UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2016 **MARKÉTA KRULIŠOVÁ**

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Flavonoidy v květech vybraných kultivarů *Sambucus nigra* L.

Diplomová práce

Autor: Markéta Krulišová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent: PharmDr. Jan Martin, PhD.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorský dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 6. 5. 2016 Markéta Krulišová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za její odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování této diplomové práce.

Poděkování za podporu patří i mým nejbližším, a to především mamince. A to nejen při psaní této práce, ale též po celou dobu studia.

Obsah

1 ÚVOD 1
2 CÍL PRÁCE 4
3 TEORETICKÁ ČÁST 5
3.1 Taxonomické zařazení *Sambucus nigra* L 5
3.2 Rod *Sambucus* 5
3.3 *Sambucus nigra* L. 6
3.4 Kultivary bezu černého 7
3.5 *Sambuci nigrae flos* 10
3.6 Obsahové látky květů bezu černého 11
3.6.1 Flavonoidy 12
3.6.2 Hydroxyskořicové kyseliny 13
3.6.3 Další obsahové látky květů bezu černého 14
3.7 Účinky a použití bezu černého 15
3.7.1 Antioxidační účinek 15
3.7.2 Diaforetická aktivita 16
3.7.3 Kardioprotektivní působení 16
3.7.4 Antidiabetické působení 17
3.7.5 Účinky na imunitní systém 19
3.7.6 Antivirová, antibakteriální a antifungální aktivita 19
3.7.7 Ochrana před UV zářením 20
3.7.8 Diuretická aktivita 20
3.7.9 Protirakovinná aktivita 20
3.8 Vedlejší účinky a kontraindikace 21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 22
4.1 Materiál a přístroje 22
4.1.1 Vzorky rostlinného materiálu 22
4.1.2 Použité chemikálie 23
4.1.3 Přístroje 23
4.2 Stanovení flavonoidů v květech 23
4.2.1 Příprava extraktu z drogy 23
4.2.2 Příprava zkoušeného roztoku 24
4.2.3 Příprava kontrolního roztoku 24
4.2.4 Měření absorbance 24

4.3 Výsledky 25
4.4 Statistické zpracování dat 28
4.4.1 Test statistické významnosti rozdílů mezi kultivary 28
4.4.2 Bonferroniho test – zjištění statistické významnosti rozdílů mezi dvojicemi kultivarů 31
5 DISKUSE 34
6 ZÁVĚR 37
7 ABSTRAKT 38
8 ABSTRACT 39
9 LITERATURA 40

1 ÚVOD

Fytoterapie - terapie pomocí léčivých rostlin, která je stará jako lidstvo samo. Z dochovaných zdrojů lze s jistotou usuzovat, že lidé využívali léčebné účinky rostlin odpradávna. Na samém počátku se člověk zřejmě řídil instinkty tak, jako je tomu u zvířat, která záměrně vyhledávají rostliny, které jim pomáhají a naopak se vyhýbají těm, které by jim uškodily. V počátcích víry v duchy a démony se negativních sil lidé zbavovali pomocí zaříkávacích formulí a vytvářením nejrůznějších lektvarů. Do vytvoření prvního písma se tyto recepty a formule předávaly výhradně ústně, což je také důvodem pro pouze minimum dochovaných informací z té doby.

Ze starověkých civilizací jako jsou Indie, Čína, Mezopotámie, Egypt, Řecko a Řím se již dochovalo spoustu písemností poukazujících na léčivou moc rostlin. Za zmínku stojí například knihy Ben Lao od Šen Nunga, Ebersův papyrus, Materia medica od Dioskorida a Historia plantarum od Theophrasta z Eresu, kterému bývá přisuzován objev podstaty šlechtění rostlin.

Období mezi 8. a 12. stoletím bylo dobou tzv. klášterního léčitelství. I zde našly léčivé rostliny hojného uplatnění. Nejdříve se sbíraly v okolí klášterů a později se začaly pěstovat přímo na klášterních zahradách. V souvislosti s křesťanským misionářským úsilím docházelo v tomto období k potírání lidového léčitelství. Nebylo neobvyklé ani použití drastičtějších inkvizičních metod a obviňování lidových léčitelů z čarodějnictví.

Dále ve středověku se těžiště lékařství přesouvá z klášterů do nově zakládaných světských univerzit. Nástup knihtisku v 15. století usnadnil vydání mnohých knih zabývajících se problematikou léčivých rostlin. Za zmínku stojí Gart der Gesundheit, vydaná v roce 1485. Toto dílo sice obsahuje řadu chyb, ovšem stalo se předlohou pozdějších bylinářů, vycházejících až do počátku 19. století. Zajímavá je též myšlenka, se kterou přišel Paracelsus: „Příroda vykresluje každou bylinu, která vycházejíc z ní napovídá, k čemu je dobrá.“

Díky rozvíjejícímu se obchodu s léčivými rostlinami a drogami bylo nutné stanovit standardy, které by zaručily stejnou míru kvality a účinnosti přípravků připravovanými různými lékaři a lékárníky. V roce 1498 vznikl ze snah cechu florentských lékárníků první lékopis, kterým se měli řídit všichni lékárníci.

V 17. a 18. století se do Evropy díky kolonizaci Ameriky dostávají rostliny používané indiánskými národy. V Severní Americe se rostlinným léčitelstvím zabývali tzv. kvakeři, příslušníci jedné z evangelických církví. Ti svým zahradničením a hospodařením vlastně

položili základy průmyslu léčivých rostlin. Postupem času vyváželi tuny sušených drog a extraktů do celého světa. Tak tomu bylo až do konce 19. století, kdy rozvoj industrializace způsobil úpadek zájmu o přírodní léčebné prostředky.

Snahy o zjištění chemického složení účinných látek rostlin byly úspěšné až na počátku 19. století, kdy se německému lékárníkovi Friderichu Wilhelmu Adamu Sertürnerovi podařilo izolovat morfin jako účinnou látku z opia. Někteří lékárníci začali produkovat čisté substance ve větším měřítku, čímž položili základy farmaceutickému průmyslu. [1]

I když izolované substance nabízely řadu výhod, jako například konstantní kvalitu, přesné dávkování a možnost syntetické modifikace struktury ke zlepšení různých farmakologických vlastností látek, postupem času se potvrdil již dříve uváděný názor, že komplexní drogy jsou někdy účinnější než izolované účinné látky.

I v dnešní době syntetických léčiv je terapie pomocí léčivých rostlin stále populární. Některé rostliny popisované již starověkými autory jsou používány dodnes. Patří k nim i bez černý, kterému se v této diplomové práci věnuji. O jeho dlouhodobém používání svědčí i množství mýtů a pověr, které se k němu váží.

Rostlinu černého bezu nazývali Germáni jako Holunder, nebo také jako „strom Holdy“, což byla víla středověkého germánského lidu, která byla často vyobrazována jako mladá dobrotivá žena s dlouhými zlatými vlasy, která bydlela v rostlině černého bezu. V rostlině neměla údajně přebývat víla Holda sama, společnost jí dělali skřítci a elfové. [2]

V germánských legendách se též objevuje kouzelná flétna, což měla být bezová větévka s vydlabanou dužninou, jejíž zvuky chránily před kouzly. Větévka se ovšem musela uříznout na místě, kde nebylo slyšet zpěvu kohouta, protože jinak by byl zvuk flétny stejně chraplavý jako kohoutí kokrhání. [2]

V minulosti se věřilo, že černý bez chrání domy, dvory, dobytek a obyvatele před hady, nemocemi a kouzly. Z tohoto důvodu se v okolí usedlostí, klášterů a pevností právě tyto rostliny sázely. Tento zvyk je možné pozorovat též v Británii, Dánsku a Rusku, kde byl bez považován za ochránce rodiny.

Až do konce devatenáctého století chodily těhotné ženy ve Švédsku políbit rostlinu černého bezu, což jim mělo zajistit dobrý průběh těhotenství. Na Sicílii lidé věřili, že bezová hůlka odhání zloděje a má schopnost usmrtit hady. V Srbsku a Volyni (oblast na severozápadě Ukrajiny) se nosila bezová hůl o svatbě, jako znamení přinášející blahobyt. V Lotyšsku se tvrdilo, že pod kořeny keře bydlí bůh země Puschkaitis.[3]

V keltském stromovém kalendáři symbolizuje černý bez třináctý lunární měsíc, který se završuje ve dnech okolo zimního slunovratu. Dá se to vysvětlit tím, že bez uchovává své plody až do prosince. Číslo třináct je též považováno za magické číslo symbolizující plynutí času, cyklické znovuobnovování a tudíž též smrt ve věčném cyklu proměny a obnovy.[4]

V křesťanské tradici zastával černý bez po určitou dobu úlohu při obřadech spojených se smrtí. Když přišel hrobník do domu zemřelého, kladl mu na hlavu věnec z různých částí rostliny – v závislosti na ročním období jako účinné viatikum na cestu na věčnost.

Další příběhy vyprávějí o tom, že se nejedná o ledajaký keř či stromek, nýbrž přímo o čarodějnici v podobě rostliny. Holda se prý kdysi zjevovala nejen jako mladá žena se zlatými vlasy, ale též jako stará a rozcuchaná čarodějnice. [5]

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit obsah flavonoidů v květech jedenácti vyšlechtěných kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.), výsledky statisticky vyhodnotit a vypracovat přehled obsahových látek a účinků květů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Taxonomické zařazení *Sambucus nigra* L.

Říše:	Plantae
Podříše:	Tracheobionta
Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Asteridae
Řád:	Dipsacales
Čeleď:	Adoxaceae [6], Sambucaceae [8] (dříve též Caprifoliaceae [12] nebo Loniceraceae[13]) [7]
Rod:	*Sambucus* L.
Druh:	*Sambucus nigra* L. [12]

3.2 Rod *Sambucus*

Rod *Sambucus* L., bez, zahrnuje asi čtyřicet druhů vyskytujících se v mírném a subtropickém pásu obou polokoulí [7] (mimo střední a jižní Afriku) [10].

Rostliny rodu *Sambucus* jsou vytrvalé byliny, opadavé keře nebo stromy s mělkým a do rozložité plochy uspořádaným kořenovým systémem nebo podzemními výběžky. Mají silné větve s bohatě vytvořenou dření a nápadnými dýchacími průduchy, odborně nazvanými lenticely. Jejich listy jsou vstřícné, lichozpeřené, řapíkaté, palistnaté, s přeměněnými palisty nebo jim palisty zcela chybí. Mají koncová květenství, nejčastěji tří- až pětiramenné vrcholíky nebo vrcholičnaté laty. Jejich květy jsou malé, bílé, žlutavé až zelenavě bílé, kalich i koruna většinou pěticípé. Z koruny vyčnívají tyčinky se žlutými nebo fialovými prašníky. Plodem je dužnatá peckovice kulovitého tvaru s pěti peckami, černé nebo červené barvy. Plodenství mají přímá nebo nicí. [10]

Ze všech druhů rodu *Sambucus* jsou v České republice domácí pouze tři: *Sambucus ebulus* L. – bez chebdí, *Sambucus racemosa* L. – bez červený a *Sambucus nigra* L. – bez černý. Jako zdroj léčivé suroviny se ovšem využívá pouze *Sambucus nigra* L. Používání *Sam-*

bucus ebulus L. je již obsolentní a tento druh je v současnosti považován za toxický. Jeho toxicita je způsobena obsahem nedefinovaných pryskyřičných látek, které jsou obsaženy zejména v čerstvých plodech a způsobují nevolnost a pocit na zvracení. Stejně tak se nevyužívá ani druh *Sambucus racemosa* L. Obsahuje totiž větší množství kyanogenního glykosidu sambunigrinu, který může způsobit bolest hlavy či nevolnost. [7]

K rozlišení bezu černého od bezu červeného nebo chebdího nám mohou pomoci následující znaky. Květenství bezu černého má špinavě bílou až světle žlutou barvu [9], prašníky jsou žluté [10]. Na rozdíl od něho má bez chebdí jednotlivé květy zvenku narůžovělé a prašníky tyčinek mají nachovou barvu. Bez červený má kvítky slabě zelenavé a prašníky tyčinek žluté. [9] Odlišit dané druhy můžeme také pomocí vzhledu plodů. Bez červený má, jak už samotný název vypovídá, bobule korálovitě červené, uspořádané v chomáčcích. Bez chebdí má bobule modře fialové. Plody bezu černého jsou černé až černofialové. [14]

Dalším poznávacím znakem bezu černého je bílá dřeň uvnitř větví, zatímco bez červený má dřeň oranžovočervenou. [15]

3.3 *Sambucus nigra* L.

