

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognosie

**Kontrola kvality drogy *Sambuci fructus*
z pěstovaných rostlin**

Diplomová práce

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

Konzultant: RNDr. Anna Polášková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Bc. Hana Studená

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při 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 6. 5. 2014

.....
podpis

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. a RNDr. Anně Poláškové za cenné rady, odborné vedení a pomoc při vypracování této práce.

OBSAH:

1. Úvod a cíl práce	6
2. Teoretická část.....	7
2.1 Černý bez	7
2.2 Významné obsahové látky v plodech bezu černého	7
2.2.1 <i>Sambuci fructus</i>	7
2.2.2 Anthokyany.....	8
2.3 Účinky bezu černého na lidský organismus.....	12
2.4 Požadavky lékopisu na kvalitu drog	12
2.5 Požadavky Českého farmaceutického kodexu na drogu <i>Sambuci fructus</i>	13
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	14
3.1 Materiál	14
3.2 Chemikálie, pomůcky a přístroje	14
3.2.1 Chemikálie	14
3.2.2 Pomůcky a přístroje	15
3.3 Tenkovrstvá chromatografie	15
3.3.1 Příprava extraktů z plodů.....	15
3.3.2 Postup chromatografie	16
3.4 Zkoušky na čistotu	16
3.4.1 Ztráta sušením – čerstvé plody	16
3.4.2 Ztráta sušením – suché plody.....	16
3.4.3 Celkový popel – droga <i>Sambuci fructus</i>	17
3.4.4 Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové – droga <i>Sambuci fructus</i>	17
3.5 Spektrofotometrické stanovení obsahu anthokyanových barviv.....	17
3.5.1 Příprava pufrů s obsahem ethanolu.....	17
3.5.2 Příprava vzorků k analýze.....	18
3.5.3 Kontrola pH u analyzovaných vzorků	19
3.5.4 Kalibrace	19
3.6 Validace metody.....	21
4. Výsledky	23

4.1	Tenkvrstvá chromatografie	23
4.2	Ztráta sušením – čerstvé plody.....	26
4.3	Ztráta sušením – suché plody	26
4.4	Celkový popel – droga <i>Sambuci fructus</i>	27
4.5	Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové – droga <i>Sambuci fructus</i>	27
4.6	Obsah anthokyanů ve vybraných odrůdách bezu černého	28
4.6.1	Spektrofotometrické stanovení	28
4.6.2	Rozdělení anthokyanů v jednotlivých částech plodu.....	30
4.6.3	Srovnání jednotlivých odrůd.....	32
4.7	Stabilita vzorků	34
4.8	Přesnost stanovení anthokyanů pH-diferenční metodou.....	35
5.	Diskuse	36
6.	Závěr.....	42
7.	Abstrakt	43
8.	Abstract.....	44
9.	Literatura.....	45

1. Úvod a cíl práce

Sambucus nigra L., bez černý, je velmi rozšířená dřevina. Roste na okrajích listnatých nebo lužních lesů, na venkově i sídlišťích, podél cest nebo potoků, na zahrádkách i veřejných parcích. Není náročný na podnebné nebo půdní podmínky.

Květy a plody bezu černého obsahují velké množství významných složek, které se využívají nejen ve farmacii, ale i v potravinářském průmyslu. Podle Českého lékopisu 2009 je oficiální droga *Sambuci flos*. Droga *Sambuci fructus*, která je předmětem této práce, v lékopise není, je zahrnuta v Českém farmaceutickém kodexu.

Plody bezu černého jsou bohatým zdrojem anthokyanů, flavonoidů a dalších látek jako jsou například vitamíny skupiny B a C.

V poslední době získává bez černý stále větší pozornost. Dnešní výzkumy jsou zaměřeny na obsah anthokyanů a flavonoidů a jejich biologické a terapeutické účinky.

Experimentální studie dokládají pozitivní vliv anthokyanů na lidské zdraví. Zájem stoupá také i u pěstitelů a šlechtitelů a uvažuje se o založení kultur některých zajímavých odrůd.

Práce je zaměřena na zjišťování některých ukazatelů kvality plodů z pěstovaných odrůd bezu a na stanovení obsahu anthokyanů v různých částech plodů. Použité metody byly převzaty z Českého lékopisu 2009 (ČL), Českého farmaceutického kodexu (ČFK) a v případě anthokyanů šlo o úpravu spektrofotometrického stanovení doporučeného mezinárodní asociací analytických společností (AOAC International) (22). Získané výsledky mohou sloužit k posouzení návrhů využití plodů z pěstovaných odrůd ve farmacii.

2. Teoretická část

2.1 Černý bez

Bez černý je běžně se vyskytující bohatě rozvětvený, opadavý keř, popřípadě menší strom dorůstající do výšky až 5 m, výjimečně i více metrů. Je to nenáročná dřevina, schopná se přizpůsobit různému prostředí. Toleruje vlhké i suché podnebí, není náročná na živiny a dává přednost umístění na přímém slunci. Je hojně zastoupen v mírných i subtropických oblastech světa, roste v nížinách i ve vyšších polohách. Často je pěstován jako okrasný keř na zahrádkách nebo ve veřejných parcích (1, 2).

Sambucus nigra L. má světle hnědou až šedou popraskanou kůru. Listy jsou úzké, řapíkaté, lichozpeřené se 3 až 7 lístky, tmavě zelené barvy, na okraji nepravidelně pilovité. Bez černý kvete v našem podnebném pásu od konce května do začátku června. Drobné květy, s bílou až nažloutlou barvou a výraznou vůní, jsou uspořádané do bohatého vrcholičnatého květenství. Plodem jsou 5 - 8 mm velké peckovice, tzv. bezinky, které dozrávají na konci léta. Zralé plody mají fialovou až černou barvu (2, 4).

Nově se řadí do čeledi *Adoxaceae* (3, 7) (dříve *Caprifoliaceae*, resp. *Sambucaceae*) (1, 2). Rod *Sambucus* L. zahrnuje asi 20 druhů. Nejrozšířenějším druhem je *Sambucus nigra* L. - bez černý. Dalšími významnými druhy jsou *Sambucus racemosa* L. - bez červený, *S. ebulus* L. - bez chebdí nebo *S. canadensis* L. - bez kanadský (1, 3).

2.2 Významné obsahové látky v plodech bezu černého

V bezu černém se vyskytuje velké množství významných látek, u kterých je popsán farmakologický účinek. Dle Českého lékopisu 2009 poskytuje lékopisnou drogu - *Sambuci flos* (5). V Českém farmaceutickém kodexu je pak zahrnuta droga *Sambuci fructus* (6).

2.2.1 *Sambuci fructus*

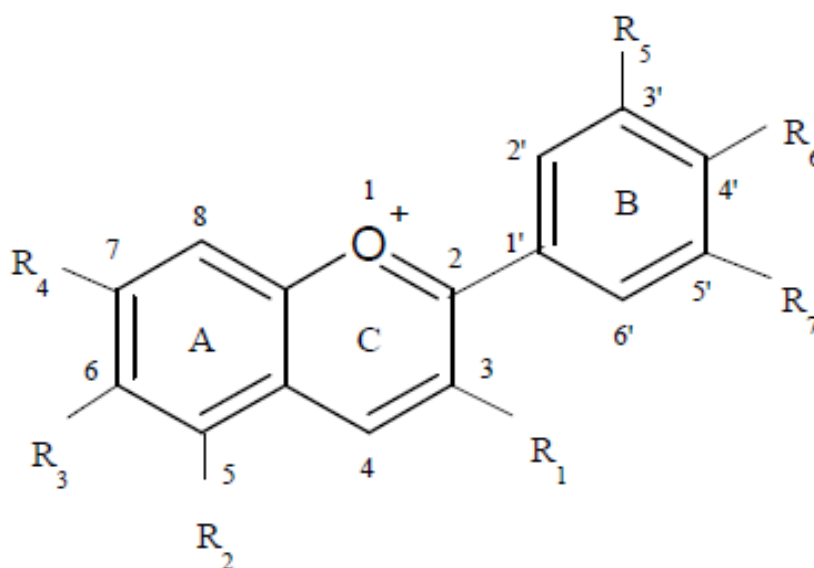
Plody bezu černého jsou bohaté zejména na anthokyany a flavonoidy, organické kyseliny (kyseliny citronová, jablečná a další) a třísloviny. Čerstvé bezinky obsahují

vitamíny B₂, B₆, biotin, kyselinu pantothenovou, kyselinu listovou, vitamín C, β-karoten a cukry (fruktosa, glukosa). Někdy se uvádí přítomnost kyanogenních glykosidů (sambunigrin) u nezralých a čerstvých plodů. Obsah těchto glykosidů klesá při dozrávání plodů nebo je lze odstranit tepelným zpracováním (7 - 9).

2.2.2 Anthokyany

Anthokyany jsou po chemické stránce polyfenoly. Název anthokyan má svůj původ v řeckém slově *anthos* = květ a *kianos* = modrý (12). Jde o obecně rozšířenou skupinu rostlinných barviv, která podmiňují zabarvení rostlinných pletiv, včetně listů, květů a plodů. Propůjčují jim širokou škálu barevných odstínů od růžové přes červenou, fialovou až po modrou. Stejně tak jsou důležitým indikátorem kvality plodů, ovlivňují jejich vzhled i chuť. Patří k nejpoužívanějším přírodním barvivům v potravinářském průmyslu. Vědecké studie také prokazují pozitivní účinek anthokyanů na lidské zdraví (10 - 12).

Anthokyany jsou složeny z aglykonu (necukerné části) neboli anthokyanidinu a cukerné složky (glukosa, galaktosa, rhamnosa, xylosa, arabinosa). Všechny anthokyanidiny jsou odvozeny od základní struktury, kterým je flavyliový (2-fenylbenzopyryliový) kation (obr. 1) (10, 13, 14).



Obr. 1: Struktura flavyliového kationtu

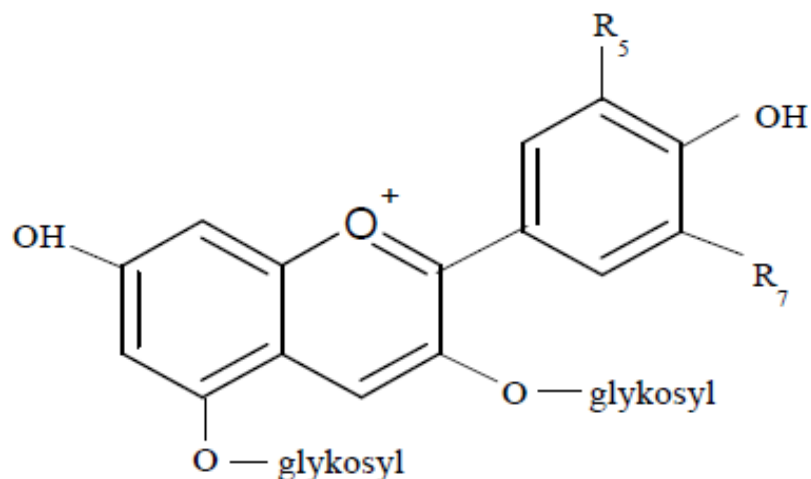
Skládá se z aromatického kruhu A a heterocyklického kruhu C obsahujícího kyslík, který je vázán pomocí vazby uhlík-uhlík na třetí aromatický kruh B (12, 14).

Syntéza anthokyanů v rostlině probíhá dvěma cestami. Část molekuly se tvoří z kyseliny šikimové přes fenylalanin a následnou enzymatickou přeměnou této aminokyseliny na *p*-kumaryl-CoA. Další část molekuly vzniká cestou, která produkuje tři molekuly malonyl-CoA. V dalším kroku se výsledné produkty obou drah spojují pomocí chalkonsyntázy a vzniká meziprodukt chalkon, z něhož se izomerázou vytváří naringenin. Naringenin je následně hydroxylován na dihydroflavonol, ze kterého redukcí vznikají jednotlivé leukoanthokyanidiny. Připojením molekuly cukru k anthokyanidinům působením transferáz vznikají anthokyany (10, 17).

