., Paszcuk A. F., Passos G. F., Silva E. S., Bento A. F., Meotti F. C., Calixto J. B.: Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* 2011; *152*, 1872-1887.
- (21) Liu J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 1995; *49*, 57-68.
- (22) Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H.: Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; *52*, 26-42.
- (23) Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A.: Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance for human nutrition. *J. Sci. Food Agri.* 2000; *80*, 939-966.
- (24) Turpeinen A. M., Kumpu M., Rönnback M., Seppo L., Kautiainen H., Jauhiainen T., Vapaatalo H., Korpela R.: Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. *J. Funct. Foods* 2009; *1*, 260-265.
- (25) Vetter J.: Plant cyanogenic glycosides. *Toxicol.* 2000; *38*, 11-36.
- (26) Takahashi T., Kakehi J.: Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* 2010; *105*, 1-6.
- (27) Veberic R., Jakopis J., Stampar F., Schmitzer V.: European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chem.* 2009; *114*, 511-515.
- (28) „Monograph. *Sambucus nigra* (elderberry)“. *Altern. Med. Rev.* 2005; *10* (1), 51-54.

- (29) Lawrie W., Mclean J., Paton A. C.: Triterpenoids in the bark of elder (*Sambucus nigra*). *Phytochemistry* 1964; 3, 267-268.
- (30) Hemgesberg H.: Černý bez a naše zdraví: květy, listy a plody černého bezu léčí všechny potíže. Olomouc: Fotnána 2002; s. 10-11.
- (31) Kresánek J.: Atlas léčivých rostlín a lesných plodov. Martin: Osveta 1988, s. 58-59.
- (32) Cao G., Sofic E., Prior R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Bio. Med.* 1997; 22, 749-760.
- (33) Galati G., O'Brien P. J.: Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Bio. Med.* 2004; 37, 287-303.
- (34) Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002; 13, 572-584.
- (35) Mascolo N. et al.: Biological screening of Italian medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.* 1987, 1; 28-31.
- (36) Yesilada E. et al.: Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β , and tumor necrosis factor α . *J. Ethnopharmacol.* 1997; 58, 59-73.
- (37) Beaux D., Fleurentin J., Mortier F.: Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. in Rats. *Phytother. Res.* 1999; 13, 222-225.
- (38) Christensen K. B., Petersen R. K., Kristiansen K., Christensen L. P.: Identification of Bioactive Compounds from Flowers of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) that Activate the Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ . *Phytother. Res.* 2010; 24, 129-132.
- (39) Christensen K., et al.: Identification of Plant Extracts with Potential Antidiabetic Properties: Effect on Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR), Adipocyte Differentiation and Insulin-stimulated Glucose Uptake. *Phytother. Res.* 2009; 23, 1316-1325.
- (40) Chrubasik C., Maier T., Dawid C., Torda T., Schieber A., Hofmann T., Chrubasik S.: An Observational Study and Quantification of the Actives in a Supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for Weight Reduction. *Phytother. Res.* 2008; 22, 913-918.

- (41) Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada 2000.
- (42) Rosenfeldt F., Wilson M., Lee G., Kure Ch., Ou R., Braun L., de Haan J.: Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. *Exp. Gerontol.* 2013; 48, 45-54.
- (43) Dawidowicz A. L., Wianowska D., Baraniak B.: The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT-Food Sci. Tech.* 2006; 39, 308-315.
- (44) Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* 2004; 98, 174-179.
- (45) Ledvina M., Cerman J., Stoklasová A.: Biochemie pro studující medicíny. Praha: Karolinum 2004.
- (46) Racek J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Galén 2003.
- (47) Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R.: Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Res.* 2002; 36 (2), 177-187.
- (48) Buřičová L., Réblová Z.: Czech Medicinal Plants as Possible Sources of Antioxidants. *Czech J. Food Sci.* 2008; 26, 132-138.
- (49) Rieger G., Müller M., Guttenberger H., Bucar F.: Influence of Altitudinal Variation on the Content of Phenolic Compounds in Wild Populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56, 9080-9086.
- (50) Barros L., Cabrita L., Boas M. V., Carvalho A. M., Ferreira I. C. F. R.: Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chem.* 2011; 127, 1600-1608.

8. Abstrakt

Cílem této práce bylo prokázat a stanovit antioxidační aktivitu extraktů květů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) a sestavit přehled jejich obsahových látek a účinků. *Sambuci flos* je často využíván v terapii a potravinářství. Hlavními obsahovými látkami jsou flavonoidy, fenolické kyseliny, triterpeny, dále jsou ve květech obsaženy steroly, sliz, silice, třísloviny. Nejvýznamnější jsou flavonoidy, konkrétně rutin a kvercetin, které mohou vykazovat antioxidační, antivirové, protizánětlivé a antikancerogenní vlastnosti. Květy se používají zejména pro diuretické, diaforetické, expektorační, analgetické účinky. Ke stanovení antioxidační aktivity methanolových extraktů květů ze dvou sběrů byla použita metoda DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Výsledky antioxidační aktivity byly vyjádřeny v hodnotách IC_{50} (koncentrace extraktu, která způsobí 50% redukci radikálu). Zjištěné průměrné hodnoty IC_{50} byly 0,79 mg/ml a 0,83 mg/ml. Jednotlivé hodnoty IC_{50} se s vývojem květu plynule měnily, pohybovaly se mezi 1,086 mg/ml a 0,701 mg/ml u obou sběrů. Odchytky mohou být způsobeny pokračující syntézou sekundárních metabolitů.

9. Abstract

Purpose of this thesis was to prove and determine antioxidant activity of flower extracts from black elder (*Sambucus nigra* L.) and compile summary of their content substances and effects. Sambuci flos is often used in natural therapy and food industry. The main content substances are flavonoids, phenolic acids, triterpenoids, further are contained in flowers sterols, mucilage, essential oils, tannins. Flavonoids are the most significant, specifically rutin and kvercetin, because they can show antioxidant, antiviral, anti-inflammatory and anticancer properties. Flowers are used mainly for their diuretic, diaforetic, expectorant, analgetic effects. Method DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) was used for determination antioxidant activity of methanolic flower extracts. Results of antioxidant activity were expressed as IC₅₀ values (concentration of extract which causes 50% reduction of radical). The average observed IC₅₀ values were 0,79 mg/ml and 0,83 mg/ml. The individual IC₅₀ values have changed fluently during development of flowers, they range from 1,086 mg/ml and 0,701 mg/ml in both collections. Deviations can be caused by ongoing synthesis of the secondary metabolites.