Černý bez roste ve formě bohatě větveného keře nebo stromu vysokého 1,5 – 10 m. Má dlouhé vodorovné oddenky. Jeho větve jsou u mladé rostliny lysé nebo místy krátce chlupaté, zelené až šedozelené barvy s četnými tmavými podlouhlými lenticelami. Starší větve mají šedozelenou až šedohnědou barvu s nepravidelně rozbrázděnou borkou. [10] Bezová kůra má jednu z nejvyšších kapacit zadržování vody, což je příčinou častého výskytu epifytů jako jsou mechorosty a lišejníky. [16] Dřeň v bezových větvích je bílá, měkká a dá se snadno vydlabat. [17]

Pupeny jsou vejcovitého tvaru a v dolní polovině chráněny zelenými až červenohnědými šupinami. Listy jsou lichozpeřené, obrys čepele může být eliptický, vejčitě až obvejčitě eliptický, lístky jsou kopinaté až vejčitě kopinaté, vzácněji eliptické, mnohdy nesymetrické. Jejich okraje jsou pilovitě zubaté, tmavozelené, na svrchní straně až lysé, zatímco na straně spodní mají sivozelenou až šedavou barvu a jsou především na žilkách jemně chlupaté. Mají krátký řapík a po rozemnutí nepříjemnou vůni.

Květenství jsou chocholičnatá, bílé nebo slabě nažloutlé květy bývají uspořádány v mnohokvětých, zpravidla 3 – 5 ramenných vrcholících, které mívají 10 – 25 cm v průměru. Z opylených květů se tvoří 5 – 8 mm velké černofialové až černé kulovité peckovice se 3 – 5 semeny. Tyto peckovice poté vytvářejí nicí plodenství.

Variabilita rostliny v přírodě se projevuje zejména ve tvaru, velikosti a zabarvení listů, barvě květů, velikosti květenství nebo semen. Většina těchto odchylek je stálých. Taxonomická hodnota těchto odchylek je ovšem pravděpodobně nízká.

Rostlina je rozšířena téměř po celé Evropě, vyjma severních oblastí Skandinávie a převážné většiny Ruska a odtud podél Černého moře na Kavkaz a ke Kaspickému jezeru. Kromě toho byl zavlečen a je pěstován na řadě dalších míst, jako například Kypr nebo severní Afrika.

V České republice je rozšířen s výjimkou nejvyšších poloh po celém území. [10] Můžeme ho najít v listnatých lesích, křovinách a především v blízkosti lidských obydlí. [17, 18] Nejvíce mu vyhovují neutrální nebo kyselejší humózní půdy dobře zásobené živinami, zejména dusíkem. Setkat se s ním ovšem můžeme i na půdách chudých a lidskou činností zdevastovaných. Výjimku tvoří trvale zamokřená stanoviště a vysoce zásaditá půda. Pro pěstování černého bezu je důležité množství srážek a jejich rozložení v době vegetace. Pro růst a plodnost je nezbytný minimální roční srážkový úhrn v našich podmínkách 500 mm s těžištěm výskytu během vegetace. Na počasí též závisí počátek doby kvetení, která se většinou pohybuje okolo druhé poloviny května či první půlky června. Období sklizňové zralosti přichází v našich podmínkách na počátku srpna až v polovině října. [19]

3.4 Kultivary bezu černého

Šlechtění rostlin je záměrná lidská činnost, jejímž cílem je vznik nových, případně zlepšení těch stávajících odrůd rostlin. Takto vznikají kultivary, které mají předpoklady k získání optimálních a námi požadovaných znaků a vlastností. Účelem šlechtění může být například zvýšení schopnosti nebo kvality produkce, vyšší odolnost proti chorobám a další. Odrůdy

musí být uniformní s projevem určitého znaku a musí být beze změny rozmnožovatelné, tudíž rostlina v příští generaci by měla být stejná. [20]

V současnosti existuje již více než 20 odrůd černého bezu, pěstují se pro získávání plodů nebo k okrasným účelům. Většina odrůd, které se využívají k ovocnářským účelům, pochází z Rakouska a Dánska. U nás doposud nebyla vyšlechtěna žádná odrůda.

K nejvýznamnějším zemím z hlediska pěstování bezu patří: Maďarsko, Německo, Slovensko, Polsko, Švýcarsko, Itálie, Španělsko, Portugalsko, ale i Kanada a USA.

Různé odrůdy bezu černého se liší jak v hospodářských, tak i fenologických znacích. Kulturně pěstované odrůdy bezu černého mají oproti planě rostoucím rostlinám vyšší výnosnost plodů. Rozdíly mezi jednotlivými pěstovanými odrůdami můžeme pozorovat v oblasti výnosového potenciálu, křivky plodnosti, doby zrání, odolnosti dřevin, chemického složení plodů, schopnosti rovnoměrného dozrávání, senzorického hodnocení a dalších. [21] U nás se problematikou kultivarů bezu černého zabývá Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

VŠÚO Holovousy s.r.o. podrobil zkoumání hospodářských znaků v prvním roce po výsadbě 17 kulturních odrůd bezu černého. Mezi nimi i odrůdy, které jsou uvedeny v experimentální části této práce – vyjma kultivaru ‘Juicy’. Odrůdy se od sebe lišily ve výnosovém potenciálu. Značné rozdíly bylo možné pozorovat jak v počtu plodenství, tak i jejich hmotnosti. Velký počet i vysoká hmotnost plodenství byla zaznamenána u kultivaru ‘Sambu’ a ‘Allesö’. Nízký počet plodenství s vysokou hmotností měly odrůdy ‘Sampo’, ‘Heidegg 13’, ‘Riese aus Voßloch’, ‘Samyl’. Nízký počet plodenství s nadprůměrnou hmotností byl pozorován u odrůd ‘Dana’, ‘Samdal’ a ‘Samyl’. Nízký počet plodenství se zároveň i nízkou hmotností měla odrůda ‘Albida’.

Nejvyšší průměrný počet plodenství se zároveň nejvyšší průměrnou sklizní z jednoho keře měla odrůda ‘Sambu’. Nejvyšší průměrná hmotnost plodenství byla zjištěna u kultivaru ‘Heidegg 13’. Naopak nízký průměrný počet plodenství s nízkou průměrnou hmotností a zároveň nejnižší průměrná hmotnost sklizně z jednoho keře byla zaznamenána u kultivaru ‘Albida’.

Na základě těchto výsledků byly pro podmínky v České republice vybrány jako odrůdy s nejvyšším výnosovým potenciálem v prvním roce po výsadbě odrůdy ‘Sambu’ dále pak ‘Sampo’ a ‘Allesö’. [22]

Všechny mnou zkoumané odrůdy mají začátek kvetení v polovině června. Nejdříve kvetou kultivary ‘Sampo’ a ‘Sambu’, zatímco nejpozději ‘Heidegg 13’ a ‘Aurea’. Nejvyšší násada květů a následně plodů byla zaznamenána u odrůdy ‘Sambu’. Naopak nejméně květů a následně plodů bylo pozorováno u kultivarů ‘Albida’ a ‘Heidegg 13’. Jako první dosáhla sklizňové zralosti odrůda ‘Sampo’ a jako poslední ‘Albida’. [23]

Jak již bylo uvedeno výše, zkoumání byly podrobeny rostliny v prvním roce po výsadbě, což znamená též na počátku své plodnosti. V následujících letech, po dosažení plné plodnosti rostlin, se proto tyto výsledky mohou lišit. [22, 23]

Dalším důvodem proč pro produkci plodů upřednostnit pěstování černého bezu je to, že planě rostoucí bezy se mohou vyskytovat v blízkosti dopravních komunikací, kde jsou rostliny vystavovány různým exhalátům, které následně významně ovlivňují jejich chemické složení. Studie provedená v Polsku potvrdila, že čím blíže se rostlina frekventovaným dopravním cestám nacházela, tím méně flavonoidů a naopak více Fe, Zn, Cu, Cr, Cd, Pb a Mg v květech obsahovala. [24]

Obrázek 1: Bez černý - kultivar Sambu, autor Ing. Aleš Matějíček, Ph.D.

3.5 *Sambuci nigrae flos*

Černý bez poskytuje dle Českého lékopisu 2009 lékopisnou drogu *Sambuci nigrae flos*, což je usušený květ bezu černého. [25]

Jako zkoušky totožnosti stanovuje Český lékopis 2009 makroskopické a mikroskopické vyšetření drogy a též identifikaci obsahových látek pomocí tenkovrstvé chromatografie. Makroskopická zkouška definuje drogu jako pětičetný, krátce stopkatý květ o průměru asi 5 mm. Droga má malý kalich s pěti kališními lístky (ušty). Koruna je světle žlutá, kulovitá, široce oválné korunní lístky jsou na bázi srostlé. Květ má žluté tyčinky, jejichž nitky se střídají s korunními lístky. Koruna se vyskytuje často samostatně, nebo spolu s na bázi koruny přirostlými tyčinkami. Květ má spodní trojpouzdrý semeník s přisedlou trojlaločnou bliznou.

Mikroskopicky jsou pro drogu charakteristická četná pylová zrna kulovitého či oválného tvaru o průměru asi 30 μm. Pylová zrna mají tři klíční póry a velmi jemně tečkovanou exi-

nu. Pokožka kalicha obsahuje buňky s rýhovanou kutikulou, zřídka můžeme pozorovat též jednobuněčné kuželovité krycí chlupy na okraji bazální části lístků. Časté jsou úlomky koruny s malými kapkami silice a buňky pokožky se zprohýbanými stěnami, které jsou na svrchní straně slabě ztlustlé s rýhovanou kutikulou. V mezofylu koruny a kalicha můžeme pozorovat idioblasty s četnými pískovitými krystaly šťavelanu vápenatého.

Zkouška totožnosti pomocí tenkovrstvé chromatografie určuje nutnost přítomnosti tří skvrn na silikagelu pozorovaném pod ultrafialovým světlem při 365 nm. Jedná se o intenzivní modrou skvrnu kyseliny chlorogenové a dvě oranžové skvrny – rutinu a isokvercitrinu. Český lékopis 2009 též udává polohy skvrn oproti skvrnám na porovnávacím chromatogramu a říká, že zkoušený chromatogram může obsahovat další slabě zbarvené skvrny. V denním světle je možné pozorovat pouze skvrny oranžové barvy.

Mezi zkoušky na čistotu patří jak již výše zmíněná zkouška tenkovrstvé chromatografie, tak též zkouška na cizí příměsi, ztrátu sušením a celkový popel.

Zkouška na cizí příměsi povoluje nejvýše 8% úlomků květních stopek a ostatních cizích příměsí a maximálně 15 zhnědlých květů v 10 g drogy.

Zkouška na ztrátu sušením požaduje nejvyšší ztrátu 10% hmotnosti při sušení 1, 000 g upráškované drogy po dobu 2 hodin v sušárně při 100 – 105°C.

Celkový popel je stanoven na maximálně 10%.

Droga *Sambuci nigrae flos* by měla obsahovat nejméně 0,80 % flavonoidů počítáno jako isokvercitrin. Stanovení obsahu se provádí pomocí spektrofotometrie. [25]

3.6 Obsahové látky květů bezu černého

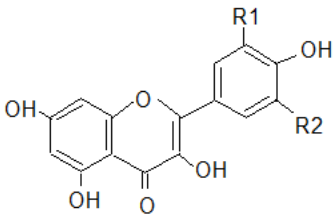
Droga obsahuje celou řadu látek, které mají podíl na jejím celkovém účinku. Hlavními skupinami látek jsou flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny. K dalším významným látkám patří triterpeny, steroly, silice, [26] třísloviny, sliz, cukry a další. [13]

3.6.1 Flavonoidy

V květech černého bezu se vyskytují především flavonoly. [27] Zastoupeny bývají především aglykony kempferol a kvercetin a kvercetinové glykosidy rutin, isokvercitrin a hyperosid.[28] Flavonoidy disponují například antioxidační, antiproliferační [29] a antibakteriální [30] aktivitou.