Dosud bylo popsáno více než 20 přirozeně se vyskytujících anthokyanidinů. Mezi nejčtenější aglykony patří kyanidin, pelargonidin, peonidin, delfinidin, petunidin a malvidin (tab. 1) (10, 14, 16). Pokud je na anthokyanidiny navázán cukr, mluvíme o anthokyanech. Ke glykosidické vazbě většinou dochází v poloze C3 a C5 (obr. 2) (13).

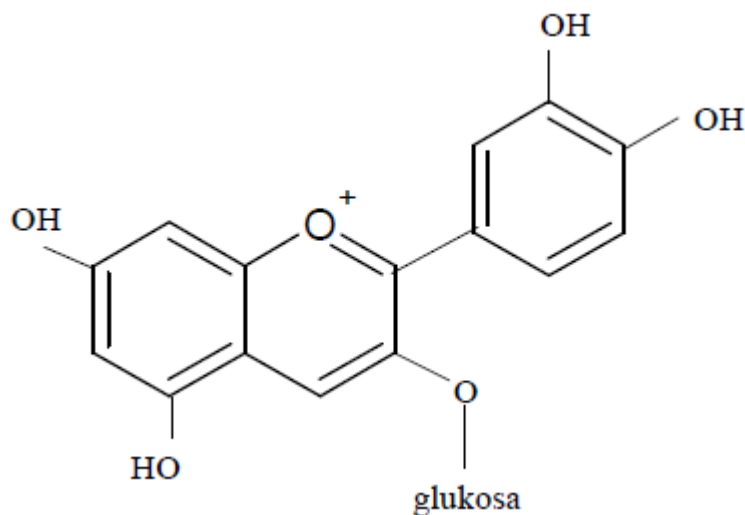
Tab. 1: Přehled hlavních struktur anthokyanidinů

Aglykon	Substituční skupina							Barva
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Kyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	oranžovo-červená
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	oranžovo-červená
Peonidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	oranžovo-červená
Delfinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	modro-červená
Petunidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	modro-červená
Malvidin	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	modro-červená



Obr. 2: Struktura glykosidické vazby v poloze C3 a C5

Anthokyanů bylo v rostlinách identifikováno více než 700 (16, 23). Anthokyanu bezu černého jsou vesměs odvozeny od kyanidinu. Běžně se vyskytuje kyanidin-3-*O*- β -glukosid (obr. 3), někdy další anthokyanové pigmenty. K nejčastějším patří kyanidin-3,5-diglukosid a kyanidin-3-sambubiosid (13, 16).



Obr. 3: Kyanidin-3-*O*- β -glukosid (10, 13)

Anthokyanu jsou dobře rozpustné ve vodě. Značně absorbují ve viditelné části spektra. Obecně platí, že jsou stabilnější při kyselém pH a také v tomto prostředí vytváří intenzivní zbarvení (10, 13).

V minulých letech byla zpochybněna bezpečnost používání řady syntetických barviv. Proto je v poslední době zaznamenána vyšší poptávka po anthokyanech jako přírodních barvivech. Zájem je také o potraviny bohaté na anthokyany kvůli možnému pozitivnímu vlivu na lidské zdraví (15, 24).

Řada výzkumů naznačuje, že jde o látky, které mají protizánětlivé, antimikrobiální a také antioxidační účinky (14, 24). Snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění (23) a poruch spojených s kapilární lomivostí (15), působí proti otokům (17) a posilují zrak (15). Ukázalo se, že by se mohlo jednat o látky perspektivní pro léčbu diabetu (26), některých degenerativních onemocnění (14) nebo určitých typů nádorů (25).

Anthokyany jsou látky významné i pro samotnou rostlinu, i když jejich biologické role dosud nejsou plně objasněny. Zatím existují jen vědecké hypotézy, které předpokládají ochrannou funkci anthokyanů před nadměrným dopadajícím viditelným i UV zářením (18 - 20).

Některé studie také naznačují významnou antioxidační aktivitu anthokyanů, které tak chrání rostlinu před volnými radikály a oxidačním stresem (18, 20).

Dalšími stresovými faktory pro rostlinu mohou být chlad, sucho, poškození rostlinné tkáně nebo znečišťující látky v ovzduší. Rostliny, které jsou nadměrně exponovány těmito vnějšími vlivům, často reagují zvýšenou produkcí anthokyanů. Zvýšená syntéza anthokyanů v rostlině tedy může být považována za obrannou reakci rostliny nebo za symptom stresu (18, 20). Tvorba anthokyanů v jednotlivých částech rostliny může být proměnlivá nebo trvalá, záleží na rostlinném druhu, stupni zralosti nebo vývojové fázi rostliny a působení vnějších faktorů. Jednotlivé mechanismy indukující zvýšenou tvorbu anthokyanů zatím nejsou plně vysvětleny.

V neposlední řadě dávají anthokyany květům a plodům atraktivní zbarvení, kterým zřejmě lákají hmyz a další zvířata. Podílí se tak na rozmnožování rostlin. Jak již bylo poznamenáno, biologické role anthokyanů jsou stále ještě předmětem výzkumu (18 - 20).

2.3 Účinky bezu černého na lidský organismus

Bez černý patří po mnoho staletí mezi léčivé rostliny působící například jako diuretikum, laxativum, adstringens, diaforetikum. Již v minulosti naši předkové používali bez k léčebným i jiným účelům. Využívaly se hlavně květy a plody. Dosud se používají nejenom v lidovém léčitelství, ale také jako potravinářská barviva (například k dobarvování vín), příchutě a kosmetické přípravky (7). Ve formě drog *Sambuci flos* a *Sambuci fructus* se bez černý využívá i v současné farmacii, i když oficiální droga je jen *Sambuci flos* (ČL) (5). *Sambuci fructus* je však uveden v ČFK (6).

Plod bezu černého

Plody bezu černého se v lidovém léčitelství doporučují při onemocnění z nachlazení provázeném horečkou a zimnicí, při kašli, angínách, chřipce nebo při bolestech nervového původu. Čerstvé plody mají mírně projímavý účinek. Účinky drogy *Sambuci fructus* jsou využívány i v současné fytoterapii a použití této drogy tak navazuje na tradici v lidovém léčitelství. Některé studie ukazují slibné účinky plodů jako prevence proti oxidačnímu stresu, bakteriálním a virovým infekcím (8). Stále je ale potřeba dalších studií k ověření jeho klinického efektu, mimo jiné i pro občas se vyskytující varování v souvislosti s obsahem kyanogenních látek v různých částech rostliny (8).

2.4 Požadavky lékopisu na kvalitu drog

Dle lékopisu je kvalita drog posuzována podle několik hledisek. Mezi ně patří organoleptické vlastnosti drog, zkoušky totožnosti a čistoty a stanovení obsahových látek v drogách. Zkouška totožnosti drog zahrnuje mikroskopický i makroskopický popis drogy, většinou jsou vyžadovány i další zkoušky, například tenkovrstvá chromatografie. U zkoušek na čistotu se stanovují příměsi, ztráta sušením, celkový popel a některé další charakteristiky. Zkoušky popsané v lékopisu jsou oficiální metody, na nichž jsou založeny lékopisné normy (5).

2.5 Požadavky Českého farmaceutického kodexu na drogu *Sambuci fructus*

Podle Českého farmaceutického kodexu (ČFK 1) se jedná o usušený plod druhu *Sambucus nigra* L. Jeho totožnost se ověřuje podle vzhledu a mikroskopických znaků. Je popisován jako lesklá červenofialová peckovice, silně scvrklá, hrubě řasnatě svraštělá, dužnatá se třemi semeny. Jde o drogu bez zápachu se sladkou, slizovitou chutí.

Pod mikroskopem je exokarp složen z protáhlých buněk, které jsou ohraničeny jemně tečkovanými stěnami s výrazně proužkovanou zvrásněnou kutikulou. Ojedinele se vyskytují stomata. Mezokarp je tvořen nepravidelně ztlustlými buňkami s částečně zeslizovatělými stěnami, obsahujícími barvivo. Endokarp může být složen z několika vrstev. Pod vrstvou malých parenchymatických buněk se nachází silně ztlustlé, navzájem zaklíněné a různě vysoké palisádové sklereidy. A dále pod nimi jsou zřejmá ztlustlá, tečkovaná vlákna uložená rovnoběžně s podélnou osou semena. Další dvě vrstvy jsou orientovány kolmo. Osemení je složeno z několika vrstev nahnědlých buněk. V endospermu se vyskytují kapky oleje a aleuronová zrna.

U zkoušek na čistotu jsou předepsány limity pro příměsi, ztrátu sušením, popel a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové. Je požadováno, aby jinak zbarvené drogy bylo nejvýše 5,0 %, jiných částí matečné rostliny také nejvýše 5,0 % a cizích organických příměsí nejvýše 1,0 %. Pro ztrátu sušením je předepsáno nejvýše 12,0 %, popel je nejvýše 6,0 % a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové maximálně 1,0 %.

V příslušném článku v ČFK 1 je také doporučení pro uchovávání. Droga se uchovává v uzavřených obalech chráněna před světlem. V závěru článku jsou pokyny pro vydávání – je uvedena jednotná terapeutická dávka 2,0 g drogy perorálně ve formě odvaru. Droga je zařazena do farmakologické skupiny fytofarmaka - laxancia (6).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Vzorky plodů bezu pro experimentální část práce pocházely z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousech. Pro tuto práci byly využity plody čtyř kultivarů bezu černého a jeden vzorek z volně rostoucího planého bezu (tab. 2). Plody jednotlivých kultivarů byly po sběru zmrazeny a uchovávaly se v plastových krabičkách v mrazničce při teplotě -18 °C.

Tab. 2: Seznam odrůd bezu černého hodnocených v této práci

	NÁZEV ODRŮDY	DATUM SBĚRU
1.	Sambo	26. 8. 2013
2.	Sambu	21. 8. 2013
3.	Samyl	26. 8. 2013
4.	Samdal	26. 8. 2013
5.	planý	11. 9. 2013

3.2 Chemikálie, pomůcky a přístroje

3.2.1 Chemikálie

- butan-1-ol p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- cyanin chloride (kyanidin-3,5-diglukosid) (Sigma-Aldrich, Německo)
- ethanol p.a. (Penta, Česká republika)
- chlorid draselný p.a. (Penta, Česká republika)
- kuromanin chloride (kyanidin-3-O-β-glukosid) (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina citronová p.a. (Penta, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková p.a. (Penta, Česká republika)
- kyselina mravenčí bezvodá p.a. (Penta, Česká republika)
- octan sodný p.a. (Penta, Česká republika)

3.2.2 Pomůcky a přístroje

- analytické váhy (Sartorius, Česká republika)
- automatické pipety 5 ml, 1000 μ l (Biohit, Finsko)
- centrifuga (Hermle, Německo)
- chromatografická deska s vrstvou silikagelu (Kavalier, Česká republika)
- pH metr (Multi 340i, WTW, Německo)
- sušárna (Binder, Německo)
- ultrazvuková vodní lázeň (Bendelin Sonorex, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr HALO DB-20S, software UV Detective Plus (DYNAMICA GmbH, Rakousko)

3.3 Tenkovrstvá chromatografie

3.3.1 Příprava extraktů z plodů

Zmrazené plody byly zbaveny stopek. Bylo naváženo 20 g zmrazených plodů každé odrůdy bezu černého. K navážce byly přidány 2 ml 1M kyseliny citronové (stabilizace). Poté byly plody rozmačkány v třecí misce tloučkem a za pomoci sítka rozděleny na 2 frakce:

- dužnina,
- exokarp.

Pro srovnání byla také analyzována směs rozdrcené dužniny a exokarpu.

