

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

**Gemmoterapie: antioxidační a terapeutický účinek
pupenů**

Diplomová práce

Autor: Bc. Jan Lněnička
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, PhD.



Zadání diplomové práce

Autor: Jan Lněnička

Studium: S18BI010NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: **Gemmoterapie: antioxidační a terapeutický účinek pupenů**

Název diplomové práce AJ: Gemmotherapy: antioxidant and therapeutic effect of plant gems

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Jednou z moderních léčebných metod je nová terapie s názvem gemmoterapie - též zvaná medicína pupenů. Gemmoterapie fototerapeutická metoda používající rostlinné zárodečné látky obsažené v pupenech stromů a keřů, nebo bylin připravovaných macerací ve směsi vody, lihu a glycerínu za účelem výroby léčivého extraktu. Příprava extraktu v domácích podmínkách je s použitím dostupné literatury velice snadná. Negativní environmentální podmínky, převážně přítomnost polutantů v ovzduší, vodě nebo půdě může významně ovlivnit chemické složení účinných látek v pupenech a tím zvýšit nebo snížit účinek extraktů. Cílem práce je porovnat chemické složení extraktu připravených macerací pupenů z různých lokalit s různou mírou environmentální zátěže s extrakty běžně dostupnými v specializovaných obchodech.

odborné publikace dostupné v databázích (Scopus, Web of Science)

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 6.1.2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny zdroje, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne

Bc. Jan Lněnička

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval především vedoucí práce RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za odborné rady, připomínky a velkou pomoc v praktické části této diplomové práce. Velký dík patří mým spolužákům Bc. Barboře Konečné a Bc. Janu Chlupáčovi za výpomoc v laboratoři. Děkuji také mé rodině za podporu.

Anotace

Lněnička J., 2018: Gemmoterapie: antioxidační a terapeutický účinek pupenů. – Ms., 54 pp. [Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové]. Vedoucí diplomové práce RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Práce se zabývá obsahem fenolických látek a antioxidačními účinky extraktů z pupenů vybraných druhů rostlin z různých zdrojů. Nedílnou součástí je rešerše dostupných zdrojů pojednávajících o problematice gemmoterapie – léčby pupenů neboli medicíny 21. století. Jsou popsány historické souvislosti, principy fungování gemmoterapeutik a jejich různé účinky, rovněž je uveden stručný přehled látek s antioxidačními vlastnostmi. Hlavním cílem praktické části bylo zhodnotit celkový obsah fenolů a flavonoidů spolu s kapacitou jednotlivých vzorků zhášet radikál DPPH. Důležitou otázkou se týkaly možnosti domácí přípravy gemmoterapeutik a vzájemné zhodnocení všech variant vzorků včetně porovnání vlastních výsledků s jinými studiemi. Nejvýraznějším závěrem byl vliv lokalit (životního prostředí) vybraných stromů na kvalitu jejich pupenů, která určuje veškeré terapeutické vlastnosti výsledného produktu.

Klíčová slova: gemmoterapie, extrakty z pupenů, antioxidanty, polyfenoly

Annotation

Lněnička J., 2018: Gemmotherapy: antioxidant and therapeutic effect of plant gems. – Ms., 54 pp. [Diploma thesis, Faculty of Science, University of Hradec Králové]. Thesis supervisor RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

The diploma thesis deals with the content of phenolic substances and antioxidant effects of extracts from the buds of selected tree species from various localities and products from the company Naděje. An integral part is a search of available resources dealing with the issue of gemmotherapy - treatment of buds or medicine of the 21st century. Historical contexts, principles of functioning of gemmotherapeutics and their various effects are described, as well as a brief overview of substances with antioxidant properties. The main goal of the practical part was to evaluate the total content of phenols and flavonoids together with the capacity of individual samples to quench the DPPH radical. Important questions concerned the possibility of home preparation of gemmotherapeutics, mutual evaluation of all sample variants and comparison of own results with other studies. The research clearly shows the influence of the localities (environment) of the studied trees on the quality of their buds, which determines all the therapeutic properties of the final product.

Keywords: gemmotherapy, bud extracts, antioxidants, polyphenols

Obsah

1 Úvod	9
2 Literární rešerše.....	9
2.1 Význam gemmoterapie	9
2.2 Historie a osobnosti gemmoterapie	10
2.3 Extrakty z pupenů.....	10
2.3.1 Vlastnosti.....	10
2.3.2 Příprava	11
2.3.3 Produkty	11
2.3.4 Užívání.....	11
2.4 Obsahové látky a účinky rostlin	12
2.4.1 <i>Acer campestre</i> (javor babyka).....	12
2.4.2 <i>Betula pendula</i> (bříza bělokorá)	12
2.4.3 <i>Fagus sylvatica</i> (buk lesní)	13
2.4.4 <i>Quercus robur</i> (dub letní)	13
2.4.5 <i>Tilia cordata</i> (lípa srdčitá).....	13
2.4.2 Příklady dalších gemmoterapeutik	13
2.5 Přírodní antioxidanty	14
2.5.1 Jednoduché fenoly	15
2.5.2 Fenolové kyseliny	15
2.5.3 Kumariny.....	16
2.5.4 Třísloviny	17
2.5.5 Flavonoidy	18
2.5.6 Lignany.....	19
2.5.7 Ostatní fenolické látky	20
3 Metodika.....	20
3.1 Zpracování materiálu.....	20
3.1.1 Sběr pupenů	20
3.1.2 Macerace.....	24
3.1.3 Filtrace a ředění.....	24
3.2 Analýzy	25
3.3.1 Celkový obsah rozpustných fenolů a flavonoidů	26
3.3.2 Zhášení radikálu DPPH.....	26
3.3 Statistické zpracování výsledků	27
4 Výsledky.....	28
4.1 Celkový obsah rozpustných fenolů a flavonoidů.....	28
4.1.1 Fenoly	28