Přehled flavonoidů obsažených v květech bezu černého je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 Flavonoidy vyskytující se v květech bezu černého

Název flavonoidu	Struktura	Citace
Astragalin (kempferol-3-O-glykosid)	Flavonoidy: Kempferol R1= R2 = H Kvercetin R1= OH R2 = H Isorhamnetin R1 = OCH_3 R2 = H 	32, 51
Hyperosid (kvercetin-3-O-galaktosid)		28, 32
Isokvercitrin (kvercetin-3-O-glukosid)		27, 28, 31, 32, 33, 51
Isorhamnetin-3-O-glukosid		27, 31, 33, 51
Isorhamnetin-3-O-rutinosid		31, 33, 51
Kempferol		28, 32
Kempferol-3-O-rutinosid		27, 31, 32, 33, 51
Kvercetin		28, 32
Kvercetin-3-O-(6 ‘‘-acetyl)-glykosid		31, 33, 51
Kvercetin-3-O-rhamnosid		32
Rutin (kvercetin-3-O-rutinosid)		27, 28, 31, 32, 33, 51

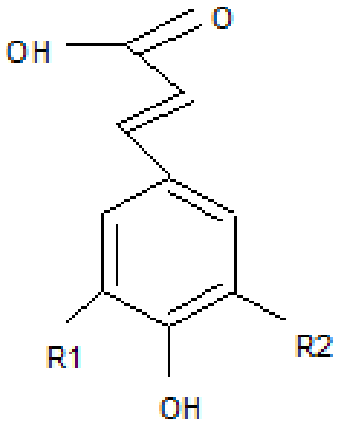
3.6.1.1 Skladování a stabilita flavonoidů

Výzkum ukázal, že z hlediska obsahu flavonoidů a fenolických kyselin hraje skladování rostlinného materiálu a obalový materiál pouze malou roli. Polyfenoly v čaji tvořeném usušenými květy černého bezu jsou relativně stabilní po dobu 21 měsíců a jejich obsah je závislý na volbě kultivaru. Pro zachování vlastností čaje autor vyhodnotil jako nejlepší obalový materiál takový, který byl založený na hliníkové fólii. [33]

3.6.2 Hydroxyskořicové kyseliny

Další významnou skupinou látek obsaženou v květech bezu jsou hydroxyskořicové kyseliny. Jejich obsah v květech se pohybuje až okolo 3 %. Nejčastěji bývají zastoupeny: kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová a p-kumarová kyselina. [26] Významnost těchto sloučenin tkví v jejich často zkoumané antioxidační [34, 35, 36], antigenotoxické [37] a antibakteriální [38] aktivitě. Přehled látek typu hydroxyskořicových kyselin vyskytujících se v květech černého bezu je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Hydroxyskořicové kyseliny vyskytující se v květech černého bezu

Hydroxyskořicová kyselina	Struktura	Citace
kafeoylchinová	Hydroxyskořicové kyseliny: kys. p-kumarová R1 = R2 = H kys. kávová R1 = OH R2 = H kys. ferulová R1 = OCH_3 R2 = H 	27
3-O-kafeoylchinová		31, 33, 51
Cis 3-O-kafeoylchinová		27, 51
4-O-kafeoylchinová		31, 51
5-O-kafeoylchinová		27, 28, 31, 32, 33, 51
1,5-di-O-kafeoylchinová		31, 33, 51
3,4-di-O-kafeoylchinová		31, 33, 51
3,5-di-O-kafeoylchinová		27, 31, 33, 51
4,5-di-O-kafeoylchinová		31, 33, 51
3-O-p-kumaroylchinová		27, 31, 33, 51
5-O-p-kumaroylchinová		31, 33, 51
Cis 5-O-p-kumaroylchinová		27, 51
Trans 5-O-p-kumaroylchinová		27, 51

3.6.3 Další obsahové látky květů bezu černého

V květech bezu byly prokázány též kyselina gallová nebo vanilinová. [39]

K dalším obsahovým látkám patří triterpeny. Květy jich obsahují okolo 1%, jedná se zejména o α- a β-amyrin, ursolovou a oleanolovou kyselinu.

V množství kolem 1% jsou zastoupeny také steroly jako stigmasterol, kampesterol a β-sitosterol.

Květy obsahují též až 0,15% silice, [26] která se skládá z větší části z mastných kyselin jako je kyselina linolová, linolenová nebo palmitová a z menší části též z alkanů.[28]
Za charakteristickou vůni květů černého bezu jsou patrně zodpovědné následující sloučeniny: cis-rose oxid, nerol oxid, nonanal a hotrienol. Další složky silice jako linalool, α-terpineol, (Z)-β-ocimen a 4-methyl-3-penten-2-on jsou nositelé květinové vůně. Pentanal, heptanal a β-damascenon ovocné vůně a hexanal, hexanol a (Z)-3-hexenol svěží a travnaté vůně. Vůni „po houbách“ má 1-okten-3-on a okten-3-ol a vůni po mentholu a peprmintu obstarává 1,8-cineol. Lékořicový podtón dodává 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaftalen.[40]

Z dalších látek můžeme v květech najít též sliz, třísloviny, cukry [13] nebo proteiny [28], ethery, ketony, aldehydy, estery, oxidy, alkoholy [41] a aminy. [42]

V extraktech z květů byly nalezeny acyl spermidiny, které mají původ v pylových zrnech. Mají obrannou funkci proti virům, bakteriím a houbám. [43, 44]

Ačkoli není černý bez považován za toxickou rostlinu, literatura uvádí výskyt kyanogenních glykosidů, převážně sambunigrinu, prunasinu, holocainu a zierinu, které se během trávení mění na kyanovodík a tím způsobují nevolnost a řadu zdravotních problémů. [45]
Tepelná úprava vede k rozkladu sambunigrinu, takže konzumace částí rostliny vystavených tepelnému zpracování již nezpůsobuje symptomy otravy. [46]

3.7 Účinky a použití bezu černého

Už množství pověr o černém bezu napovídá, že tato rostlina byla velmi hojně využívána v lidovém léčitelství. Zpracovávány byly téměř všechny části rostliny – květy, listy i kůra. Zajímavostí je, že dnes ceněné plody se v minulosti využívaly spíše jako potravina než léčivý prostředek. [14]

Rostlina našla uplatnění u řady nemocí jako například při: nachlazení doprovázeném zvýšenou teplotou, chorobách močového ústrojí, onemocnění dýchacích cest, nemocech dásní a ústní a nosohltanové sliznice, revmatismu, bolestech nervového i revmatického původu, zácpě a zadržování vody v těle. [11] Další zdroje uvádí též využitelnost při kožních nemocech a špatně se hojících ranách, dně [14], konjunktivitidě, diabetu [47, 48, 49] a řidčeji též pro zvýšení laktace. [1]

Květenství též sloužilo k přípravě nápojů, nebo se pojídalo smažené. Z plodů se připravovaly zavařeniny, povidla, šťávy, ale i vína či likéry. Uplatnění také našly při dobarvování vína či jiných potravinářských výrobků. [10, 50]

I v současné době se květ černého bezu těší velké oblibě. Výsledky studií poukazují na zdraví prospěšnost jeho používání. Byl prokázán jeho antioxidační účinek, protektivní působení při respiračních obtížích, nachlazení a obezitě. Dále byl potvrzen významný dopad na imunitní systém, antivirová a antibakteriální aktivita a též ochrana před UV zářením. [51]

3.7.1 Antioxidační účinek

Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako je hydroxylový radikál, peroxid vodíku, nebo radikál oxidu dusnatého jsou zodpovědné za poškození buněk díky jejich efektu na proteiny, DNA a peroxidaci lipidů. Změnou oxidativní balance buněk způsobují jejich poškození a hrají tak důležitou roli při vzniku mnoha onemocnění jako ateroskleróza, reperfúzní poškození, kataraktogeneze, revmatoidní artritida, neurodegenerativní, kardiovaskulární, zánětlivá onemocnění a rakovina. Kromě již zmíněných příkladů jsou radikály příčinou i samotného procesu stárnutí. [52]

V posledních letech ukázaly epidemiologické studie inverzní korelaci mezi zvýšenou konzumací antioxidantů jako jsou polyfenoly a rizikem vzniku některých z výše uvedených onemocnění vyvolaných oxidativním stresem. [53, 54] Polyfenoly se chovají jako tzv. scavengers, zhášeče volných radikálů, čehož docílí mimo jiné také inhibicí různých enzymů. [55]

Antioxidační aktivita černého bezu a produktů z něj vyrobených byla potvrzena pomocí *in vitro* antiradikálových testů. Tuto aktivitu vykazují jak květy, tak i plody a listy. [56]
Antiradikálové studie byly provedeny s extraktem z květů proti DPPH radikálu (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazil) [57, 58], hydroxylovému radikálu a též proti lipidové peroxidaci v emulzi linolenové kyseliny. [58]
Potvrdila se korelace mezi obsahem polyfenolů a antioxidačními vlastnostmi. Bylo také zjištěno, že květy obsahovaly více polyfenolů než plody sklizené na stejném území a jejich obsah byl závislý na oblasti původu. [59]

3.7.2 Diaforetická aktivita

Květ černého bezu má schopnost zvýšit odpověď potních žláz na tepelný podnět. Zároveň byla zaznamenána zvýšená diaforéza u zdravých subjektů při podání této drogy. [60]

3.7.3 Kardioprotektivní působení

Přestože se květy černého bezu lidově užívají jako součást čajových směsí i při kardiovaskulárních obtížích, studie příznivého vlivu byly provedeny pouze s extrakty z plodů. Tam se však na protektivním působení podílejí též anthokyany, které v květech obsaženy nejsou.

Výsledky mnoha studií poukazují na přínosný efekt extraktu z plodů bezu na hladinu krevního tlaku, redukci oxidativního stresu, zvýšení aktivity antioxidačních enzymů v krevní plazmě včetně glutathionu a redukci hladin kyseliny močové [61, 62, 63, 64], jejíž zvýšená hladina je spojena s hypertenzí a vaskulárními změnami. [65]
Jedním z mechanismů, zodpovědných za ochranný efekt extraktu proti vaskulárním chorobám, je též schopnost polyfenolů penetrovat do endoteliálních buněk. [67] Další studie uvádí, že pozitivní efekt polyfenolů v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami je pravděpo-

dobně spojen s jejich schopností zvýšit antioxidační kapacitu krevní plazmy a předcházet oxidaci LDL a agregaci destiček. [33]

Výsledek studie na krysách trpících hypertenzí poukazuje na vyšší antioxidační aktivitu a příznivý lipidový profil v séru těchto krys po konzumaci krmení s obsahem polyfenolů z plodů bezu. [64] Došlo u nich jak ke snížení celkového cholesterolu, triacylglycerolů, tak i LDL - lipoproteinů. [68] Další studie, která byla provedena na zdravých krysách, ovšem uvádí, že po podávání extraktu z bezinek v množství korespondujícím s denním příjmem nebylo výrazněji ovlivněno lipidové spektrum v séru. [69]

Jiná studie prokázala protektivní efekt polyfenolů vůči tokoferolu během Cu^{2+} - katalyzované LDL oxidace v přítomnosti extraktu z plodů bezu. Přídavek bezového extraktu způsobil zpoždění oxidace LDL-lipoproteinů, ačkoli byl v některých případech pozorován i efekt prooxidativní, což záviselo na době přidání extraktu. [70]

3.7.4 Antidiabetické působení

Diabetes mellitus je onemocnění, které se ve většině případů vyskytuje spolu s dalšími příznaky metabolického syndromu jako je hypertenze, dyslipidemie a obezita. [71] Toto onemocnění vede k patologickým změnám v cévním systému, což je příčinou následného poškození vnitřních orgánů. Léčba diabetu je založena především na změně životního stylu, dietě a cvičení. [72] Řádná dieta při léčbě diabetu by měla obsahovat zvýšené množství potravin bohaté na polyfenoly. Výsledky ukázaly snížení glykémie u krys trpících diabetem po podávání extraktu z plodů černého bezu. [61] Tento extrakt také významně snížil stupeň glykosylovaného hemoglobinu (HbA1c) u diabetických krys a toto snížení poukazuje na snížení komplikací spojených s nemocí. Diabetes mellitus 2. typu je charakterizovaný poškozenou sekrecí a účinkem inzulinu. V počátečním stádiu nemoci je pozorována chybná odpověď tkání na inzulin. Proto organismus ve snaze udržet normální hladiny glykemie začne zvyšovat množství sekretovaného inzulinu. Pokud tento stav trvá delší dobu, následuje ztráta produkce inzulinu β-buňkami pankreatu, což vede k vývoji diabetu. [73] Role extraktu z květů černého bezu v prevenci a léčbě diabetu by mohla zahrnovat zvýšení vychytávání glukózy ve svalech a samotné zvýšení sekrece inzulinu. [74]