Z každé frakce i ze směsného vzorku byly do zkumavek naváženy vždy 2 vzorky po 1,1 g materiálu. Navážka 1,1 g vždy obsahovala 0,1 g přidávané kyseliny citronové, a odpovídala tedy 1,0 g rostlinného materiálu. Do každé zkumavky bylo pipetováno 10 ml 50% ethanolu. Vzorky se extrahovaly 10 min v ultrazvukové vodní lázni za laboratorní teploty a poté byly odstředěny v centrifuze 15 min při 1500 otáčkách za minutu a teplotě 15 °C. Po odstředění se supernatant vždy opatrně slil do jiné předem připravené zkumavky a ke zbytku materiálu byly přidány 3,9 ml 50% ethanolu. Následně se vzorky znovu extrahovaly 10 min v ultrazvukové lázni a 15 min odstřeďovaly v laboratorní centrifuze při stejných otáčkách i teplotě. Supernatant se

opět slil do prvního podílu. Takto získaný extrakt odpovídající 1 g rostlinného materiálu v 15 ml extraktu se důkladně promíchal.

3.3.2 Postup chromatografie

Na desku s vrstvou silikagelu byly naneseny standardy (kyanidin-3-*O*- β -glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid) a extrakty dužniny jednotlivých kultivarů. Jako mobilní fáze byla použita soustava kyselina mravenčí bezvodá R : voda R : butan-1-ol R v poměru 16 : 19 : 65. Vyvíjení mobilní fáze probíhalo vzestupně v chromatografické komoře přibližně 60 min po dráze 10 cm. Poté se nechala chromatografická deska uschnout na vzduchu a detekce probíhala na denním světle (5).

Chromatogramy jsou zobrazeny na obrázku 6 a 7.

3.4 Zkoušky na čistotu

3.4.1 Ztráta sušením – čerstvé plody

Ztráta sušením čerstvých plodů bezu černého byla stanovena postupem podle článku drogy *Myrtilli fructus recens*, která je také bohatým zdrojem anthokyanů (5).

Do předem vysušené a zvážené váženky bylo naváženo 5,000 g zmrazených plodů *Sambuci fructus*. Sušení probíhalo v sušárně při 105 ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Před vážením se váženka se vzorkem vždy nechala vychladnout v exsikátoru (5).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

3.4.2 Ztráta sušením – suché plody

Ztráta sušením drogy byla stanovena postupem podle článku v ČFK 1 *Sambuci fructus* (6).

Do předem vysušené a zvážené váženky bylo naváženo 1,000 g drogy *Sambuci fructus*. Sušení probíhalo v sušárně při 105 ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Před vážením se váženka se vzorkem vždy nechala vychladnout v exsikátoru (5).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

3.4.3 Celkový popel – droga *Sambuci fructus*

Křemenný kelímek byl žíhán 30 min do červeného žáru. V exsikátoru se nechal vychladnout a zvažil se. Poté bylo do kelímku naváženo 1,000 g drogy. Kelímek s naváženou drogou se sušil 1 h při 100 - 105 °C a následně se žíhal do konstantní hmotnosti v muflové peci při 600 ± 25 °C (5).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

3.4.4 Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové – droga *Sambuci fructus*

Do kelímku, který obsahoval zbytek po stanovení celkového popela, bylo přidáno 15 ml vody R a 10 ml kyseliny chlorovodíkové R. Poté byl kelímek přiryt hodinovým sklem a mírně zahříván na vodní lázni. Po ochlazení byl obsah kelímku zfiltrován přes bezpopelný filtr. Zbytek na filtru byl promyt teplou vodou R až do neutrální reakce filtrátu. Filtrační papír byl v kelímku vysušen v horkovzdušné sušárně a poté spálen v muflové peci. Po vychladnutí v exsikátoru byl kelímek s popelem nerozpustným v kyselině chlorovodíkové zvážen (5).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

3.5 Spektrofotometrické stanovení obsahu anthokyanových barviv

3.5.1 Příprava pufrů s obsahem ethanolu

- Příprava pufru o nominálním pH 1,0 obsahujícího 0,025M chloridu draselného
K 500 ml 0,025M chloridu draselného a 1M kyseliny chlorovodíkové bylo přidáno 500 ml 96% ethanolu (v/v).

- Příprava acetátového pufru o nominálním pH 4,5
Do 400 ml vody R bylo přidáno 1,641 g octanu sodného. Roztok byl upraven 1M kyselinou chlorovodíkovou na pH 4,5 a doplněn do 500 ml. K 500 ml tohoto roztoku bylo přidáno 500 ml 96% ethanolu (v/v).

Uvedené složení základních pufrů odpovídá metodickému doporučení (21, 27) pro stanovení anthokyanů v potravinářství. Přídavek ethanolu pro zlepšení stability vzorku je součástí nové modifikace stanovení.

U obou pufrů byla zkontrolována a zaznamenána skutečná hodnota pH.

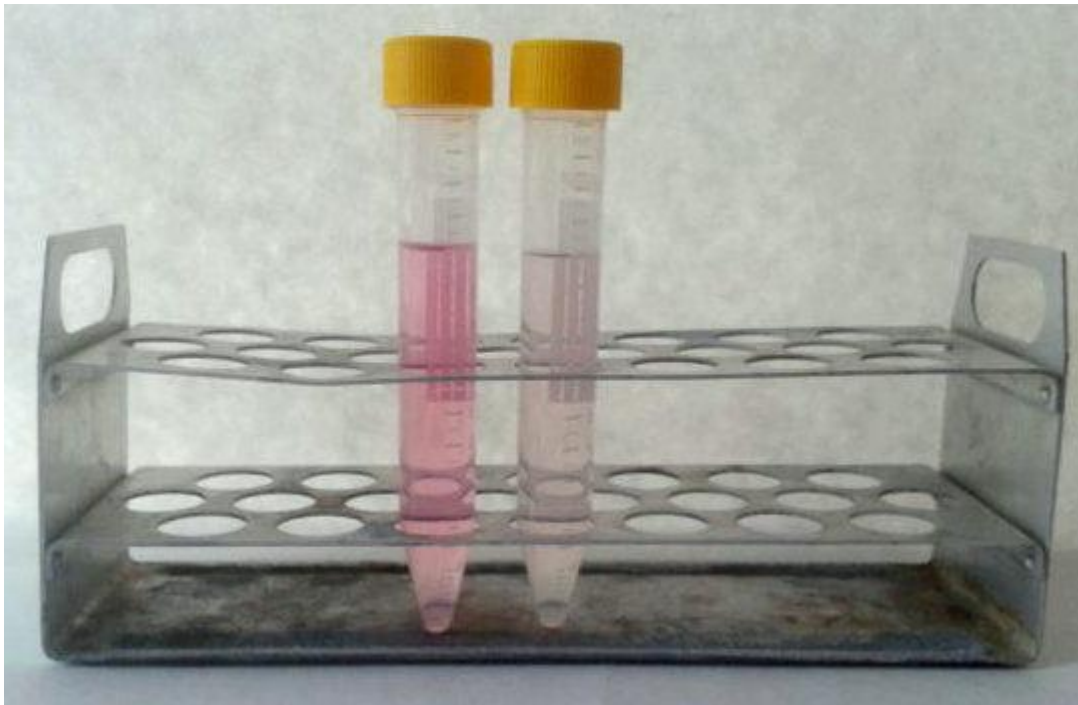
3.5.2 Příprava vzorků k analýze

K analýze jednotlivých odrůd bezu černého byly použity extrakty získané dle kap. 3.3.1. Z těchto extraktů byly připraveny dvě sady vzorků po šesti zkumavkách. První sada vzorků byla určena pro měření barevné formy anthokyanů, druhá sada pro měření bezbarvé formy (obr. 4). V každé sadě byly vždy tři dvojice vzorků:

- 2x extrakt z dužniny,
- 2x extrakt z exokarpu,
- 2x extrakt ze směsi rozdrčené dužniny a exokarpu.

Množství extraktu v každé zkumavce bylo vždy 125 μ l. K extraktu v první sadě bylo pipetováno 8,25 ml pufru o nominálním pH 1,0. K druhé sadě vzorků bylo pipetováno také 8,25 ml acetátového pufru o nominálním pH 4,5. Při tomto ředění obsahoval 1 ml připraveného vzorku k měření vždy extrakt z 1 mg původního rostlinného materiálu (dužniny, exokarpu nebo směsi).

Připravené vzorky jednotlivých odrůd byly proměřeny ve dvou pufrech o nominálním pH 1,0 a 4,5 pomocí UV/VIS spektrofotometru v oblasti vlnových délek od 250 - 650 nm. Jako slepé vzorky byly použity samotné pufrы o nominální hodnotě pH 1,0 a pH 4,5. Měření bylo provedeno do 2 hodin po přípravě vzorků.



Obr. 4: Ukázka barevného a téměř bezbarvého vzorku anthokyanových barviv při různém pH, foto: H. Studená

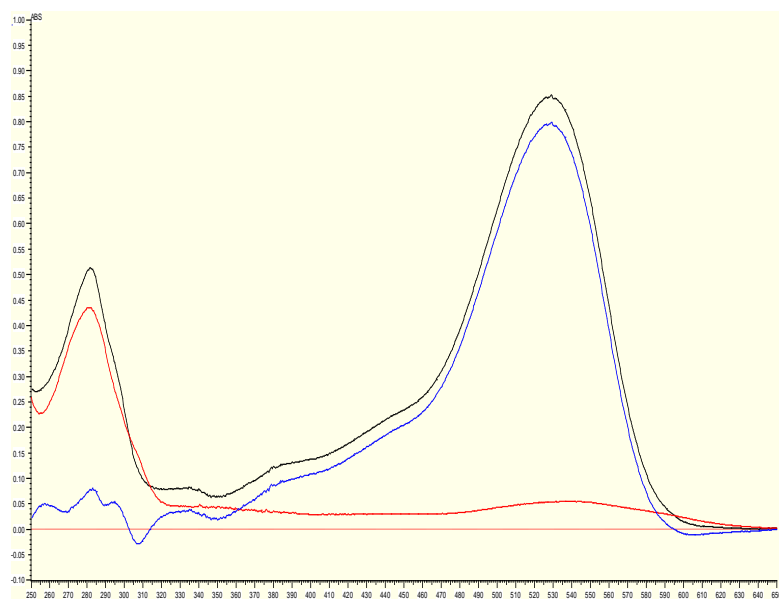
3.5.3 Kontrola pH u analyzovaných vzorků

Kontrola pH byla pravidelně prováděna po spektrofotometrické analýze u vzorků extraktů z jednotlivých odrůd bezu černého. pH bylo stanoveno pomocí pH metru se skleněnou elektrodou při dvoubodové kalibraci (pH = 4 a pH = 7) za laboratorní teploty. Skutečně naměřená hodnota pH je ovlivněna přítomností ethanolu případně analytu. Vždy však musí být pro měření barevné formy anthokyanů pH nižší než 2 a u bezbarvé formy vyšší než 4,5 (21).

3.5.4 Kalibrace

Obsah anthokyanů se nejčastěji vyjadřuje jako ekvivalent obsahu nejběžněji se vyskytujícího kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu (CGE). Pomocí tohoto standardu byl také hodnocen obsah anthokyanů v jednotlivých odrůdách bezu černého. Zaznamenávala se vždy spektra (250 - 650 nm) barevné a bezbarvé formy standardu. Diferenční křivka, která představuje rozdíl absorbance barevné a bezbarvé formy ve vhodné oblasti spektra (obvykle 380 – 600 nm), byla vyhodnocena pomocí automatického programu

spektrofotometru (obr. 5). Automatickým programem byla provedena integrace a zjištěna plocha pod diferenční křivkou.



Obr. 5: Spektrální záznam standardu kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu

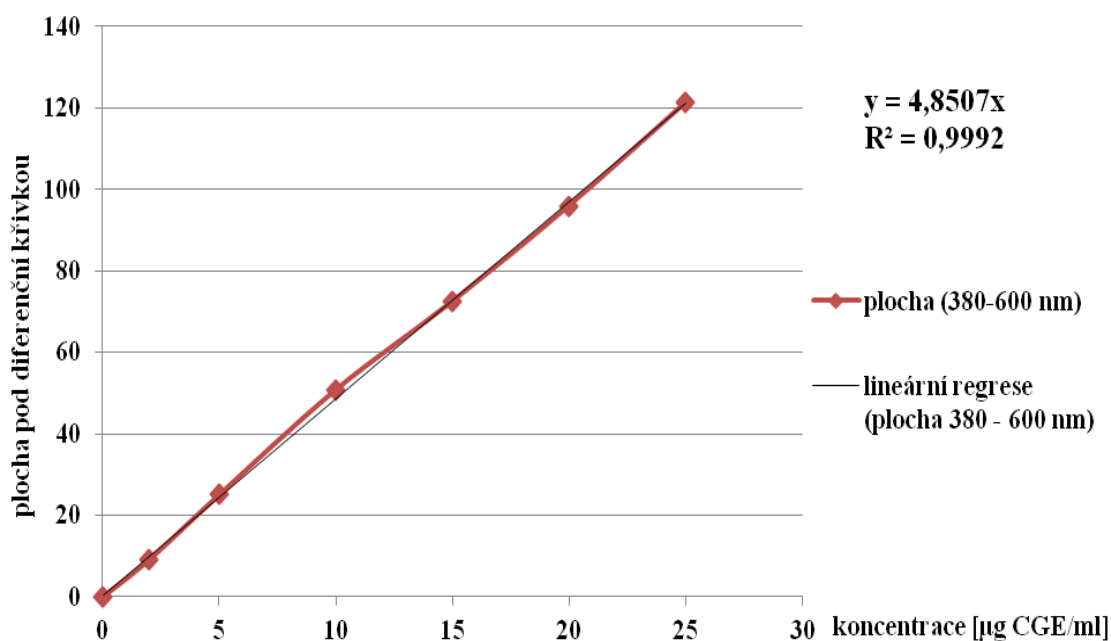
černá křivka - barevná forma anthokyanů,

červená křivka - bezbarvá forma anthokyanů,

modrá křivka - rozdílová (diferenční křivka)

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost plochy pod diferenční křivkou na koncentraci standardu ve vzorku. Kalibrační graf byl sestaven pomocí šesti dvojic kalibračních vzorků.

5,00 mg standardu kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu bylo přesně naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v 25 ml 50% ethanolu. Takto byl získán zásobní roztok o koncentraci 200 μ g/ml, ze kterého byly připraveny dvě sady kalibračních roztoků. První sada byla ředěna pufrům o nominálním pH 1,0 a druhá sada pufrům o nominálním pH 4,5. Kalibrační roztoky měly koncentraci: 2, 5, 10, 15, 20 a 25 μ l/ml. Koncentrace byly voleny tak, aby obsáhly celý rozsah absorbancí analyzovaných extraktů jednotlivých odrůd. Kalibrační vzorky byly proměřeny pomocí spektrofotometru s programem umožňujícím matematické operace (odečítání a integrace absorbancí).



Graf 1: Kalibrační graf

Závislost odezvy na koncentraci standardu kyanidinu-3-*O*-β-glukosidu je lineární.

Pro výpočty koncentrace vzorků lze použít rovnici:

$$c \text{ (}\mu\text{g CGE/ml)} = \Delta \text{ AUC}_{380-600 \text{ nm}} / 4,8507$$

c (μg CGE/ml) - koncentrace anthokyanů v měřeném vzorku vyjádřená jako ekvivalent kyanidinu-3-*O*-β-glukosidu,

$\Delta \text{ AUC}_{380-600 \text{ nm}}$ - plocha pod diferenční spektrofotometrickou křivkou

Pro praktické srovnání se obsah anthokyanů v plodech vyjadřuje většinou v mg CGE/100 g rostlinného materiálu.

3.6 Validace metody

Pro ověření spolehlivosti výsledků byla hodnocena linearita odezvy (viz kalibrační graf), přesnost stanovení a stabilita vzorků.

- Příprava extraktu (viz kapitola 3.3.1)

Pro hodnocení přesnosti metody byl použit extrakt dužniny z kultivaru Sambu.

- **Příprava vzorků k analýze**

K analýze byly použity dvě sady vzorků po třech zkumavkách. První sada byla určena pro měření barevné formy anthokyanů a obsahovala 7,85 ml pufru o nominálním pH 1,0, druhá sada pro kontrolní měření bezbarvé formy a obsahovala stejné množství pufru o nominálním pH 4,5. K pufrům bylo vždy přidáno 500 μ l extraktu. Při tomto ředění obsahoval 1 ml připraveného vzorku k měření extrakt ze 4 mg testovaného materiálu.

Pomocí spektrofotometru s automatickým programem se vyhodnotily plochy diferenčních křivek (rozdíl absorbancí barevné a bezbarvé formy) v rozsahu 380 - 600 nm.

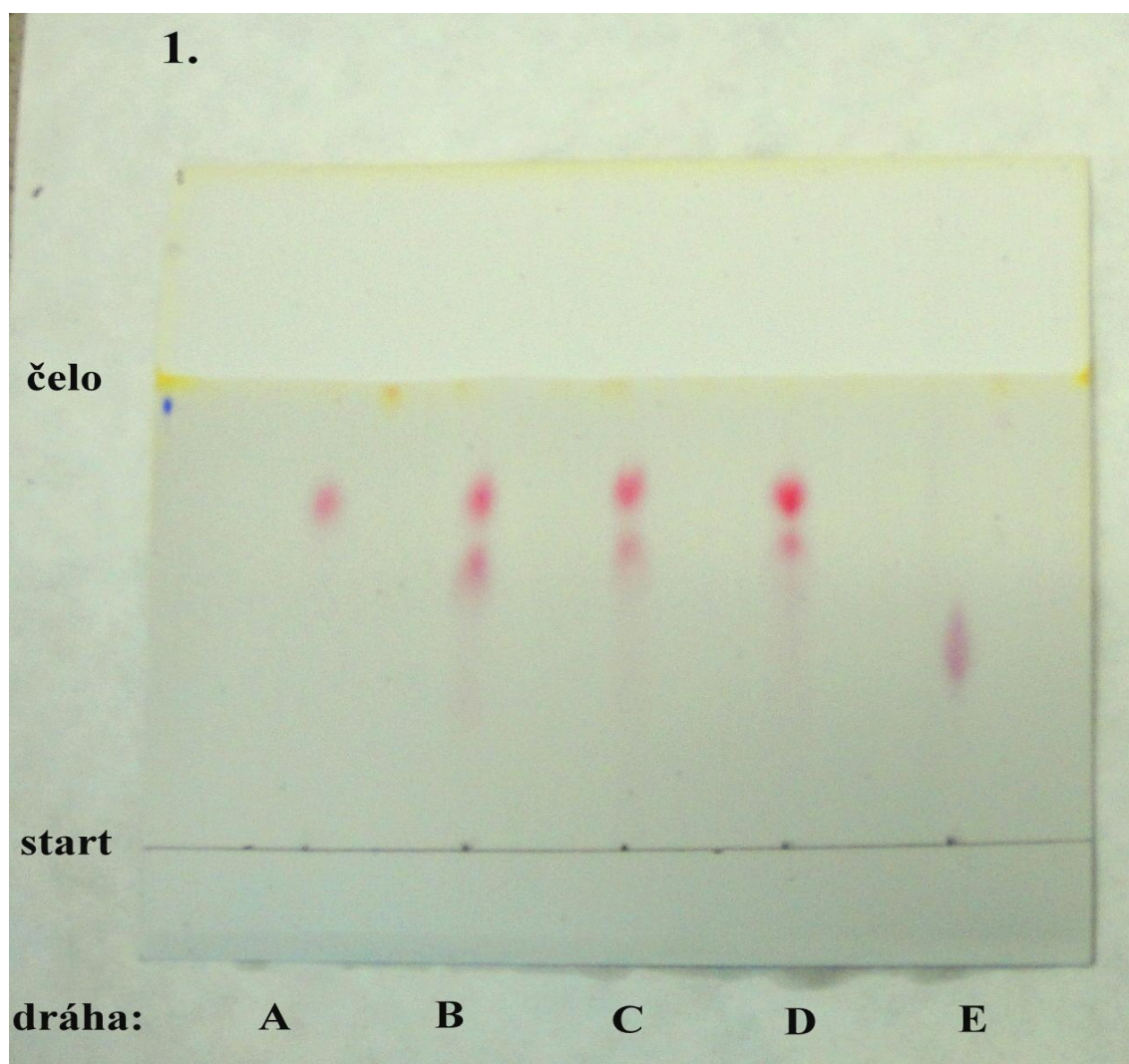
- **Přesnost metody** se hodnotila na základě standardní odchylky stanovení.
- **Stabilita vzorku** byla ověřena opětovným měřením stejného vzorku po 24 hodinách. Vzorky byly uchovány při laboratorní teplotě v uzavřené zkumavce. Stabilita byla testována u všech frakcí kultivarů Sambu a Samyl.

4. Výsledky

Výsledky byly zpracovány ve formě grafů, obrázků a tabulek.

4.1 Tenkovrstvá chromatografie

Polohy skvrn jednotlivých barevných složek extrahovaných z plodů odrůd bezu černého byly charakterizovány retardačními faktory (R_F) a porovnány s retardačními faktory standardů (kyanidin-3-*O*- β -glukosid, kyanidin-3,5-diglukosid).



Obr. 6: Chromatogram plodů odrůd Samyl, Sambo, Samdal

Foto: H. Studená

A – kyanidin-3-*O*- β -glukosid,

D – Samdal,

B – Samyl,

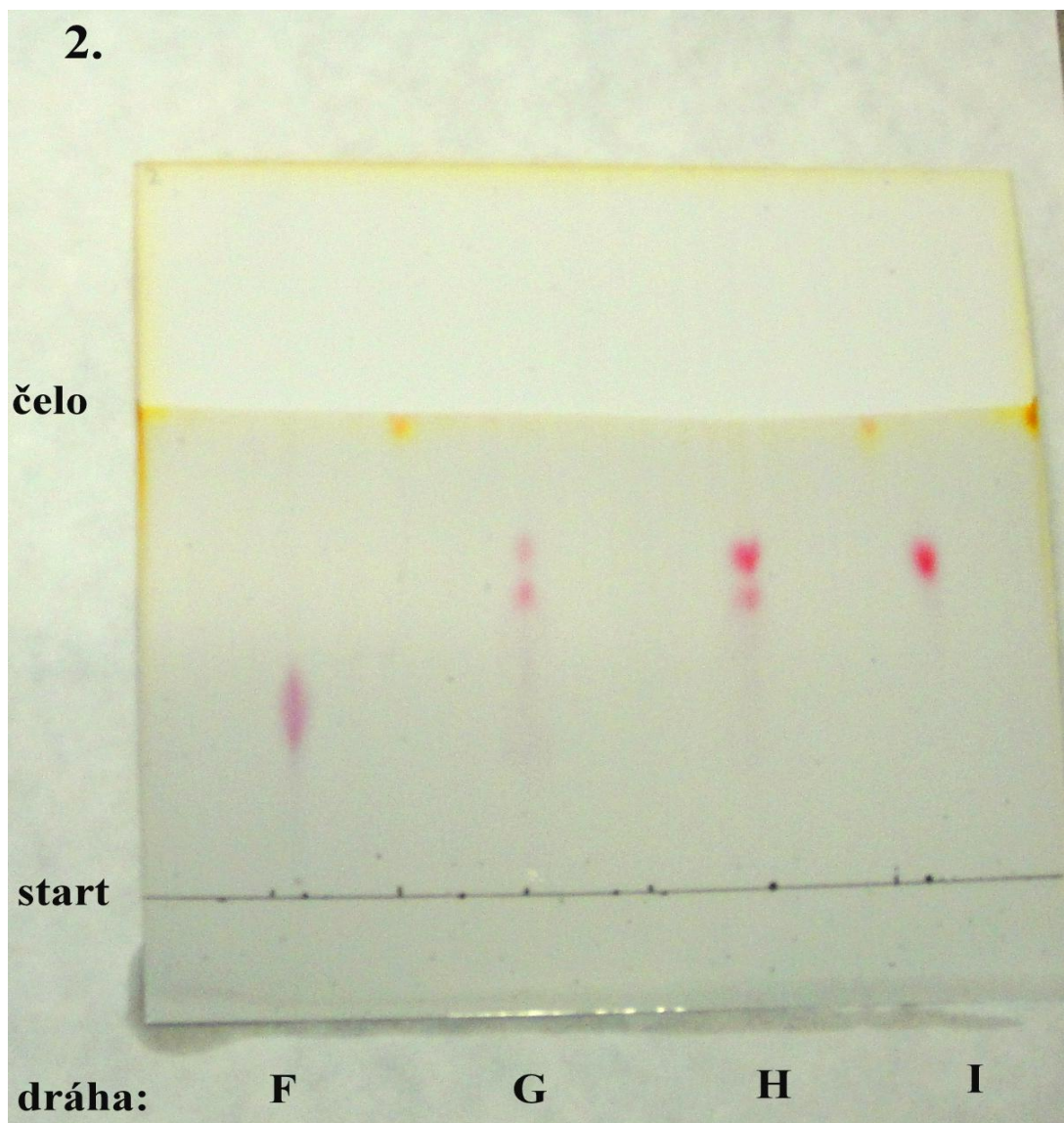
E – kyanidin-3,5-diglukosid

C – Sambo,

Tab. 3: Hodnoty retardačních faktorů jednotlivých skvrn u kultivarů Samyl, Sambo, Samdal

Odrůda	R _F 1	R _F 2	R _F 3
Samyl	1,34	1,62	-
Sambo	1,33	1,59	-
Samdal	1,34	1,60	-
Kyanidin-3-O-β-glukosid	1,35	-	-
Kyanidin-3,5-diglukosid	-	-	2,39

Prokázána byla tedy přítomnost kyanidinu-3-O-β-glukosidu u kultivarů Samyl, Sambo i Samdal. Kyanidin-3,5-diglukosid nebyl prokázán (tab. 3). V drahách kultivarů se vyskytuje ještě jedna výrazná skvrna, jejíž retardační faktor byl v rozmezí 1,59 - 1,62 (tab. 3, obr. 6). Pravděpodobně se jedná o další anthokyan, pro který nebyl k dispozici standard.