Výsledky výzkumu ukázaly, že schopnost stimulovat vychytávání glukózy je způsobena přítomností polyfenolických sloučenin vyskytujících se v květech bezu černého. Tato schopnost je závislá na jejich koncentraci. Jedná se o sloučeniny jako je kyselina 5-O-kafeoylchinová, naringenin, kempferol, kyselina ferulová nebo kyselina kávová. Již zmíněný naringenin je flavanon, jehož enantiomery inhibují cytochrom P450, který se podílí na metabolizaci léčiv. Zároveň je naringenin jednou z hlavních sloučenin podílejících se na zvýšeném vychytávání glukózy v adipocytech a sníženém ukládání tuků. [75] Vodný extrakt květů (1 g/l) zvýšil v *in vitro* abdominálních svalech myši vychytávání glukózy o 70%, oxidaci glukózy o 50% a glykogenezi o 70%. [76] Dále bylo zjištěno, že sekrece inzulinu pomocí klonovaných β-buněk pankreatu se působením tohoto extraktu zvýšila, což zvýšilo i jeho koncentraci. Na druhou stranu se ovšem prokázalo, že vybrané sloučeniny z květů jako lektin, rutin, lupeol, β-sitosterol, cholin a třísloviny v koncentracích od 0,5 do 50 μg/ml neměly na zlepšení sekrece inzulinu vliv. [77]

Bylo prokázáno, že v methanolovém extraktu z květů černého bezu jsou přítomni agonisté receptoru PPAR γ – kyselina linolenová, linolová a naringenin. U posledně zmíněného bylo zjištěno, že aktivuje tyto receptory bez stimulace diferenciace adipocytů. Na rozdíl od těchto sloučenin nebyly kvercetin-3-O-rutinosid, kvercetin-3-O-glukosid, isorhamnetin-3-O-rutinosid, isorhamnetin-3-O-glukosid, 5-O-kafeoylchinová kyselina a kempferol-3-O-rutinosid schopny receptor aktivovat. Toto zjištění vede k úvaze, že flavonoidní glykosidy nejsou schopny na rozdíl od některých aglykonů receptor aktivovat. [78]

Jeden z hlavních faktorů, který hraje roli při vzniku inzulinové resistence je obezita. [79] Sloučeniny přítomné v extraktu z květů černého bezu snížily v *in vivo* modelu (*Caenorhabditis elegans*) akumulaci tuků. Výrazné snížení bylo pozorováno při koncentraci 200μg/ml extraktu. [74]

V dalších studiích byla do diety dobrovolníků přidána šťáva z plodů bezu obohacená o extrakt z květů a následně byl u těchto jedinců zaznamenán jak úbytek váhy, zlepšení body mass indexu (BMI), tak i duševní pohody. Obsah tuků v organismu těchto jedinců byl průměrně snížen o 1%. [81]

3.7.5 Účinky na imunitní systém

V závislosti na typu extraktu (z listů nebo květů) a použitém rozpouštědle byla pozorována buď biosyntéza, nebo inhibice IL-1α, IL-1β a TNF-α. [82]

Účinky na imunitní systém byly zatím více pozorovány u extraktů z plodů, který má potenciál ovlivňovat obranné mechanismy jak ve zdravém, tak i chorobou trpícím organismu. Bylo zjištěno, že tento extrakt stimuloval produkci prozánětlivých cytokinů IL-1β, IL-6, IL-8 a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF-α), ale i protizánětlivého cytokinu IL-10.[83]
Jiný zdroj uvádí, že extrakt z plodů bezu zvýšil produkci interferonu beta (IFN-β), se kterým je spojena up-regulace toll-like receptoru 3 (TLR-3) [84], dále též TNF-α a IFN- γ jak u zdravých, tak i diabetických krys. [85]

Hladina IL-1β, který je zodpovědný za dlouhodobá zánětlivá onemocnění, vedoucí k poškození vnitřních orgánů, se pod vlivem polyfenolů z bezových plodů snížila o více než 50%. [61, 62]

Jiný výzkum uvádí, že tyto polyfenoly zvyšují schopnost imunitního systému u diabetických krys zvýšením počtu lymfocytů. [86]

3.7.6 Antivirová, antibakteriální a antifungální aktivita

Černý bez je rostlina, která se používá při léčbě chřipky a nachlazení a vykazuje antivirové a antibakteriální účinky. [87] Studie prokázala, že extrakt z bezových květů při koncentraci 252μg/ml inhibuje vir influenzy A (H1N1). Mechanismus inhibice spočívá v přímém vázání polyfenolů k H1N1 viru, což brání viru penetrovat do buňky a tím dochází k inhibici infekce *in vitro*. [88]
Jiný výzkum prokázal, že nálev z květů bezu společně s natí a kořenem mydlice lékařské vykazuje antivirovou aktivitu vůči viru influenzy typu A i B (*in vitro* i *in vivo*) a herpes simplex viru typu 1 (*in vitro*) [89].

Extrakt z květů bezu má antibakteriální účinek proti nosokomiálním patogenům, včetně methicilin-resistentního *Staphylococca aurea*, který je patogenem spojeným s infekcemi kůže a měkkých tkání. [90]

Zjištěná antimikrobiální účinnost extraktu z květů byla vyšší než účinnost extraktu z plodů.[91]

Další studie byly provedeny i s plody, listy a kůrou. Ty prokázaly antivirovou, antibakteriální a někdy i antifungální aktivitu.[51]

3.7.7 Ochrana před UV zářením

Polyfenoly mají schopnost chránit před UV zářením i jeho negativními dopady.[92] Květy černého bezu jsou potenciálním zdrojem aktivních látek, které v porovnání s antioxidanty často přidávanými do kosmetických přípravků nedegradují pod vlivem ultrafialového záření a vykazují vysokou biologickou aktivitu.[93]
Podobné účinky vykazují i plody. Extrakt z plodů bezu byl použit na přípravu emulze, která měla chránit proti slunečnímu záření. Efektivita tohoto přípravku byla vyšší než filtry použité v komerčních přípravcích na trhu.[94]

3.7.8 Diuretická aktivita

Studie prokázala, že vodný extrakt květů bezu (50 mg/kg) vykazoval podobné diuretické vlastnosti jako referenční substance, kterou byl v tomto případě hydrochlorothiazid. Mimoto zvýšil bezový extrakt i vylučování sodíku do moči.[95]

3.7.9 Protirakovinná aktivita

Nyní je součástí výzkumů prověřování možných antikancerózních účinků bezu. Preventivní efekt květů by mohl spočívat ve schopnosti polyfenolů modulovat činnosti enzymů, které vedou ke snížení karcinogenity xenobiotik a zabránění vzniku rakoviny vyvolané oxidativním stresem.[33]

V dalším výzkumu bylo zjištěno, že extrakt z listů a plodů bezu mírně inhiboval růst tumoru v experimentálních podmínkách [91] a leukémii.[96] V jiné studii byl vznesen názor, že za tuto aktivitu zodpovídají jak polyfenoly (jako kvercetin, nebo proanthokyanidiny), tak i seskviterpeny, fytosteroly a další látky.[97]

Další zdroj uvádí, že fenolické látky mohou rozpoznat a zničit rakovinné buňky a též inhibovat angiogenezi, která je nezbytná pro růst nádoru. [98] Mohou též oslabit přilnavost a invazivnost rakovinných buněk a tudíž snižovat možnost metastáze. [99] Některé výzkumy ovšem ukazují, že fenolické sloučeniny mají rozdílný efekt na normální a rakovinné buňky, kde silnější cytotoxicita je namířena proti normálním buňkám. [100, 101]

3.8 Vedlejší účinky a kontraindikace

Černý bez není považován za toxickou rostlinu, ale jeho listy, kůra, kmen, kořeny, květy i nezralé plody obsahují kyanogenní glykosidy, především sambunigrin, prunasin, holocain a zierin, které jsou během trávení konvertovány na kyanovodík. [102] Konzumace nezralých plodů může způsobit nauzeu, zvracení a průjem. Bezinky ovšem bývají konzumovány v již zpracované formě. Tepelná úprava syrového materiálu vede k rozkladu sambunigrinu, takže konzumace již nezpůsobuje symptomy otravy. [46]

Mezi černým bezem, dalšími léčivými rostlinami a složkami potravy nebyly zjištěny žádné interakce. Ovšem je důležité stále pamatovat na to, že léčivé rostliny obsahují spoustu látek, které se mohou chovat stejně jako běžné léky, nebo naopak proti jejich aktivitě, proto nemohou být považovány za úplně bezpečné. Kvůli nedostatku klinických zkoušení nemůžeme hodnotit interakce složek černého bezu a léků. Zvažovány jsou prozatím obavy spojené s užíváním bezu společně s antidiabetiky, morfinem, fenobarbitalem, diuretiky a látkami ovlivňující imunitní systém. [103]

Po inhalaci může přítomnost homologu proteinů inaktivujících ribozomy vyvolat alergické symptomy v podobě konjunktivitidy a astmatu ve vybrané skupině pacientů. [104]

Dále bylo zjištěno, že některé flavonoidy mohou inhibovat cytochrom P450, který má podíl na metabolizaci léčiv. Tyto látky ovlivňují též P-glykoprotein, což je efluxní transportér, který snižuje absorpci určitých léků. Flavonoidy se též mohou vázat na nehemové železo a snižovat tak jeho absorpci ve střevě, některé též údajně mohou inhibovat vstřebávání vitamínu C. [105]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Vzorky rostlinného materiálu

Testované květy jedenácti kultivarů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) pocházely z rostlin pěstovaných ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o. a byly nasbírány v červnu 2014. Po sběru byly květy usušeny volně na vzduchu a uchovávány v papírových sáčcích. Před vlastním stanovením byly spolu s květními stopkami odděleny od hlavního stonku a rozdrobněny pomocí elektrického mlýnku.
Přehled analyzovaných kultivarů bezu černého uvádí tabulka 3.

Tabulka 3: Analyzované kultivary bezu černého

Kultivar
Albida
Allesö
Aurea
Dana
Heidegg 13
Juicy
Riese auß Voßloch
Sambu
Samdal
Sampo
Samyl

4.1.2 Použité chemikálie

Aceton p. a., Penta, Chrudim, Česká republika
Čištěná voda
Ethyl – acetát p. a., Penta, Chrudim, Česká republika
Chlorid hlinitý, Penta, Chrudim, Česká republika
Kyselina chlorovodíková p. a., Penta, Chrudim, Česká republika
Kyselina octová ledová, Penta, Chrudim, Česká republika
Methenamin, Penta, Chrudim, Česká republika
Síran sodný bezvodý, Penta, Chrudim, Česká republika

4.1.3 Přístroje

Elektrický mlýnek, ETA, Česká republika
Analytické váhy, Sartorius, Německo
Vodní lázeň, GFL, Německo
Spektrofotometr UV – 1601, Schimadzu, Japonsko

4.2 Stanovení flavonoidů v květech

Stanovení bylo provedeno postupem dle Českého lékopisu 2009 (doplněk 2013), článku *Sambuci nigrae flos*. [25] U každého kultivaru byla provedena tři stanovení, výjimečně dvě stanovení, v závislosti na dostupném množství analyzovaného materiálu.

4.2.1 Příprava extraktu z drogy

Asi 0,600 g práškované drogy se ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchalo s 1 ml roztoku methenaminu (5 g/l), 20 ml acetonu a 2 ml kyseliny chlorovodíkové. Směs se vařila 30 minut pod zpětným chladičem na vodní lázni a poté se zfiltrovala přes chomáček vaty. Ke zbytku v baňce se přidal použitý chomáček vaty a extrahoval se ještě dvakrát stejným postupem 10 minut varem s 20 ml acetonu. Po zchladnutí se každý extrakt zfiltroval přes nový chomáček vaty. Spojené acetonové extrakty se zfiltrovaly přes filtrační papír do odměrné baňky a doplnily se acetonem předem použitým k promytí baňky a papírového filtru na

100,0 ml. Poté se 20 ml tohoto roztoku převedlo do dělící nálevky, přidalo se 20 ml čištěné vody a protřepávalo se jedenkrát 15 ml a poté třikrát 10 ml ethyl-acetátu. Následně se spojené ethyl-acetátové vrstvy protřepaly dvakrát 50 ml destilované vody a zfiltrovaly se přes 10 g bezvodého síranu sodného do odměrné baňky, kde se dále zředily ethyl-acetátem na 50,0 ml.

4.2.2 Příprava zkoušeného roztoku

10,0 ml extraktu z drogy se smíchalo s 1 ml roztoku chloridu hlinitého (2,0 g chloridu hlinitého se rozpustilo ve 100 ml roztoku ledové kyseliny octové 5% (V/V) v methanolu) a zředilo se roztokem ledové kyseliny octové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

4.2.3 Příprava kontrolního roztoku

10,0 ml extraktu z drogy se zředilo roztokem ledové kyseliny octové 5% (V/V) v methanolu na 25,0 ml.