Obr. 7: Chromatogram plodů odrůd bezu planého a Sambu Foto: H. Studená
F – kyanidin-3,5-diglukosid, **H** – Sambu,
G – planý bez, **I** – kyanidin-3-*O*- β -glukosid

Tab. 4: Hodnoty retardačních faktorů jednotlivých skvrn u bezu planého a kultivaru Sambu

Odrůda	R _F 1	R _F 2	R _F 3
planý bez	1,43	1,62	-
Sambu	1,44	1,64	-
Kyanidin-3- <i>O</i> - β -glukosid	1,45	-	-
Kyanidin-3,5-diglukosid	-	-	2,53

Podobně jako v předchozím případě (obr. 6) byla na základě shody retardačních faktorů prokázána přítomnost kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu u planého bezu i u kultivaru Sambu. Kyanidin-3,5-diglukosid nebyl prokázán (tab. 4). V drahách obou odrůd se opět vyskytuje ještě jedna skvrna, jejíž retardační faktor byl v rozmezí 1,62 - 1,64 (tab. 4, obr. 7). Pravděpodobně se jedná o další anthokyan, pro který nebyl k dispozici standard.

4.2 Ztráta sušením – čerstvé plody

Tab.5: Ztráta sušením – čerstvé plody bezu černého

Odrůda	Navážka (g)	Hmotnost (po vysušení) (g)	Ztráta sušením (%)
Sambo	5,0708	0,8725	82,8 \pm 0,200
Sambu	5,1481	0,8824	82,9 \pm 0,450
Samyl	5,1022	0,8834	82,7 \pm 0,050
Samdal	5,0783	0,9047	82,2 \pm 0,200
planý b.	5,0788	0,9067	82,2 \pm 0,650

Výsledné hodnoty ztráty sušením v tabulce 5 jsou průměry ze dvou stanovení. Ztráta sušením u všech vzorků byla v rozmezí 82,2 \pm 0,200 do 82,9 \pm 0,450 %.

4.3 Ztráta sušením – suché plody

Tab. 6: Ztráta sušením – droga Sambuci fructus

Odrůda	Navážka (g)	Hmotnost (po vysušení) (g)	Ztráta sušením (%)
Sambo	1,0097	0,9526	5,7 \pm 0,001
Sambu	1,0125	0,9466	6,5 \pm 0,001
Samyl	1,0116	0,9577	5,3 \pm 0,001
Samdal	1,0507	0,9899	5,8 \pm 0,002
planý b.	1,0264	0,9402	8,4 \pm 0,002

Výsledné hodnoty ztráty sušením v tabulce 6 jsou průměry ze dvou stanovení. Ztráta sušením u všech vzorků vyhovuje požadavkům ČFK 1, kde je požadováno nejvýše 12,0 % (odstavec 2.5).

4.4 Celkový popel – droga *Sambuci fructus*

Celkový popel se vypočítal podle vzorce:

$$x (\%) = \frac{\text{hmotnost popela}}{\text{navážka drogy}} \times 100$$

Tab. 7: Celkový popel

Odrůda	Navážka drogy (g)	Hmotnost popela (g)	Celkový popel (%)
Sambo	0,9838	0,0457	4,7 ± 0,001
Sambu	0,9703	0,0416	4,3 ± 0,001
Samyl	0,9794	0,0474	4,8 ± 0,002
Samdal	0,9962	0,0512	5,1 ± 0,003
planý b.	0,9517	0,0323	3,4 ± 0,001

Výsledné hodnoty celkového popela v tabulce 7 jsou průměry ze dvou stanovení. Ve všech případech vyhovuje požadavkům ČFK 1, kde je požadováno nejvýše 6,0 % (odstavec 2.5).

4.5 Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové – droga *Sambuci fructus*

Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové se vypočítal podle vzorce:

$$x (\%) = \frac{\text{hmotnost (po vyžhání)}}{\text{navážka drogy}} \times 100$$

Tab. 8: Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové

Odrůda	Navážka drogy (g)	Hmotnost (po vyžhání) (g)	Popel nerozpustný v HCl (%)
Sambo	0,9838	0,0072	0,7 ± 0,002
Sambu	0,9703	0,0100	1,0 ± 0,001
Samyl	0,9794	0,0099	1,0 ± 0,001
Samdal	0,9962	0,0089	0,9 ± 0,001
planý b.	0,9517	0,0077	0,8 ± 0,001

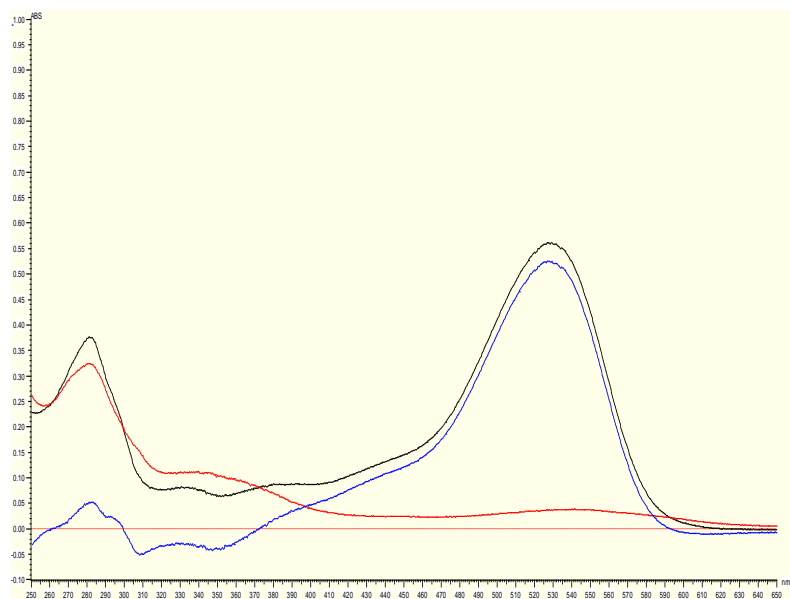
Výsledné hodnoty popela nerozpustného v kyselině chlorovodíkové v tabulce 8 jsou průměry ze dvou stanovení. Ve všech případech vyhovuje požadavkům ČFK 1, kde je požadováno nejvýše 1,0 % (odstavec 2.5).

4.6 Obsah anthokyanů ve vybraných odrůdách bezu černého

4.6.1 Spektrofotometrické stanovení

Diferenční křivka, představující rozdíl spektra barevné a bezbarvé formy anthokyanů, byla vyhodnocena pomocí automatického programu spektrofotometru. Příklad záznamu ukazuje obr. 8.

Obsah anthokyanů byl vyhodnocen v jednotlivých částech plodů u vybraných kultivarů *Sambucus nigra* L. včetně bezu planého. Vyjadřuje se jako ekvivalent kyanidin-3-*O*-β-glukosidu (CGE) a uvádí se v mg/100 g.



Obr. 8: Příklad spektrálního záznamu u extraktů získaných z dužniny kultivaru Samyl
 černá křivka - barevná forma anthokyanů,
 červená křivka - bezbarvá forma anthokyanů
 modrá křivka - rozdílová (diferenční křivka)

Pomocí rovnice kalibrační křivky kyanidin-3-*O*- β -glukosidu (graf 1) byla z ploch pod diferenční křivkou vypočítána koncentrace anthokyanových barviv v $\mu\text{g CGE/ml}$ (tabulky 9 - 13). Koncentrace v měřeném vzorku ($\mu\text{g CGE/ml}$) byla převedena na jednotky obsahu anthokyanů v rostlinném materiálu ($\text{mg CGE}/100 \text{ g}$).
 Poznámka: směsný vzorek (měřený jen pro kontrolu extrakce) neodpovídal skutečnému složení plodů, byl získán ze zbytků po odběru vzorků dužniny a oplodí.

4.6.2 Rozdělení anthokyanů v jednotlivých částech plodu

Tab. 9: Stanovení anthokyanů v odrůdě Sambo

SAMBO	Navážka	Plocha (AUC) (380-600 nm)	Koncentrace (CGE)	
	g		µg CGE/ml	mg/100 g
dužnina	1,1722	50,43	10,40	
dužnina	1,1092	44,11	9,09	
		průměr:	9,75 ± 0,652	
exokarp	1,1190	66,67	13,75	
exokarp	1,1508	63,90	13,18	
		průměr:	13,47 ± 0,286	
směs	1,1205	47,24	9,74	
směs	1,1308	54,46	11,23	
		průměr:	10,48 ± 0,744	

Tab. 10: Stanovení anthokyanů v odrůdě Sambu

SAMBU	Navážka	Plocha (AUC) (380-600 nm)	Koncentrace (CGE)	
	g		µg CGE/ml	mg/100 g
dužnina	1,1135	18,41	3,80	
dužnina	1,1175	20,48	4,22	
		průměr:	4,01 ± 0,213	
exokarp	1,1815	102,21	21,07	
exokarp	1,1643	99,07	20,43	
		průměr:	20,75 ± 0,324	
směs	1,1440	32,47	6,69	
směs	1,1475	27,65	5,70	
		průměr:	6,20 ± 0,497	

Tab. 11: Stanovení anthokyanů v odrůdě Samyl

SAMYL	Navážka	Plocha (AUC) (380-600 nm)	Koncentrace (CGE)	
	g		µg CGE /ml	mg/100 g
dužnina	1,1351	45,68	9,42	
dužnina	1,1185	46,23	9,53	
		průměr:	9,48 ± 0,055	948 ± 5,5
exokarp	1,1587	141,44	29,16	
exokarp	1,1891	112,40	23,18	
		průměr:	26,17 ± 2,990	2617 ± 299,0
směs	1,1717	57,03	11,76	
směs	1,1610	59,54	12,28	
		průměr:	12,02 ± 0,259	1202 ± 25,9

Tab. 12: Stanovení anthokyanů v odrůdě Samdal

SAMDAL	Navážka	Plocha (AUC) (380-600 nm)	Koncentrace (CGE)	
	g		µg CGE /ml	mg/100 g
dužnina	1,1753	34,42	7,10	
dužnina	1,1492	39,08	8,06	
		průměr:	7,58 ± 0,480	758 ± 48,0
exokarp	1,1331	129,47	26,69	
exokarp	1,1532	123,04	25,37	
		průměr:	26,03 ± 0,660	2603 ± 66,0
směs	1,1284	55,87	11,52	
směs	1,1567	49,35	10,18	
		průměr:	10,85 ± 0,672	1085 ± 67,2

Tab. 13: Stanovení anthokyanů v odrůdě bezu planého

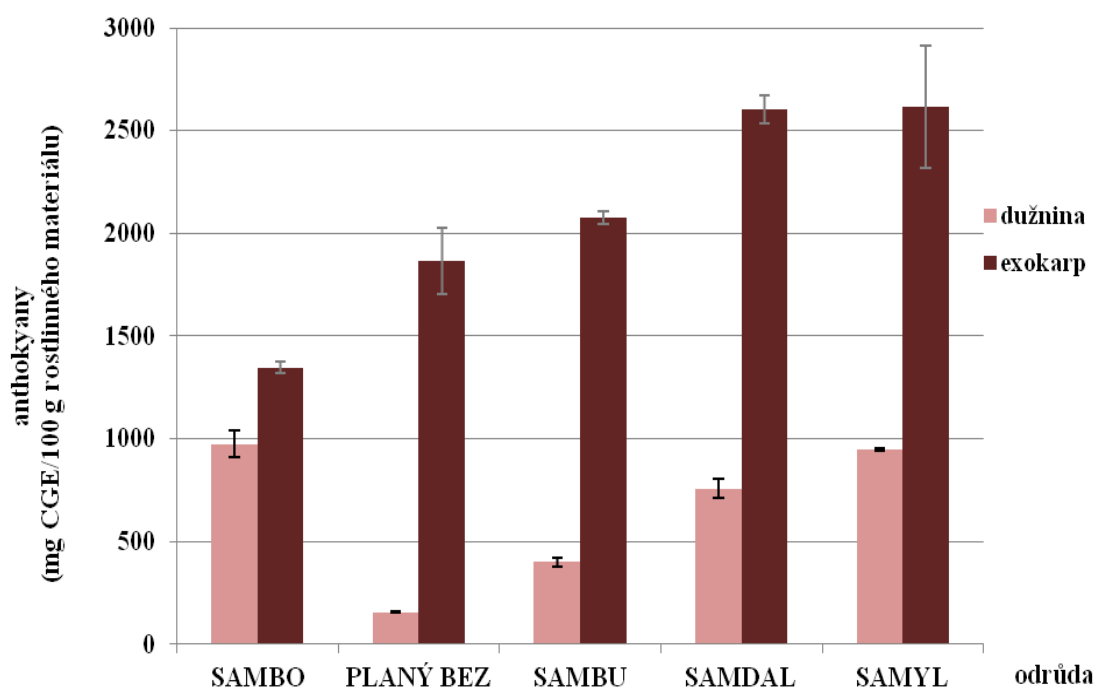
PLANÝ	Navážka	Plocha (AUC)	Koncentrace (CGE)	
	g	(380-600 nm)	µg CGE /ml	mg/100 g
dužnina	1,1865	7,76	1,60	
dužnina	1,1095	7,43	1,53	
		průměr:	1,57 ± 0,035	157 ± 3,5
exokarp	1,1669	98,30	20,27	
exokarp	1,1626	82,59	17,03	
		průměr:	18,65 ± 1,620	1865 ± 162,0
směs	1,1858	14,98	3,09	
směs	1,1306	13,84	2,85	
		průměr:	2,97 ± 0,118	297 ± 11,8

4.6.3 Srovnání jednotlivých odrůd

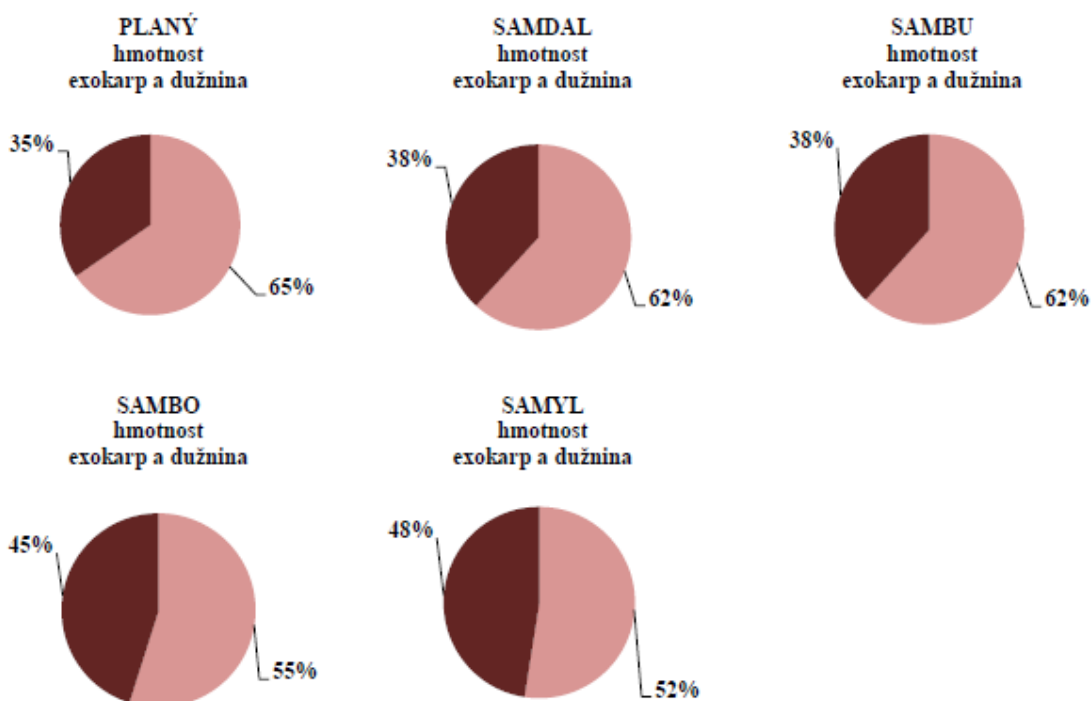
V tabulkách 14, 15 a grafu 2 jsou uvedeny hodnoty koncentrace a obsahu anthokyanů v jednotlivých částech plodů. Celkový obsah anthokyanů ve 100 g celých plodů (graf 4) byl vypočítán pomocí naměřeného podílu dužniny a exokarpu (graf 3) a odpovídající koncentrace v těchto frakcích (tab. 14).

Tab. 14: Výsledky u jednotlivých odrůd

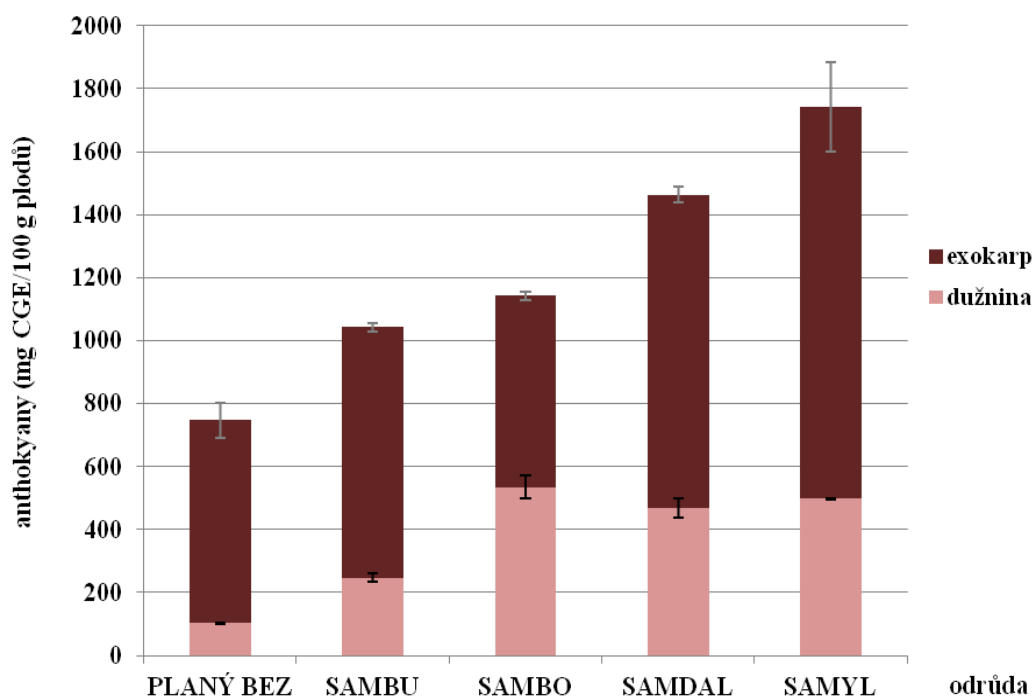
Odrůda	Koncentrace anthokyanů (mg CGE/100 g rostlinného materiálu)		Podíl dužniny a exokarpu v plodech (%)		Obsah (mg CGE) ve 100 g plodů		
	Dužnina	Exokarp	Dužnina	Exokarp	Dužnina	Exokarp	Celkem
Sambo	975	1347	55	45	535	607	1142
planý b.	157	1865	65	35	103	645	748
Sambu	401	2075	62	38	247	795	1042
Samdal	758	2603	62	38	468	994	1462
Samyl	948	2617	52	48	498	1243	1741



Graf 2: Koncentrace anthokyanů v dužnině a exokarpu



Graf 3: Procentuální zastoupení exokarpu a dužniny v plodech



Graf 4: Rozdělení anthokyanů mezi dužninu a exokarp a celkový obsah ve 100 g plodů

Tab. 15: Podíl anthokyanů v exokarpu

Odrůda	Sambo	planý bez	Sambu	Samdal	Samyl
%	53	86	76	68	71

4.7 Stabilita vzorků

Tab. 16: Změna celkového obsahu anthokyanů v časovém rozmezí 24 hodin

Odrůda	Celkový obsah anthokyanů (mg CGE/100 g)		Úbytek (%)
	1. den	2. den	
Sambu	1042 ± 0,70	1007 ± 7,12	3,4
Samyl	1741 ± 139,14	1591 ± 88,93	8,6

Úbytek stanoveného obsahu anthokyanů ve vzorcích měřených po 24 hodinách při laboratorní teplotě nepřesahoval 10 % původní hodnoty.

4.8 Přesnost stanovení anthokyanů pH-diferenční metodou

Připravené vzorky dle kap. 3.6 byly proměřeny pomocí spektrofotometru v oblasti vlnových délek 250 - 650 nm. Jako slepé vzorky byly použity pufrы o nominálním pH 1,0 a pH 4,5. pH metrem bylo zkontrolováno pH a automatickým programem byla spočítána plocha pod diferenční křivkou, která je zaznamenána v tabulce 17.

Tab. 17: Přesnost stanovení anthokyanů

	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	SD	RSD (%)
Plocha (380 – 600)	72,02	70,62	67,77	1,77	2,52
Koncentrace (mg CGE/100 g)	371	364	349	9,12	2,52

Přesnost metody stanovení anthokyanů (reprodukovatelnost přípravy měření a hodnocení vzorků) byla vyjádřena jako relativní standardní odchylka pro tři nezávislé vzorky a nepřesáhla 3 %.

5. Diskuse

Sambucus nigra L. je dřevina běžně rostoucí v mírném a subtropickém podnebném pásu. Květy a plody obsahují mnoho významných látek díky, kterým se využívají ve farmaceutickém, potravinářském i kosmetickém průmyslu (1).

Potřeba rostlinných drog je zajišťována sběrem z rostlin ve volné přírodě. Pro produkty potravinářského průmyslu se využívají plody bezu z kulturních odrůd, které se pěstují.

Pro farmaceutické účely se plody bezu zatím oficiálně nevyužívají. Jako droga nejsou uvedeny v ČL 2009. Jejich tradiční využití pro léčebné účely je však natolik běžné, že droga *Sambuci fructus* je zahrnuta v ČFK 1 (6).

Experimentální část práce se zabývá ověřením kvality plodů bezu černého z vybraných odrůd Sambo, Sambu, Samyl, Samdal a z bezu planého na základě vybraných lékopisných požadavků uvedených v článku *Plantae medicinales* (5). Dalším cílem bylo porovnat vybrané ukazatele kvality plodů z kulturních odrůd s kvalitou plodů planého bezu. Hodnocení kvality plodů bylo provedeno na základě stanovení obsahu anthokyanů v čerstvých, resp. zmrazených plodech.