4.2.4 Měření absorbance

Po 30 minutách od přípravy roztoků se změřila absorbance zkoušeného roztoku v maximu při 425 nm proti kontrolnímu roztoku. Z naměřených hodnot se dále vypočítal obsah flavonoidů, vyjádřených jako isokvercitrin ($C_{12}H_{20}O_{12}$).
Vzorec na výpočet obsahu flavonoidů v %:

$$\% = \frac{A \,.\, 1,25}{m}$$

A absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm
m hmotnost drogy v gramech

Ze získaných hodnot byl vypočítán **aritmetický průměr** $\overline{x}$ a **směrodatná odchylka** σ.

Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulkách 4 - 15 a grafu 1.

4.3 Výsledky

Tabulka 4: Obsah flavonoidů v kultivaru Albida

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,5897	0,474	1,0047	1,0487	0,0440
2	0,6189	0,541	1,0927		

Tabulka 5: Obsah flavonoidů v kultivaru Allesö

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6325	0,307	0,6067	0,5842	0,0226
2	0,6566	0,295	0,5616		

Tabulka 6: Obsah flavonoidů v kultivaru Aurea

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6085	0,239	0,4910	0,5350	0,0361
2	0,6008	0,257	0,5347		
3	0,6062	0,281	0,5794		

Tabulka 7: Obsah flavonoidů v kultivaru Dana

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6114	0,176	0,3598	0,3700	0,0073
2	0,6208	0,187	0,3765		
3	0,6391	0,191	0,3736		

Tabulka 8: Obsah flavonoidů v kultivaru Heidegg 13

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6460	0,492	0,9520	0,9937	0,0412
2	0,6216	0,522	1,0497		
3	0,6165	0,483	0,9793		

Tabulka 9: Obsah flavonoidů v kultivaru Juicy

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6211	0,369	0,7426	0,7601	0,0276
2	0,6211	0,367	0,7386		
3	0,6211	0,397	0,7990		

Tabulka 10: Obsah flavonoidů v kultivaru Riese auß Voßloch

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6166	0,671	1,3603	1,2822	0,0556
2	0,6079	0,601	1,2358		
3	0,6288	0,629	1,2504		

Tabulka 11: Obsah flavonoidů v kultivaru Sambu

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6268	0,652	1,3003	1,2870	0,0128
2	0,6168	0,637	1,2909		
3	0,6015	0,611	1,2697		

Tabulka 12: Obsah flavonoidů v kultivaru Samdal

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6208	0,477	0,9605	0,9556	0,0427
2	0,6130	0,493	1,0053		
3	0,6020	0,434	0,9012		

Tabulka 13: Obsah flavonoidů v kultivaru Sampo

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6288	0,653	1,2981	1,2658	0,02965
2	0,6278	0,616	1,2265		
3	0,6452	0,657	1,2729		

Tabulka 14: Obsah flavonoidů v kultivaru Samyl

n	m [g]	A [-]	obsah flavonoidů [%]	$\overline{x}$	σ
1	0,6012	0,452	0,9398	0,9682	0,0291
2	0,5901	0,476	1,0083		
3	0,6102	0,467	0,9567		

Tabulka 15: Celkový přehled dat získaných ke stanovení obsahu flavonoidů u jedenácti kultivarů bezu černého

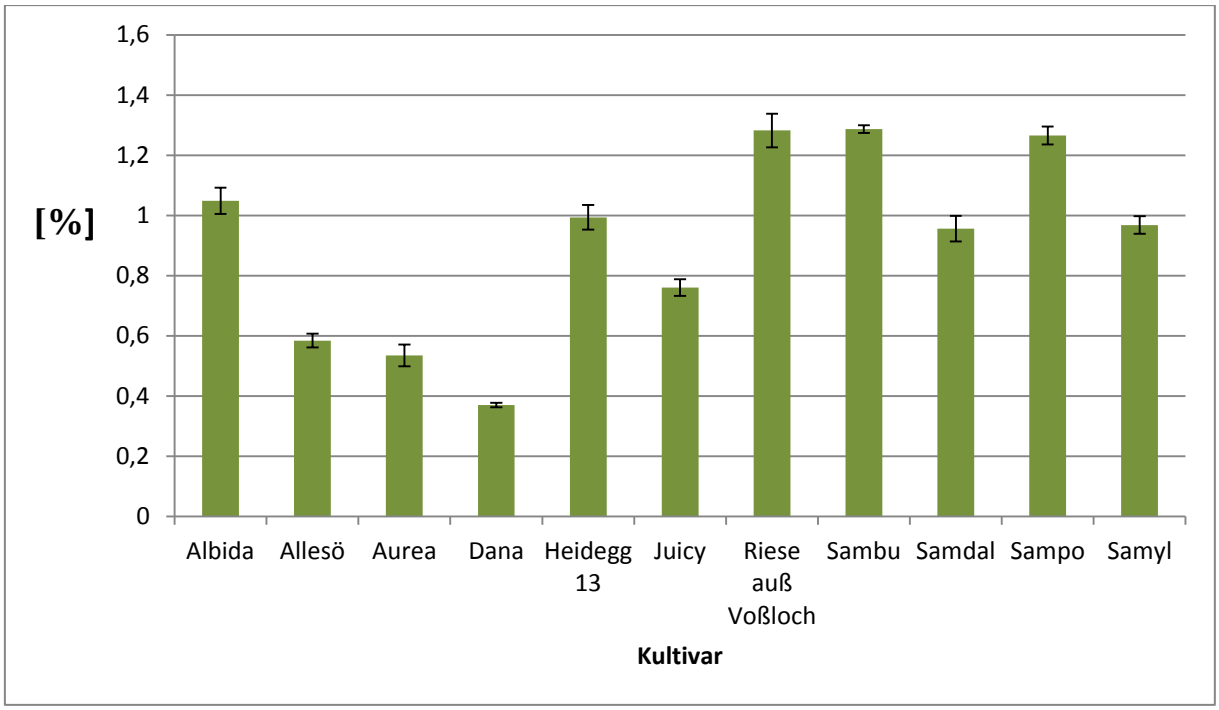
Kultivar	m 1 [g]	m 2 [g]	m 3 [g]	A 1	A 2	A 3	Procentuální poměr 1	Procentuální poměr 2	Procentuální poměr 3	Procentuální průměr	σ
Albida	0,5897	0,6189	-	0,474	0,541	-	1,004748177	1,092664405	-	1,048706291	0,043958114
Allesö	0,6325	0,6566	-	0,307	0,295	-	0,606719368	0,561605239	-	0,584162303	0,022557064
Aurea	0,6085	0,6008	0,6062	0,239	0,257	0,281	0,49096138	0,534703728	0,579429231	0,535031447	0,036117592
Dana	0,6114	0,6208	0,6391	0,176	0,187	0,191	0,359829899	0,376530284	0,373572211	0,369977464	0,007276325
Heidegg 13	0,6460	0,6216	0,6165	0,492	0,522	0,483	0,952012384	1,049710425	0,979318735	0,993680514	0,041157602
Juicy	0,6211	0,6211	0,6211	0,369	0,367	0,397	0,742634036	0,73860892	0,798985671	0,760076209	0,027562173
Riese auß Voßloch	0,6166	0,6079	0,6288	0,671	0,601	0,629	1,360282193	1,235811811	1,250397583	1,282163862	0,055558026
Sambu	0,6268	0,6168	0,6015	0,652	0,637	0,611	1,300255265	1,290937095	1,269742311	1,286978223	0,012767526
Samdal	0,6208	0,6130	0,6020	0,477	0,493	0,434	0,960454253	1,005301794	0,901162791	0,955639613	0,042650663
Sampo	0,6288	0,6278	0,6452	0,653	0,616	0,657	1,298107506	1,226505256	1,272861128	1,26582463	0,029651923
Samyl	0,6012	0,5901	0,6102	0,452	0,476	0,467	0,939787092	1,008303677	0,956653556	0,968248109	0,029148537

m – navážka

A – absorbance

σ – směrodatná odchylka

Graf 1: Průměrný obsah flavonoidů v květech jednotlivých kultivarů bezu černého



4.4 Statistické zpracování dat

V této kapitole je uveden postup a výsledky statistického hodnocení rozdílů mezi jednotlivými kultivary v obsahu flavonoidů. Toto testování je vhodné zejména pro zjištění, který kultivar je pro svůj podíl flavonoidů vhodnější k potenciálnímu léčebnému využití a také z hlediska průkaznosti rozdílů mezi jednotlivými kultivary. Stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v učebnici Aplikované statistiky. [106]

4.4.1 Test statistické významnosti rozdílů mezi kultivary

Pro zjištění, zda jsou rozdíly mezi naměřenými hodnotami flavonoidů v jednotlivých kultivarech statisticky významné, byla použita Analýza rozptylu pro jeden faktor, též známá pod zkratkou ANOVA. Daným faktorem byl obsah flavonoidů, jehož změna se testovala v závislosti na jednotlivých kultivarech. Testovala se hypotéza, zda střední hodnota flavonoidů byla alespoň pro jeden kultivar odlišná od ostatních. Výpočet byl založen na rozkladu rozptylů, míry kolísání hodnot kolem průměru.

Pro vyhodnocení testu bylo nutné stanovit si hypotézy, podle kterých bylo možné učinit závěr.

Nulová hypotéza říká, že rozdíly mezi naměřenými hodnotami u různých kultivarů nejsou statisticky významné.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_n$$

Alternativní hypotéza tvrdí opak, tedy že alespoň pro jednu dvojici kultivarů platí, že obsah flavonoidů je mezi nimi statisticky významný.

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j$$

Současně bylo třeba zvolit si **hladinu významnosti**, na které se sledovaný faktor testoval. Jinými slovy chybu prvního druhu, při které může nastat nesprávné zamítnutí nulové hypotézy. Při zvolení nízké hladiny významnosti se zvyšuje riziko vzniku chyby druhého druhu (nesprávné přijetí nulové hypotézy), proto je nejoblíbenější hodnotou hladiny významnosti 5% ($\alpha = 0{,}05$).

Na základě naměřených hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty obsahu flavonoidů v každém kultivaru a současně rozptyl těchto hodnot v rámci kultivaru. Výsledky uvádí tabulka 16.

Tabulka 16: Průměrné hodnoty obsahu flavonoidů a hodnoty rozptylu v jednotlivých kultivarech

Kultivar	Procentuální poměr 1	Procentuální poměr 2	Procentuální poměr 3	Průměr	Rozptyl
Albida	1,004748177	1,092664405	-	1,048706291	0,003864632
Allesö	0,606719368	0,561605239	-	0,584162303	0,001017642
Aurea	0,49096138	0,534703728	0,579429231	0,535031447	0,001956721
Dana	0,359829899	0,376530284	0,373572211	0,369977464	7,94174E-05
Heidegg 13	0,952012384	1,049710425	0,979318735	0,993680514	0,002540922
Juicy	0,742634036	0,73860892	0,798985671	0,760076209	0,00113951
Riese auß Voßloch	1,360282193	1,235811811	1,250397583	1,282163862	0,004630041
Sambu	1,300255265	1,290937095	1,269742311	1,286978223	0,000244515
Samdal	0,960454253	1,005301794	0,901162791	0,955639613	0,002728619
Sampo	1,298107506	1,226505256	1,272861128	1,26582463	0,001318855
Samyl	0,939787092	1,008303677	0,956653556	0,968248109	0,001274456

Na základě těchto hodnot byly vypočítány prvky tabulky ANOVA. Konkrétně se jedná o **SSE** (Sum of Squares Error), který byl získán dle vzorce:

$$SSE = (procentuální\ poměr_i - průměr)^2$$

pro každý kultivar a následně byly všechny hodnoty sečteny. Dalším prvkem je **SSTR** (Sum of Squares Treatment**),** který byl vypočítaný pro každý kultivar pomocí vzorce:

$$SSTR = (skupinový\ průměr - celkový\ průměr)^2$$

Výsledné hodnoty byly poté opět sečteny. Posledním prvkem je **SSTO** (Sum of Squares Total), který byl získán prostým sečtením celkových součtů SSE a SSTR.

$$SSTO = SSE + SSTR$$

V dalším kroku pro vypočtení odhadu rozptylů bylo důležité určit **stupně volnosti**, tedy hodnoty závislé na počtu skupin (kultivarů) a počtu měření. Pro prvek SSE byl stupeň volnosti vypočítán jako $n - r$, tedy $počet\ měření - počet\ kultivarů$. Pro SSTR byl stupeň volnosti určen jako $r - 1$, tedy $počet\ kultivarů - 1$.
Výpočet odhadu rozptylů byl získán pomocí vzorce pro odhad rozptylu meziskupinového $MSTR = SSTR/(r - 1)$ a vnitroskupinového $MSE = SSE/(n - r)$.
Po získání odhadů rozptylu bylo vypočteno **Testové kritérium F** (Fisher-Snedecorovo) prostým vydělením hodnot.

$$F = MSTR/MSE$$

Výsledky jsou názorně shrnuty v tabulce 17.