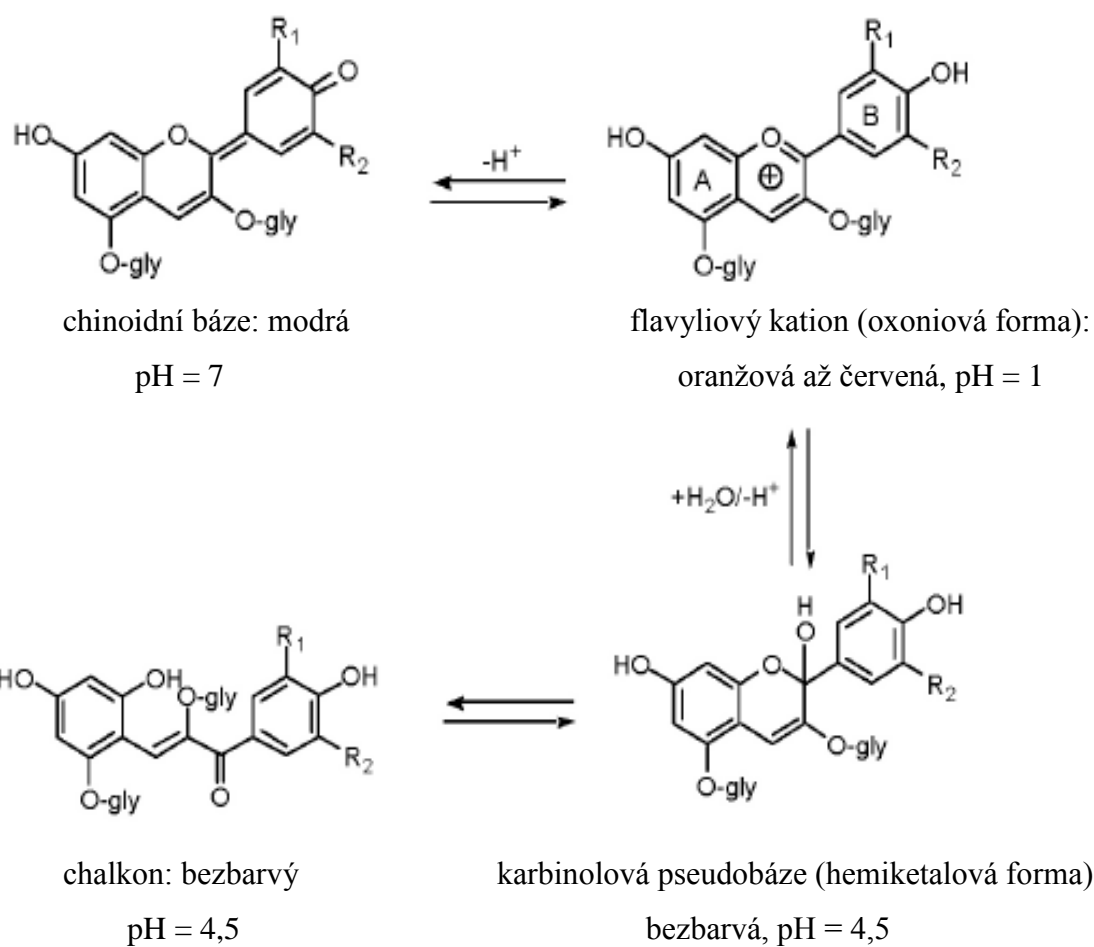
Jednou ze zkoušek drog je ztráta sušením. Podle Českého lékopisu je ztráta sušením definována následovně: „Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech (m/m)“ (5). U drogy *Sambuci fructus* bylo postupováno podle článku v ČFK 1. Hodnoty ztráty sušením drogy *Sambuci fructus* ukazují, že největší ztráta sušením je u planého bezu ($8,4 \pm 0,002$ %) a nejnižší u kultivaru Samyl $5,3 \pm 0,001$ %. U ostatních kultivarů se ztráta sušením pohybovala od 5,7 - 6,5 %. Dále byl u drogy stanoven celkový popel a popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové. Výsledné hodnoty celkového popela jsou v tabulce 7. Výrazný rozdíl je mezi odrůdou Samdal $5,1 \pm 0,003$ % a bezem planým, který dosahoval hodnoty $3,4 \pm 0,001$ %, u ostatních kultivarů se celkový popel pohyboval v rozmezí od 4,3 - 4,8 %. V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty popela nerozpustného v kyselině chlorovodíkové. Dle Českého lékopisu je definován jako: „Podíl získaný po extrakci síranového popela nebo celkového popela kyselinou chlorovodíkovou, přepočítaný na 100 g drogy“ (5). Nejnižších hodnot dosahoval kultivar Sambo $0,7 \pm 0,002$ %, naopak nejvyšších odrůdy Sambu a Samyl $1,0 \pm 0,001$ %.

Dále byla provedena ztráta sušením i u čerstvých plodů bezu černého a postup této zkoušky byl zvolen podle článku *Myrtilli fructus recens*, který je rovněž bohatým zdrojem anthokyanů, stejně jako plody bezu černého (5). Jak je patrné z hodnot v tabulce 5, ztráta sušením se u čerstvých plodů výrazně neliší a u všech odrůd byla vyšší než 80 % (82,2 – 82,9 %).

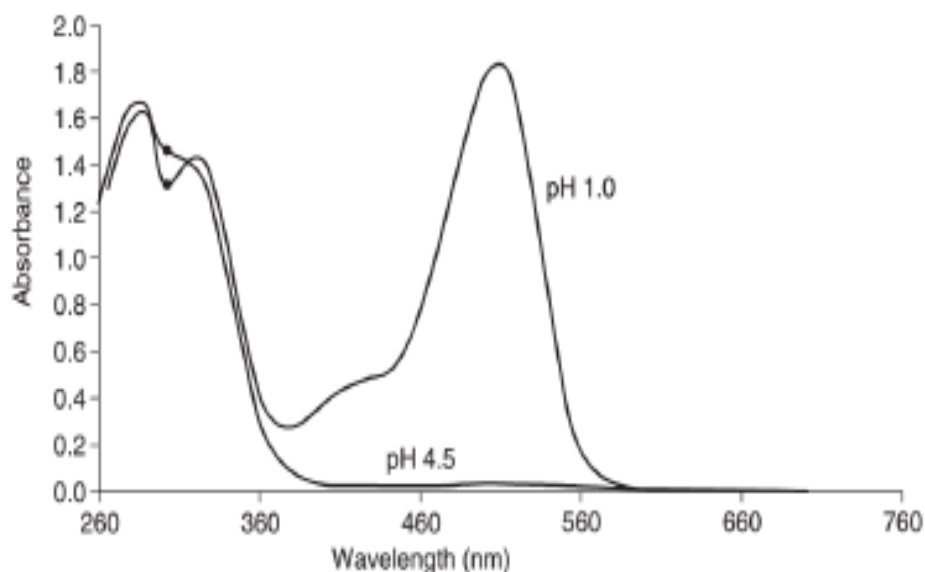
U pěstovaných kultivarů byl tedy stanoven v porovnání s planým bezem menší obsah vody v sušených plodech, zatímco u čerstvých plodů nebyly pozorovány rozdíly.

Totožnost drogy byla ověřována tenkovrstvou chromatografií, a to extraktů dužniny připravených z čerstvých plodů. Jako standardy byly použity kyanidin-3-*O*- β -glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid. Analýza prokázala u všech odrůd bezu přítomnost kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu (obr. 6 a 7). Kyanidin-3,5-diglukosid nebyl prokázán. Na chromatogramech u každého kultivarů byla patrna ještě jedna výrazná skvrna. Dle zbarvení se jedná o další anthokyan, pro který však nebyl dostupný standard. Mohlo by se například jednat o kyanidin-3-sambubiosid, který patří také k nejčastějším anthokyanům v bezu černém (16). Mezi měřenými vzorky nebyly pozorovány významnější kvalitativní rozdíly.

Pro hodnocení plodů je důležitým ukazatelem obsah biologicky aktivních látek, v tomto případě anthokyanů. U vzorků odrůd bezu černého byl stanoven obsah anthokyanů v různých částech plodů. Pro stanovení anthokyanových barviv byla využita spektrofotometrická analýza pH-diferenční metodou. Tato metoda využívá schopnosti anthokyanů podléhat reverzibilní strukturální transformaci, ke které dochází v závislosti na změně pH prostředí. Anthokyaniny vytvářejí ve velmi kyselém prostředí intenzivní zabarvení (oxoniová forma), zatímco při zvýšení pH dochází k odbarvení a přechodu na bezbarvou hemiketalovou formu (obr. 9) (21).



Obr. 9: Struktura anthokyanů při různém pH, upraveno dle 27



Obr. 10: Příklad spektrálních charakteristik anthokyanů při pH 1,0 (barevná forma) a pH 4,5 (bezbarvá forma), převzato z 21

Porovnáním absorpčních spekter barevné a bezbarvé formy se získá velmi selektivní měřítko pro hodnocení obsahu anthokyanů (obr. 10).

Jiná barviva této charakteristické změně zbarvení v závislosti na pH nepodléhají. Metoda je často používaná v potravinářství. Vlastní výpočet obsahu anthokyanů je obvykle založen na odečtení absorbancí barevné a bezbarvé formy v maximu spektrofotometrické křivky a přepočten pomocí extinkčního koeficientu vhodného standardu.

Obsah všech přítomných anthokyanů se nejčastěji uvádí jako ekvivalent kyanidinu-3-*O*- β -glukosidu v mg CGE/100 g. Tento typ anthokyanu je obsažen v řadě plodů využívaných v potravinářství. Tenkovrstvou chromatografií bylo prokázáno, že tento předpoklad platí i pro plody bezu černého měřené v této práci.

U použité modifikace této metody byla místo absorbance při jedné vlnové délce hodnocena celá širší oblast spektra (plocha pod diferenční spektrofotometrickou křivkou), která pravděpodobně lépe zachycuje celou širší skupinu anthokyanových barviv. Standardem byl také kyanidin-3-*O*- β -glukosid.

Rozdíly v celkovém obsahu anthokyanů mezi kultivary navzájem a planým bezem jsou patrné z tabulky 14. Nejvyšší obsah anthokyanových barviv byl stanoven

v odrůdě Samyl $1741 \pm 139,14$ mg CGE/100 g plodů, nižší u kultivaru Sambu $1042 \pm 0,70$ mg CGE/100 g plodů a nejnižší u bezu planého $748 \pm 58,34$ mg CGE/100 g plodů. Zjištěné výsledky jsou srovnatelné s literaturou (22, 28). Podíl anthokyanů v jednotlivých částech plodů se značně liší (graf 2).

Množství anthokyanů, které se v plodech syntetizují, závisí na několika faktorech. Mezi ně můžeme zahrnout například klimatické podmínky (podnebí, kvalita životního prostředí, způsob pěstování) (18), ale i vnitřní faktory, zejména regulační procesy, které ovlivňují jednotlivé vývojové fáze rostliny (20). Všechny odrůdy bezu, které byly vybrány do této práce, byly pěstovány za stejných vnějších podmínek. Míra syntézy anthokyanů tedy pravděpodobně byla ovlivněna vnitřními faktory.

Koncentrace anthokyanů v exokarpu plodů byla u všech měřených vzorků vyšší než v dužnině plodů (graf 2). Největší rozdíl mezi exokarpem a dužninou byl pozorován u kultivarů Samdal a u bezu planého, naopak nejmenší u kultivaru Sambo.

Z grafu 3 je dále patrné, že exokarp obsahující relativně vysokou koncentraci anthokyanů představuje značnou část hmotnosti plodu 35 - 48 %, v závislosti na odrůdě. Při zpracování plodů, resp. při extrakci anthokyanů, tedy záleží na tom, jak dokonale se podaří anthokyanu extrahovat i z oplodí. Nedokonalá extrakce může výrazně ovlivnit celkový výsledek analýzy nebo výtěžek anthokyanů při izolaci.