Tabulka 17: Výsledky výpočtů pro statistickou analýzu

Rozptyl	Součty čtverců	Stupně volnosti	Odhady rozptylů	Testové kritérium
Meziskupinový	0,999671441	10	0,099967144	**54,4655637**
Vnitroskupinový	0,036708385	20	0,001835419	-
Celkem	1,036379826	30	-	-

Pro vyhodnocení testu bylo potřeba zjistit **Kritickou hodnotu**, jejíž získání je nejjednodušší pomocí funkce obsažené v softwaru MS Excel, jehož vydavatelem je firma Microsoft. Ona funkce je ve tvaru $= F.INV(1 - hladina\ významnosti;\ r - 1;\ n - r)$. Po dosazení byla získána Kritická hodnota 2,347877567, která byla porovnána s Testovým kritériem.

V případě jako je ten náš, kdy je hodnota Testového kritéria větší než Kritická hodnota, dochází k zamítnutí nulové hypotézy. Bereme tedy v potaz alternativní hypotézu o statisticky významných rozdílech mezi alespoň jednou dvojicí kultivarů.

4.4.2 Bonferroniho test – zjištění statistické významnosti rozdílů mezi dvojicemi kultivarů

Poté, co byla zjištěna statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými kultivary v obsahu flavonoidů, bylo důležité určit, mezi kterými dvojicemi kultivarů se tato rozdílnost nachází. Odpověď na tuto otázku byla získána pomocí Bonferroniho testu.

Bonferroniho test na základě počtu kultivarů upravil **hladinu významnosti** podle následujícího vzorce:

$$\alpha^B = \frac{2*\alpha}{r(r-1)},$$

což mělo za následek individuální zpřesnění testu. Dále bylo vypočteno **Testové kritérium** pro každou porovnávanou dvojici podle vzorce:

$$T = \frac{\left|průměr\ kultivaru_i\ -\ průměr\ kultivaru_j\right|}{\sqrt{MSE(\frac{1}{počet\ měření\ kultivaru_i} + \frac{1}{počet\ měření\ kultivaru_j})}}$$

To bylo následně porovnáváno s **Kritickou hodnotou**, která byla opět získána pomocí Excelovské funkce $= T.INV\left(1 - \frac{\alpha^B}{2}; n - r\right)$. Kritická hodnota byla v našem případě 3,89032395. V situacích, kdy bylo Testové kritérium větší než Kritická hodnota, nebyly rozdíly mezi výběrovými průměry důsledkem výběrové chyby a lze tedy očekávat, že

střední hodnoty byly odlišné pro jednotlivé kultivary. Tedy že rozdíly byly statisticky významné.

V následující tabulce je uveden celkový přehled vztahů statistické významnosti mezi jednotlivými kultivary. Mezi dvojicemi označenými symbolem ✓ byly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Tabulka 18: Celkový přehled vztahů statistické významnosti mezi jednotlivými kultivary

Kultivar	Albida	Allesö	Aurea	Dana	Heidegg 13	Juicy	Riese auß Voßloch	Sambu	Samdal	Sampo	Samyl
Albida		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	
Allesö	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Aurea	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Dana	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Heidegg 13		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	
Juicy	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Riese auß Voßloch	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓
Sambu	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓
Samdal	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	
Sampo	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓
Samyl		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	

5 DISKUSE

Používání květů černého bezu má dlouhodobou tradici. Jejich oblíbenost dokazuje i množství produktů s jejich obsahem na trhu, jako příklad mohou být uvedeny: perorální kapky Biotussil (Biomedica), perorální roztok Novo-Passit (Teva), perorální kapky či tablety Sinupret (Bionorica AG) a čaje Urcyston Planta (Leros), Pulmoran (Leros), Reduktan (Leros), Čajová směs při nachlazení (Megafyt) a Čaj z květů bezu (Herbata). [28]

Droga se v terapii užívá zejména pro svůj obsah flavonoidů a hydroxyskořicových kyselin jako prostředek při nachlazení, onemocněních močového ústrojí a dýchacích cest. Její prospěšnost potvrdily i studie v rámci zkoumání její antibakteriální a antivirové aktivity, diabetu a obezity, účinků na imunitní systém a též ochrany před UV zářením. Společně ve směsi s dalšími rostlinnými drogami bylo potvrzeno i její laxativní a diuretické působení. V současnosti se výzkumy zaměřují na možné antikancerogenní působení květů černého bezu.

Květy bezu pro farmaceutické využití se získávají sběrem ve volné přírodě, což s sebou nese i jistá rizika spojená například s průmyslovou výrobou člověka, ale i postupným vymizením druhu, jelikož poptávka po droze je značná. I z tohoto důvodu by bylo vhodné prosadit pěstování kultivarů, které byly původně vyšlechtěny pro zisk plodů a jejich využití v potravinářství, k zisku květní drogy. Tím by došlo jak ke zjednodušení sklizně, tak i zisku drogy vyvážené kvality.

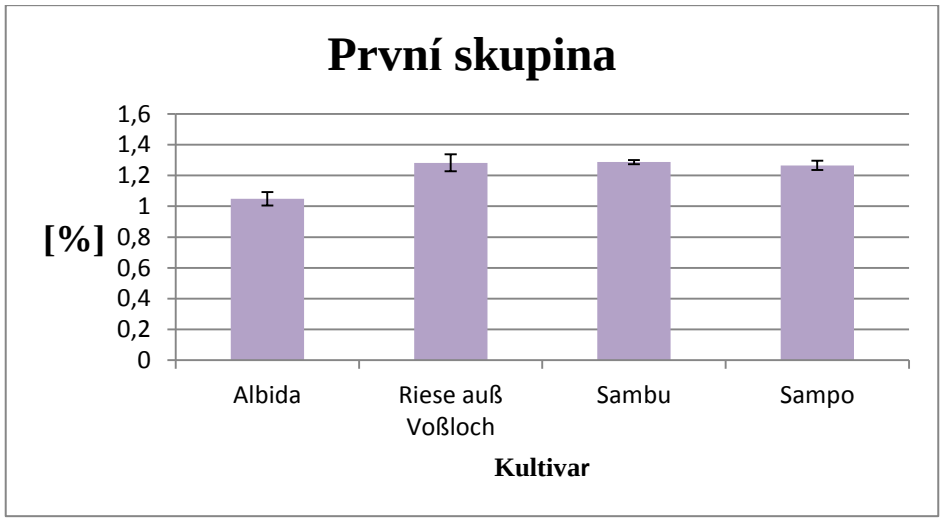
Kvalita drogy *Sambuci nigrae flos* se pro použití ve farmacii hodnotí podle obsahu flavonoidů. Stanovení se provádí spektrofotometricky. Ke stanovení flavonoidních látek v rostlinném materiálu existují i citlivější a modernější metody jako například HPLC. [107]
Lékopisná metoda spektrofotometrického stanovení byla použita i v této práci u květů pěstovaných kultivarů bezu černého. Jejich přehled uvádí tabulka 3. Minimální požadované množství flavonoidů je dle Českého lékopisu 2009, doplňku 2013 0,80%, počítáno jako isokvercitrin .

Požadavkům lékopisu vyhovělo 20 z celkového počtu 31 měření. Jednalo se o všechna stanovení obsahu provedená u kultivarů: Albida, Heidegg 13, Riese auß Voßloch, Sambu,

Samdal, Sampo a Samyl. Naopak požadavkům lékopisu nevyhovělo žádné z měření provedených u kultivarů: Allesö, Aurea, Dana a Juicy. Z toho se dá usuzovat, že právě tyto odrůdy by nebyly vhodné pro pěstování za účelem zisku květní drogy.

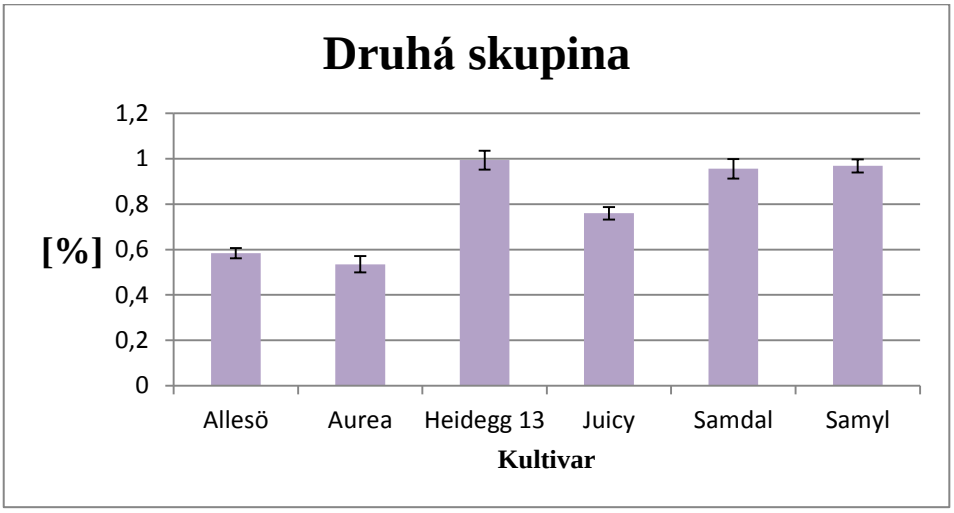
Dle výsledků měření lze kultivary bezu černého z hlediska průměrného procentuálního obsahu flavonoidů rozdělit do tří skupin, jak uvádí následující text. **První skupina** obsahuje odrůdy s průměrným obsahem vyšším než 1% a zahrnuje následující kultivary: Albida, Riese auß Voßloch, Sambu a Sampo.

Graf 2: Odrůdy s průměrným obsahem flavonoidů vyšším než 1%



Druhá skupina obsahuje odrůdy s průměrným obsahem flavonoidů od 0,5 – 1%; do druhé skupiny náleží odrůdy: Allesö, Aurea, Heidegg 13, Juicy, Samdal a Samyl.

Graf 3: Odrůdy s průměrným obsahem flavonoidů 0,5 – 1%



Třetí skupina zahrnuje pouze jeden kultivar - kultivar Dana, který dosáhl pouze průměrného procentuálního obsahu necelých 0,37% flavonoidů.

Z uvedených tabulek a grafů vyplývá, že nejvyšší průměrný obsah flavonoidů má odrůda Sambu, dále následují odrůdy v pořadí Riese auß Voßloch, Sampo, Albida, Heidegg 13, Samyl, Samdal, Juicy, Allesö, Aurea a Dana.

Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn v květech kultivaru Riese auß Voßloch s hodnotou 1,3603%, zatímco nejnižší u kultivaru Dana s obsahem 0,3598%. Provedená stanovení také naznačují, že šlechtěním bezu černého pro produkci kvalitních plodů zřejmě není negativně ovlivněna schopnost rostlin vytvářet a akumulovat flavonoidy.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit obsah flavonoidů v květech jedenácti vybraných kulturních odrůd bezu černého (*Sambucus nigra* L.), výsledky statisticky vyhodnotit a sestavit přehled obsahových látek a účinků květů.

Obsah flavonoidů v jedenácti kultivarech bezu černého byl stanoven spektrofotometricky dle Českého lékopisu 2009 (doplňku 2013). Naměřený obsah flavonoidů v jednotlivých odrůdách se lišil. Rozdíly v obsahu byly mezi většinou kultivarů statisticky významné. Všechny květy pocházely z rostlin pěstovaných ve stejné lokalitě, tudíž se na rozdílech nepodílely environmentální faktory. Nejvyšší průměrné hodnoty byly naměřeny u kultivaru Sambu (více než 1,28%) a nejnižší u odrůdy Dana (s necelými 0,37%).

K nejvýznamnějším obsahovým látkám květů patří flavonoidy a hydroxyskořicové kyseliny. Dále jsou v květech bezu černého obsaženy též triterpeny, steroly, silice, třísloviny, slizy a další látky.

Květ černého bezu našel širokého uplatnění v lidové medicíně při léčbě řady nemocí. I v současné době se těší velké oblibě. Využití nachází zejména při léčbě respiračních obtíží a nachlazení. Výsledky studií prokázaly jeho antioxidační, antidiabetickou, diuretickou, antivirovou a antibakteriální aktivitu. Dále byl potvrzen významný dopad na imunitní systém a též ochrana před UV zářením. Nyní je součástí výzkumů prověřování možného antikancerózního účinku.