Koncentrace v jednotlivých částech plodu a hmotnost dužniny a exokarpu byla použita pro vyhodnocení rozdělení anthokyanů mezi dužninu a exokarp. Toto rozdělení anthokyanů mezi jednotlivé části plodů zobrazuje graf 4. Z pohledu vnější části plodu je nejbohatším zdrojem anthokyanů kultivar Samyl a Samdal, naopak nejméně anthokyanů je obsaženo v bezu planém a kultivaru Sambo (tab. 14).

Zatím nejsou známy experimentální práce, které by se zabývaly množstvím anthokyanů v jednotlivých částech plodů bezu černého. Dostupné studie se převážně zabývají stanovením obsahu anthokyanů v celých plodech bezu černého. Studii zastoupení anthokyanů v jednotlivých částech jiných plodů publikovali Lee a Wrolstad, kteří analyzovali plody *Vaccinium corymbosum*. Jejich studie se zaměřila na různé způsoby extrakce anthokyanů. Bylo zjištěno, že ke zvýšení extrakce anthokyanů z dužniny i exokarpu borůvkových plodů přispívá kombinace tepla, oxidu siřičitého a kyseliny citronové. Stejně jako v našem případě, anthokyanu byly obsaženy z větší části převážně ve vnější části plodů borůvek než v dužnině (29). Rozdíl v obsahu anthokyanů v exokarpu a dužnině je typický také pro řadu odrůd *Vitis vinifera* L. (30).

Spolehlivost výsledků byla prokázána ověřením základních validačních parametrů. Všechny naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány v programu MS Excel 2007, kde byly průměry vypočítány dle funkce - Průměr, směrodatné odchytky pomocí funkce - Smodch. Do grafů byly zakresleny chybové úsečky.

Stabilita vzorků byla sledována u kultivarů Sambu a Samyl. Může být ovlivněna několika faktory jako je například pH, teplota při skladování, chemická struktura, světlo a další (12). V tabulce 16 je patrné, že za daných podmínek došlo k mírnému úbytku celkového obsahu anthokyanových barviv. Pokles obsahu anthokyanů po 24 hodinách stání vzorků (přípravených pro spektrofotometrické měření) je menší než 10 %. U kultivaru Sambu činil úbytek anthokyanů 3,4 % a u odrůdy Samyl 8,6 %. Doporučené měření do 2 hodin po přípravě zaručuje dostatečnou spolehlivost výsledků.

Také validační parametry (linearita závislosti plochy na koncentraci a RSD u opakovaných měření) prokázaly, že použitá metoda poskytuje spolehlivé výsledky a může být použita pro hodnocení obsahu anthokyanů v plodech nebo částech plodů *Sambucus nigra* L.

6. Závěr

V teoretické části práce je stručně charakterizován druh *Sambucus nigra* L. Dále jsou zde zmíněny významné obsahové látky a účinky plodů bezu černého. Bez černý patří k významným rostlinám současné fytoterapie a má své využití nejen ve farmacii, ale i v potravinářském průmyslu. Dnes se hlavně využívají květy a plody. Hlavní účinné látky jsou anthokyany u nichž je vysoce hodnocena antioxidační aktivita. Anthokyany jsou také významným potravinářským barvivem.

Experimentální část ověřuje a porovnává kvalitu plodů *Sambuci fructus* u vybraných kultivarů Sambo, Sambu, Samyl, Samdal a bezu planého na základě vybraných zkoušek dle ČL 2009 a ČFK 1. Byla stanovena ztráta sušením, celkový popel, popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové. Také posuzuje odrůdy z hlediska výskytu a obsahu některých biologicky významných látek, v tomto případě anthokyanů. Přítomnost anthokyanů byla zjištěna u extraktů z čerstvých plodů pomocí tenkovrstvé chromatografie porovnáním se standardem kyanidinem-3-*O*- β -glukosidem.

Ke stanovení obsahu anthokyanů byla použita modifikovaná spektrofotometrická pH-diferenční metoda, u které byla ověřena linearita a přesnost stanovení. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah anthokyanů obsahovaly kultivary Samyl a Samdal, méně Sambu a nejméně obsahoval bez planý. Plody kultivarů Samyl i Samdal by bylo možné doporučit k posouzení jejich využití např. ve farmaceutickém průmyslu. Také z hlediska rozdělení anthokyanů mezi vnitřní a vnější část plodu byly pozorovány značné rozdíly mezi kultivary. U plodů bezu planého je 86 % celého množství anthokyanů obsaženo v oplodí, zatímco u kultivaru Sambo je to jen 53 %. U všech plodů byl však obsah anthokyanů v exokarpu vyšší než dužnině.

Dále byla posuzována stabilita vzorků za daných podmínek v časovém intervalu 24 hodin. Byl pozorován mírný úbytek celkového obsahu anthokyanů. Tento úbytek byl však menší než 10 % a na výsledky při dodržení předepsané doby měření (do 2 hodin) nemá výrazný vliv.

Pokud posuzujeme kvalitu plodů bezu černého podle obsahu anthokyanů jako významných antioxidantů pro farmaceutické účely a jako barviva pro potravinářství, patří k významným závěrům této práce doporučení využít pro extrakci všech částí plodu tj. včetně exokarpu, kde byl obsah anthokyanů u všech studovaných odrůd relativně nejvyšší.

7. Abstrakt

Hlavním cílem práce bylo ověření kvality plodů bezu černého v odrůdách Sambo, Sambu, Samdal, Samyl a bezu planém dle vybraných zkoušek dle ČL 2009 a ČFK 1. Byla stanovena ztráta sušením, celkový popel, popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové. Další náplní této práce bylo porovnat vybrané odrůdy bezu černého z hlediska obsahu anthokyanů v různých částech plodů. Byla použita nová modifikace spektrofotometrického stanovení pH-diferenční metodou, u které byla ověřena linearita a přesnost stanovení. Dále byla sledována stabilita vzorků za daných podmínek. Byl pozorován úbytek obsahu anthokyanů, který byl menší než 10 %. Nejvyšší obsah anthokyanů byl stanoven u kultivaru Samyl, Samdal, nejnižší u odrůdy Sambu a bezu planého. Ačkoliv se zastoupení anthokyanů v jednotlivých částech plodu lišilo, u všech plodů byl obsah anthokyanů v exokarpu vždy vyšší než dužnině. Tento fakt je potřeba brát v úvahu při zpracování plodů pro farmaceutické a potravinářské účely.

Klíčová slova: *Sambucus nigra*, *Sambuci fructus*, anthokyany

8. Abstract

The main aim of this thesis was to verify the quality of elderberry fruits of the cultivars Sambo, Sambu, Samdal, Samyl and of the wild elderberry according to tests specified in the Czech Pharmacopoeia 2009 and the Czech Pharmaceutical Codex 1. Loss on drying, total ash, ash insoluble in hydrochloric acid were determined. Another aim of this thesis was to compare certain cultivars of elderberry according to the content of anthocyanins in different parts of the fruits. A new modification of the spectrophotometric analysis using the pH-differential method was applied and its linearity and accuracy verified. Further, stability of the samples under given conditions was studied. A loss of anthocyanins content was observed, which was lower than 10 percent. The highest amount of anthocyanins was found in the cultivars Samyl and Samdal, the lowest amount in Sambu and wild elderberry. Although the determined quantities of anthocyanins differed in various parts of the fruit, the amount of anthocyanins in exocarp was always, in all fruits, higher than in the flesh. This fact should be taken into consideration in the processing of fruits for pharmaceutical and food additives purposes.

Key words: *Sambucus nigra*, *Sambuci fructus*, anthocyanins

9. Literatura

1. **Jahodář, L.** *Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl)*. 1.vydání. Praha: Havlíček Brain Team, 2010. s. 16-18. ISBN 978-80-87109-22-9.
2. **Slavík, B.** *Květena České republiky 5*. Praha: Academia, 1997. s. 504-506. ISBN 80-200-590-0.
3. **Burrows, E. G. – Tyrl, J. R.** *Toxic Plants of North America*. 2. vydání. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. s. 11-16. ISBN 978-0-8138-2034-7.
4. **Charlebois, D. - Byers, L. P. – et al.** Elderberry: Botany, Horticulture, Potential. [autor knihy] J. Janick. *Horticultural Reviews*. 2. vydání. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010, vol. 37, s. 213-222. ISBN 978-0-470-53716-9.
5. *Český lékopis 2009*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2009. s. 103-104, 114, 174, 310, 768-769, 2669, 3118-3119. ISBN 978-80-247-2994-7.
6. *Český farmaceutický kodex*. 1. vydání (ČFK 1), X-Egem, Praha, 1993.
7. **Mumcuoglu, M. - Safirman, D. - et al.** Elderberry. [autor knihy] Paul M. Coates a Joseph M. Betz. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2. vydání. London: Informa Healthcare, 2010. s. 235-240. ISBN 978-1-4398-1928-9.
8. **Vlachojannis, J. E. - Cameron, M. – et al.** A Systematic Review on the Sambuci fructus Effect and Efficacy Profiles. *Phytotherapy Research*. 2010, vol. 24, no. 1, s. 1-8.
9. **Atkinson, M. D. - Atkinson, E.** Sambucus nigra L. *Journal of Ecology*. 2002, vol. 90, no. 5, s. 895–923.
10. **Balík, J.** *Anthokyanová barviva v hroznech a vínech*. 1. vydání. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. s. 8-14, 48-49. ISBN 978-80-7375-412-9.
11. **Veberic, R. - Jakopic, J.** European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*. 2009, vol. 114, no. 2, s. 511-515.
12. **Ovando-Castañeda, A. - Hernández-Pancheco, M.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, no. 4, s. 859-871.
13. **Velíšek, J.** *Chemie potravin 3*. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. s. 21-29. ISBN 80-86659-02-X.

14. **Ignat, I. - Volf, I.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, vol. 126, no. 4, s. 1821–1826.
15. **Giusti, M. M. - Wrolstad, R. E.** Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, vol. 14, no. 3, s. 217–225.
16. **Wallace, T. C. - Guisti, M. M.** *Anthocyanins in Health and Disease*. New York: CRC Press, 2013. s. 115-120. ISBN 978-1-4398-9471-2.
17. **Delgado-Vargas, F. - Jiménez, A. R. – et al.** Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000, vol. 40, sv. 3, s. 231-250.
18. **Quina, F. H. - Moreira, P. F.** Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. *Pure Appl. Chem.* 2009, vol. 81, no.9, s. 1687-1694.
19. **Chalker-Scott, L.** Enviromental Significance of Anthocyanins In Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*. 1999, vol. 70, no. 1, s. 1-9.
20. **Gould, K. - Winefield, C. – et al.** *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*. New York: Springer, 2009. s. 1-41. ISBN 978-0-387-77334-6.
21. **Giusti, M. M. a Wrolstad, R. E.** Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, s. F1.2.1.-F1.2.13.
22. **Polášková, A. - Spilková, J. – et al.** (2013, September). *Anthocyanins in berry. A novel versatile evaluation of pH-defferential spectra*. Poster presented at the IWA (International Workshop on Anthocyanins) 2013, Porto.
23. **Bueno, J. M. - Sáez-Plaza, P. – et al.** Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigment. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2012, vol. 42, s. 126-142.
24. **Nile, S. H. - Park, S. W.** Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014, vol. 30, no. 2, s. 134-142.
25. **Wang, L. S. - Stoner, G. D.** Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*. 2008, vol. 269, no. 2, s. 281-290.

26. **Zafra-Stone, S. - Yasmin, T.** Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr. Food Res.* 2007, vol. 51, no. 6, s. 675-683.
27. **Lee, J. - Durst, R. W. – et al.** Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverage, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International.* 2005, vol. 88, no. 5, s. 1269-1278.
28. **Clifford, M. N.** Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2000, vol. 80, s. 1063-1069.
29. **Lee, J. - Wrolstad, R. E.** Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science.* 2006, vol. 69, no. 7, s. 564-573.
30. **Lutz, M. - Jorquera, K. – et al.** Phenolics and Antioxidant Capacity of Table Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars Grown in Chile. *Journal of Food Science.* 2011, vol. 76, no. 7, s. C1088-C1093.