7 ABSTRAKT

Cílem této práce bylo zjistit obsah flavonoidů v květech jedenácti vyšlechtěných kultivarů bezu černého, určit zdali jsou mezi nimi statisticky významné rozdíly a vypracovat přehled obsahových látek a účinků květů.

Droga *Sambuci nigrae flos* se v terapii užívá zejména pro svůj obsah flavonoidů a hydroxyskořicových kyselin jako prostředek při nachlazení, onemocněních močového ústrojí a dýchacích cest. Její prospěšnost potvrdily i studie v rámci zkoumání antibakteriální a antivirové aktivity, diabetu a obezity, účinků na imunitní systém a též ochrany před UV zářením.

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky metodou podle Českého lékopisu 2009, článku *Sambuci nigrae flos*. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem ANOVA a Bonferroniho testem. Požadavek Českého lékopisu 2009 na minimální obsah flavonoidů 0,80% splnily květy z kultivarů: Albida, Heidegg 13, Riese auß Voßloch, Sambu, Samdal, Sampo a Samyl. Naopak by lékopisu nevyhověly květy kultivarů: Allesö, Aurea, Dana a Juicy. Nejvyšší obsah flavonoidů byl zjištěn v květech kultivaru Riese auß Voßloch s hodnotou 1,3603%, zatímco nejnižší u kultivaru Dana s obsahem 0,3598%. Nejvyšší průměrný obsah flavonoidů měla odrůda Sambu, dále následovaly odrůdy v pořadí Riese auß Voßloch, Sampo, Albida, Heidegg 13, Samyl, Samdal, Juicy, Allesö, Aurea a Dana. Ze statistického hodnocení vyplývá, že mezi většinou odrůd jsou významné rozdíly v obsahu flavonoidů.

Pro sběr květů jsou potenciálně vhodné všechny odrůdy s výjimkou kultivarů Allesö, Aurea, Dana a Juicy, které nedosáhly lékopisem požadovaného obsahu flavonoidů.

8 ABSTRACT

The aim of this work was to find out the content of flavonoids in the flowers of eleven cultivars of black elder (*Sambucus nigra* L.) and determine if their contents differ according to the statistical significance. Preparing the list of effects and substances that are contained in the flowers was the goal as well.

The drug *Sambuci nigrae flos* is mostly used for its content of flavonoids and hydroxycinnamic acids in the therapy of colds and diseases of the urinary and respiratory tract. Its benefits were confirmed also by studies testing antibacterial and antiviral activity, diabetes and obesity, effects on the immune system and also protection against UV radiance.

The content of flavonoids was established by the spectrophotometric method that is listed in the Czech Pharmacopoeia 2009 in the article *Sambuci nigrae flos* as the method for the determination of content. The statistic evaluation of the differences in the flavonoids content between the cultivars was made by ANOVA and the Bonferroni test. The demand of Czech Pharmacopoeia 2009 on the minimal content of flavonoids is 0,80%. This requirement was fulfilled in the flowers of these cultivars: Albida, Heidegg 13, Riese auß Voßloch, Sambu, Samdal, Sampo and Samyl. On the opposite side, flowers of the cultivars Allesö, Aurea, Dana and Juicy did not meet the requirements of pharmacopoeia. The highest content of flavonoids was found in the flowers of the cultivar Riese auß Voßloch with the value of 1,3603% and the lowest in the flowers of cultivar Dana with the value of 0,3598%. The highest avarage content of flavonoids had the cultivar Sambu, followed by the cultivars in this order: Riese auß Voßloch, Sampo, Albida, Heidegg 13, Samyl, Samdal, Juicy, Allesö, Aurea and Dana. The statistic evaluation proves that there are significant differences in the flavonoids content between cultivars.

All cultivars are potentially appropriate for the harvesting of the flowers excluding Allesö, Aurea, Dana and Juicy, which did not reach the demanded content of flavonoids listed in pharmacopoeia.

9 LITERATURA

1. Grünwald J., Jänicke Ch. Zelená lékárna. 1. vyd. Praha: Svojtka & Co., 2008, 408 s. ISBN 978-80-7352-600-9.
2. Aldrovandi U. Ornithologia, XIV.; citováno dle 5.
3. De Gubernatis A. La mythologie des plantes. 2.sv. Paříž 1878, s. 354-355.; citováno dle 5.
4. Cattabiani A. Lunario: dodici mesi di miti, feste, leggende e tradizioni popolari d'Italia. Ed. riv. e ampliata. Milano: A. Mondadori, 2002, s. 393. ISBN 8804501383.; citováno dle 5.
5. Cattabiani A. Florarium: mýty, legendy a symboly spjaté s květinami a rostlinami. 1. vyd. Praha: Volvox Globator, 2006, 783 s. ISBN 80-7207-595-0.
6. *Sambucus nigra* L. [online]. 2007 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/sambucus-nigra/>
7. Jahodář L. Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl). 1. vyd. Praha: Havlíček Brain Team, 2010, 233 s. ISBN 978-80-87109-22-9.
8. Jahodář L. Farmakobotanika: semenné rostliny. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 264 s. ISBN 978-80-246-1791-6.
9. Grešík V. Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití. Praha: Eminent, 2008, 168 s. ISBN 978-80-7281-331-5.
10. Bělohlávková R. Květena České republiky. 1. vyd. Praha: Academia, 1997, 568 s.
11. Léčivé rostliny. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010, 496 s. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.
12. Classification of *Sambucus nigra* L. [online]. 2015 [cit. 2016-07-02]. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=SANI4&display=31>
13. Minařík J. Farmakognosie: učební text pro střední zdravotnické školy, studijní obor farmaceutický laborant. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1979, 383 s.
14. Opíchal F., Dostál D. Bez černý: *Sambucus nigra* L.: baza čierná : chutná potravina a ještě lepší lék. 4. vyd. Olomouc: D. Dostál, 1991, 46 s.
15. Hofmann H. Jedlé bylinky a plody: naučte se znát a používat nejdůležitější druhy. 1. vyd. Praha: Svojtka & Co., 2013, 254 s. Průvodce přírodou (Svojtka & Co.). ISBN 978-80-256-1059-6.

16. Atkinson M. D., Atkinson E.: *Sambucus nigra* L. J. Ecol. 2002, 90, 895-923.
17. Bühring U. Léčivé rostliny: obsahové látky, zpracování, základní recepty. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 2010, 360 s. ISBN 978-80-242-2474-9.
18. Erdelská O. Atlas léčivých rostlin. 1. vyd. Bratislava: Nakladatelství Príroda, 2008, 215 s. ISBN 978-80-07-01528-9.
19. Kaplan J. Černý bez v produkčním ovocnářství - I. díl. Zahradnictví 2011; 10 (8), 12-13.
20. Graman J., Čurn V. Šlechtění rostlin: (obecná část). 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1997, 133 s. ISBN 80-7040-255-5.
21. Kaplan J., Matějíček A. Černý bez v produkčním ovocnářství – II. díl. Zahradnictví 2011; 10 (9), 18-21.
22. Matějíček A., Kaplan J. Porovnání hospodářských znaků kulturních odrůd bezu černého. Zahradnictví 2011; 10 (1), 60-61.
23. Matějíček A., Kaplan J. Porovnání fenologických znaků sedmnácti kulturních odrůd bezu černého. Zahradnictví 2011; 9 (2), 16-17.
24. Kołodziej B., J. Antonkiewicz, N. Maksymiec, K. Drożdżal. Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (*Sambucus nigra* L.). J Elementolog. 2012-1-1, (1/2012). DOI: 10.5601/jelem.2012.17.1.06. ISSN 16442296.
25. Český lékopis 2009: doplněk 2013. *Sambuci nigrae flos*. Praha: Grada, 2013, s. 8529. ISBN 978-80-247-4679-1.
26. WHO Monograph – *Flos Sambuci* [online]. 2016 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/26.html>
27. Barros L., M. Dueñas, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira, C. Santos-Buelga. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. Food Chem Toxicol. 2012, 50(5), 1576-1582. DOI: 10.1016/j.fct.2012.02.004. ISSN 02786915.
28. Veitch N.C. Herbal medicines. 4 vyd. London: Pharmaceutical Press, 2013. ISBN 978-0-85711-035-0.
29. Middleton E. JR., Ch. Kandaswami, T.C. Theoharides. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for imflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000, 52 (4), 673-751.
30. Cushnie T.T.P., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005, 26 (5), 343-356.

31. Christensen L.P., K. Kaack, X. C. Fretté. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. Eur Food Res Technol. 2008, 227 (1), 293-305. DOI: 10.1007/s00217-007-0723-8. ISSN 1438-2377.
32. Celik E. S., Özyürek M., Güclü K., Capanoglu E., Apak R. Identification and Antioxidant Capacity Determination of Phenolic and their Glycosides in Elderflower by on-line HPLC-CUPRAC Method. Phytochem Anal. 2014, 25 (2), 147-154.
33. Kaack K., Christensen L. P. Phenolic acids and flavonoids in tea processed from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) stored in different packing materials. Eur. J. Horticult Sci. 2010, 75, 214-220.
34. Meyer A.S., Donovan J.L., Pearson D.A., Waterhouse A.L., Frankel E.N. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. J Agric Food Chem. 1998, 46 (5), 1783-1787. DOI: 10.1021/jf9708960.
35. Chen J.H., Ch.-T. Ho. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. J Agric Food Chem. 1997, 45(7), 2374-2378. DOI: 10.1021/jf970055t. ISSN 0021-8561.
36. Nardini M., M. D'aquino, G. Tomassi, V. Gentili, M. Di Felice, C. Scaccini. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. Free Rad Biol Med. 1995, 19(5), 541-552. DOI: 10.1016/0891-5849(95)00052-Y. ISSN 08915849.
37. Ferguson L.R., S.-T. Zhu, P.J. Harris. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. Mol Nutr Food Res. 2005, 49(6), 585-593. DOI: 10.1002/mnfr.200500014. ISSN 1613-4125.
38. Herald P.J., Davidson P.M. Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. J Food Sci. 1983, 48(4), 1378-1379. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb09243.x. ISSN 0022-1147.
39. Kucekova Z., J. Mlcek, P. Humpolicek, O. Rop. Edible flowers — antioxidant activity and impact on cell viability. Life Sci. 2013-01-1, 8(10). DOI: 10.2478/s11535-013-0212-y. ISSN 2391-5412.
40. Jørgensen U., M. Hansen, L.P. Christensen, K. Jensen, K. Kaack. Olfactory and Quantitative Analysis of Aroma Compounds in Elder Flower (*Sambucus nigra* L.) Drink Processed from Five Cultivars. J Agric Food Chem. 2000, 48(6), 2376-2383. DOI: 10.1021/jf000005f. ISSN 0021-8561.

41. Toulemonde B., Richard H.M.J. Volatile constituents of dry elder (*Sambucus nigra* L.) flowers. J Agric Food Chem. 1983, 31, 365-370.
42. Bez černý [online]. 2008 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/bez-cerny-sambucus-nigra.htm>
43. Martin-Tanguy J., F. Cabanne, E. Perdrizet, C. Martin. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry. 1978, 17, 1927-1928.
44. Bassard J.-E., P. Ullmann, F. Bernier, D. Werck-Reichhart. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. Phytochemistry. 2010, 71, 1808-1824.
45. Jensen S. R., Nielsen B. J. Cyanogenic glucosides *Sambucus nigra* L. Acta Chem Scand. 1973, 27, 2661-2662.
46. Williamson E., S. Driver, K. Baxter. Stockley's herbal medicines interactions. A guide to the interactions of herbal medicines, dietary supplements and nutraceuticals with conventional medicines. London: Pharmaceutical Press, 2009, 423 s. ISBN 978-0-85369-760-2.
47. Farnsworth N.R., ed. NAPRALERT database. University of Illinois at Chicago, IL, February 9, 1998 production (an on-line database available directly through the University of Illinois at Chicago or through the Scientific and Technical Network [STN] of Chemical Abstracts Services).; citováno dle 26.
48. Newall C.A., L.A. Anderson, J.D. Phillipson. Herbal medicines, a guide for healthcare professionals. London: Pharmaceutical Press, 1996.; citováno dle 26.
49. A nationwide compilation of traditional Chinese medicine herbs, 1st ed. Beijing, People's Health Publishing House, 1975.; citováno dle 26.
50. Grieve M. A Modern Herbal. New York, NY: Dover Publications, 1971, [online] [cit. 2016-01-28]. Dostupné z: <http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Elderberry-scr.pdf?docID=165>.
51. Sidor A., A. Gramza-Michałowska. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. J Funct Food. 2015, 18, 941-958. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.012. ISSN 17564646.
52. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. vyd. Oxford: Oxford University Press, 1999, 980 s.
53. Lopez-Lazaro M., Bentham Science Publisher. Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study. Current Med Chem Anti-Cancer Agents. 2002, 2(6), 691-714. DOI: 10.2174/1568011023353714. ISSN 15680118.

54. He Feng J., C.A. Nowson, G.A. MacGregor. Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. Lancet. 2006, 367(9507), 320-326. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68069-0. ISSN 01406736.
55. Dawidowicz A.L., D. Wianowska, J. Gawdzik, D.H. Smolarz. Optimization of ASE Conditions for the HPLC Determination of Rutin and Isoquercitrin in *Sambucus nigra* L. J Liquid Chrom Rel Technol. 2003, 26(14), 2381-2397. DOI: 10.1081/JLC-120023253. ISSN 1082-6076.
56. Dawidowicz A.L., D. Wianowska, B. Baraniak. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). LWT - Food Sci Technol. 2006, 39(3), 308-315. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.01.005. ISSN 00236438.
57. Buřičová L., Réblová Z. Czech medicinal plants as possible source of antioxidants. Czech J Food Sci. 2008, 26, 132-138.
58. Stoilova I., M. Wilker, A. Stoyanova, A. Krastanov, V. Stanchev. Antioxidant activity of extract from elder flower (*Sambucus nigra* L.). Herba Polon. 2007, 53, 45-54.
59. Kolodziej B., Drozdzal K. Antioxidant properties of black elder flowers and berries harvested from the wild. Zywn – Nauk Technol Ja. 2011, 18 (4), 36 – 44.
60. Bisset N.G. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994.; citováno dle 26.
61. Ciocoiu M., L. Badescu, D. Badulescu, M. Badescu. Intervention of *Sambucus nigra* polyphenolic extract in experimental arterial hypertension. World Acad Sci Eng Technol. 2012, 64, 244-247.
62. Ciocoiu M., L. Badescu, O. Badulescu, D. Tutunaru, M. Badescu. Protective intervention of *Sambucus nigra* polyphenols in the diabetic heart. Ann Rom Soc Cell Biol. 2012, 17, 312-317.
63. Ciocoiu M., D. Serban, L. Badescu, D. Tutunaru, O. Badulescu, M. Badescu. The effects of *Sambucus nigra* extract in experimental arterial hypertension. Ann Rom Soc Cell Biol. 2010, 15, 87-92.
64. Morosanu A.I., M. Ciocoiu, L. Badescu, M. Badescu. Antioxidant effects of aronia versus sambucus on murine model with or without arterial hypertension. Ann Rom Soc Cell Biol. 2011, 16, 222-227.
65. Perlstein T.S., O. Gumieniak, G.H. Williams, D. Sparrow, P.S. Vokonas, M. Gaziano, S.T. Weiss, A.A. Litonjua. Uric Acid and the Development of Hypertension:

The Normative Aging Study. Hypertension. 2006, **48**(6), 1031-1036. DOI: 10.1161/01.HYP.0000248752.08807.4c. ISSN 0194-911x.

66. Takayama S., R. Kawamoto, T. Kusunoki, M. Abe, M. Onji. Uric acid is an independent risk factor for carotid atherosclerosis in a Japanese elderly population without metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol. 2012, 11, 2. DOI: 10.1186/1475-2840-11-2.
67. Youdim K.A., A. Martin, J.A. Joseph. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2000, **29**(1), 51-60. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00329-4. ISSN 08915849.
68. Ogino K., Wang D. H. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: An approach to disease prevention. Acta Med Okayama. 2007, 61, 181-189.
69. Frank J., A. Kamal-Eldin, T. Lundh, K. Määttä, R. Törrönen, B. Vessby. Effects of Dietary Anthocyanins on Tocopherols and Lipids in Rats. J Agric Food Chem. 2002, **50**(25), 7226-7230. DOI: 10.1021/jf025716n. ISSN 0021-8561.
70. Abuja P.M., M. Murkovic, W. Pfanhauser. Antioxidant and Prooxidant Activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) Extract in Low-Density Lipoprotein Oxidation. J Agric Food Chem. 1998, **46**(10), 4091-4096. DOI: 10.1021/jf980296g. ISSN 0021-8561.
71. Eckel R.H., S.M. Grundy, P.Z. Zimmet. The metabolic syndrome. Lancet. 2005, 365, 1415-1428.
72. Fowler M.J. Diagnosis, classification, and lifestyle treatment of diabetes. Clin diabetes. 2010, 28, 79-86.
73. Kashyap S.R., DeFronzo R.A. The inzulin resistence syndrome: Physiological considerations. Diab Vasc Dis Res. 2007, 4, 13-19.
74. Bhattacharya S., K.B. Christiansen, L.C.B. Olsen, L.P. Christensen, K. Grevsen, N.J. Faergeman, K. Kristiansen, J.F. Young, N. Oksbjerg. Bioactive components from flowers of *Sambucus nigra* L. increase glucose uptake in primary porcine myotube cultures and reduce fat accumulation in *Caenorhabditis elegans*. J Agric Food Chem. 2013, 61, 11033-11040.
75. Mikulic – Petkovsek M., J. Samoticha, K. Eler, F. Stampar, R. Veberic. Traditional Elderflower Beverages: A rich Source of phenolic compounds with high antioxidant activity. J Agric Food Chem. 2015, 63, 1477-1487.

76. Gray A. M., Y.H.A. Abel-Wahab, P.R. Flatt. The traditional plant treatment, *Sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro. J Nutr. 2010, 113, 15-20.
77. Swanston-Flatt S.K., C. Day, P.R. Flatt, B.J. Gould, C.J. Bailey. Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. J Diabetes Res. 1998, 10, 69-73.
78. Christensen K. B., R.K. Petersen, K. Kristiansen, L.P. Christensen. Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxizome proliferator-activated receptor (PPAR) gama. Phytother Res. 2010, 129-132.
79. Golay A., Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2005, 19, 649-663.
80. Christensen K., L. Olsen, D. Kotowska, et al. Elderflowers (*Sambucus nigra* L.) have a significant impact on cellular mechanisms related to lipid storage and insulin resistance. Planta Med. 2010, **76**(12). DOI: 10.1055/s-0030-1264931. ISSN 0032-0943.
81. Chrubasik C., T. Maier, C. Dawid, T. Torda, A. Schieber, T. Hofmann, S. Chrubasik. An observation 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.
82. Yeşilada E., O. Üstün, E. Sezik, Y. Takaishi, Y. Ono, G. Honda. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1α, interleukin-1β and tumor necrosis factor α. J Ethnopharmacol. 1997, **58**(1), 59-73. DOI: 10.1016/S0378-8741(97)00076-7. ISSN 03788741.
83. Barak V., S. Birkenfeld, T. Halperin, I. Kalickman. The effect of herbal remedies on production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Isr Med Assoc J. 2002, 4, 919-922.
84. Frøkiær H., L. Henningsen, S.B. Metzdorff, G. Weiss, M. Roller, J. Flanagan, E. Fromentin, A. Ibarra. Astragalus root and elderberry fruit extract enhance the INF-β stimulatory effects of *Lactobacillus acidophilus* in murine-derived dendritic cells. PLoS ONE. 2012, 7, e47878.
85. Groza M., M. Ciocoiu, L. Badescu, O. Badulescu, M. Badescu. The effects of *Sambucus nigra* vegetal extracts on the immune system dysfunction in the diabetes mellitus. Ann Rom Soc Cell Biol. 2010, 15, 241-246.

86. Groza M., D. Jitaru, L. Badescu, M. Ciocoiu, M. Badescu. Evaluation of the immune defense in diabetes mellitus using an experimental model. Rom Biotechnol Lett. 2011, 16, 5971-5979.
87. Kong F. Pilot clinical study on a proprietary elderberry extract: Efficacy in addressing influenza symptoms. Online J Pharmacol Pharmacokinet. 2010, 5, 32-43.
88. Roschek B., R.C. Fink, M.D. McMichael, D. Li, R.S. Alberte. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. Phytochemistry. 2009, **70**(10), 1255-1261. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.06.003. ISSN 00319422.
89. Serkedjieva J., N. Manolova, I. Zgórniak-Nowosielska, B. Zawilińska, J. Grzybek. Antiviral activity of the infusion (SHS-174) from flowers of *Sambucus nigra* L., aerial parts of *Hypericum perforatum* L., and roots of *Saponaria officinalis* L. against influenza and herpes simplex viruses. Phytother Res. 1990, **4**(3), 97-100. DOI: 10.1002/ptr.2650040305. ISSN 0951-418x.
90. Hearst C., G. McCollum, D. Nelson, L.M. Ballard, B.C. Millar, C.E. Goldsmith., P.J. Rooney, A. Loughrey, J.E. Moore, J.R. Rao. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. J Med Plants Res. 2010, 4, 1805-1809.
91. Pehlivan Karakas F., A. Yildirim, A. Türker. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turk J Biol. 2012, 36, 641-652.
92. Nichols J.A., Katiyar S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch Dermatol Res. 2010, **302**(2), 71-83. DOI: 10.1007/s00403-009-1001-3. ISSN 0340-3696.
93. Chen L., J. Y. Hu, S.Q. Wang. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. J Am Acad Dermatol. 2012, **67**(5), 1013-1024. DOI: 10.1016/j.jaad.2012.02.009. ISSN 01909622.
94. Jarzycka A., A. Lewińska, R. Gancarz, K.A. Wilk. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB; photostability in cosmetic emulsions. J Photochem Photobiol B, Biol. 2013, **128**, 50-57. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.07.029. ISSN 10111344.
95. Beaux D., J. Fleurentin, F. Mortier. Effects 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.

96. Goun E. A., V.M. Petrichenko, S.U. Solodnikov, T.V. Suhinina, M.A. Kline, G. Cunningham, C. Nguyen, H. Miles. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. J Ethnopharmacol. 2002, 81, 337-342.
97. Thole J.M., T.F. Burns Kraft, L.A. Sueiro, et al. A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. J Med Food. 2006,**9**(4), 498-504. DOI: 10.1089/jmf.2006.9.498. ISSN 1096-620x.
98. Newell A.M., G.G. Yousef, M.A. Lila, M.V. Ramírez-Mares, E. Gonzalez De Mejia. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of Ardisia and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. J Ethnopharmacol. 2010, **130**(3), 536-544. DOI: 10.1016/j.jep.2010.05.051. ISSN 03788741.
99. Yu H.-B., D.-Y. Li, H.-F. Zhang, H.-Z. Xue, Ch.-E. Pan, S.-H. Zhao, L. Wang. Resveratrol Inhibits Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells. J Anim Vet Adv. 2010-12-1, **9**(24), 3117-3124. DOI: 10.3923/javaa.2010.3117.3124. ISSN 16805593.
100. Lee Y.-T., M.-J. Don, P.-S. Hung, Y.-Ch. Shen, Y.-S. Lo, K.-W. Chang, Ch.-F. Chen, L.-K. Ho. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. Cancer Lett. 2005, 223(1), 19-25. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.09.048. ISSN 03043835.
101. Nakajima Y., H. Nishida, S. Matsugo, T. Konishi. Cancer Cell Cytotoxicity of Extracts and Small Phenolic Compounds from Chaga [Inonotus obliquus (persoon) Pilat]. J Med Food [online] [cit. 2016-03-31]. 2009, 12(3), 501-507. DOI: 10.1089/jmf.2008.1149. ISSN 1096-620x. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.2008.1149>
102. Jensen S. R., Nielsen B. J. Cyanogenic glucosides *Sambucus nigra* L. Acta Chem Scand. 1973, 27, 2661-2662.
103. Barnes J., L.A. Anderson, J. Phillipson. Herbal medicines. 3. vyd. Grayslake, IL: Pharmaceutical Press, 2007, 710 s. ISBN 0853696233.
104. Förster-Waldl E., M. Marchetti, I. Schöll, M. Focke, C. Radauer, T. Kinaciyan, I. Nentwich, S. Jäger, E.R. Schmidt, G. Boltz-Nitulescu, O. Scheiner, E. Jensen-Jarolim. Type I allergy to elderberry (*Sambucus nigra*) is elicited by a 33.2 kDA allergen with significant homology to ribosomal inactivating proteins. Clin Exp Allergy. 2003, 33, 1703-1710.
105. Robertson, S. What are flavonoids? News Medical [online]. 2014 [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/What-are-Flavonoids.aspx>

106. SKALSKÁ, Hana. Aplikovaná statistika. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 2013, 233 s. ISBN 978-80-7435-320-8.
107. Klejdus B., Kubáň V. Rostlinné fenoly v allelopatii. Chemické listy. 1999, vol. 93, 243 – 248.