4.1.2 Flavonoidy	33
4.2 Zhášení radikálu DPPH	38
4.3 Další vyhodnocení.....	42
5 Diskuze.....	43
5.2 Porovnání obsahových látek a antioxidačních účinků.....	43
5.2.1 Fenoly	43
5.2.2 Flavonoidy	44
5.2.3 Zhášení radikálu DPPH.....	45
5.3 Možnosti domácí přípravy gemmoterapeutik.....	45
6 Závěr.....	46
Seznam použité literatury.....	47

1 Úvod

V dnešní době plné technologických vymožeností (včetně farmaceutických přinášejících nepřehorné množství syntetických léků), které jsou často vydobyté následky na životním prostředí, se člověk opět navrácí k přírodě. Zaměřuje se na fytoterapii, a to hlavně díky odborným vědeckým studiím, které jsou součástí globálního pokroku. Mnohé bioaktivní rostlinné látky jsou schopné nahradit nebo alespoň doplnit klasická léčiva (Donno et al., 2015). Konvenční medicína je spojena s vyšší mírou vedlejších účinků a kontraindikací, případně s neuspokojivými výsledky. To je důvodem upřednostnění alternativní terapie využívající čistě přírodní zdroje (Lockwood, 2005; Ercoli, 2002). Tento trend navíc podporují organizace jako WHO (Světová zdravotnická organizace) nebo NCCAM (Národní centrum pro doplňkovou a alternativní medicínu) iniciující odborný výzkum a hodnocení efektivnosti nekonvenční medicíny (Firenzuoli, 2009; Bent et Ko, 2004).

V oblasti alternativních léčebných postupů se objevuje vzrůstající zájem o gemmoterapii neboli medicínu pupenů. Toto téma mě zaujalo obzvláště z hlediska různých vlastností a účinků gemmoterapeutik, se kterými jsem měl již dřívější, sice nepřímou, zato pozitivní zkušenost. Touha pochopit souvislosti fyziologických procesů probíhajících v rostlinách, konkrétně v pupenech, spolu s možností přípravy extraktů v domácích podmínkách byla motivací ke studiu základních principů této problematiky.

Hlavním cílem práce je analýza chemického složení gemmopreparátů dostupných na trhu a také extraktů připravených macerací pupenů vybraných druhů stromů z různých lokalit. Nedílnou součástí je také porovnání všech těchto vzorků a vyhodnocení vlivu případného znečištění dané lokality na obsahové látky a jejich terapeutické účinky.

2 Literární rešerše

2.1 Význam gemmoterapie

Hubele (2016) popisuje alternativu klasické medicíny. Jedná se o gemmoterapii neboli léčbu pupeny, jejíž obecné principy působení jsou drenáž, detoxikace, stimulace imunity a výživa na úrovni celého organismu. V praxi je zvykem potlačování akutních příznaků nemoci, což vede k akumulaci různých zánětlivých stavů a vývoji chronických onemocnění. Důležité je přistupovat ke všem symptomům individuálně a nesoustředit se na jejich potlačení. Měla by být podporována správná funkce orgánů zodpovědných za přirozenou obranu organismu, tedy nadledvin (imunitní odpověď), lymfatického a cévního systému (detoxikace a výživa buněk) a také střev a ledvin (celková detoxikace). Podle Lockwooda (2005) a Ercoliho (2002) má každá nemoc původ v kombinaci mnoha faktorů, pro terapii je tedy zásadní znát celkový stav organismu (fyzický i psychický).

Název gemmoterapie pochází z latinského *gemma*, což znamená pupen nebo drahokam, ale překládá se také jako „kamenná sůl“ nebo „borová pryskyřice“. Pol Henry dával hlavní dva významy do souvislosti vzhledem k charakteru pupenů, které v zimním období představují neaktivní („mrtvé“) struktury (Adriane, 2007). Pupeny jsou orgány, které v chladném období chrání meristematická (embryonální) pletiva, biochemicky nejcennější části rostlin. Meristémy představují fytokomplex sloučenin jako rostlinné hormony, enzymy, stopové prvky, vitamíny, flavonoidy a nukleové kyseliny. Nástup dormance navozuje kyselina abscisová, její ukončení zase gibbereliny a cytokininy (Donno et al., 2015). S probouzením pupenů je spojen vyšší obsah organických kyselin a naopak nižší obsah uhlovodíků (Wang et al., 1987), typický je také obsah polyfenolů (Peev et al., 2007).

2.2 Historie a osobnosti gemmoterapie

S používáním pupenů se můžeme setkat již ve starověku, např. v indické ájurvédě. Ve 2. st. byl znám od Galéna tzv. acopon, balzám z pupenů topolu nakládaných po dobu tří měsíců v olivovém oleji. V průběhu času se zvyšoval zájem o kvalitu gemmopreparátů. Např. Paracelsus si uvědomil rozdíly v jednotlivých částech rostlin. Dalšími ovlivňujícími faktory jsou věk a původ rostliny a rovněž způsob sběru a zpracování materiálu včetně skladování výsledného produktu (Donno et al., 2015).

Za otce gemmoterapie je v současné podobě považován Pol Henry, který se inspiroval používáním živočišných embryonálních buněk dr. Niehansem, a jako první realizoval myšlenku využití meristemických částí rostlin jako metodu v terapii člověka, kterou nazval fytoembryoterapií (Adrienne, 2007). Jeho první práce s těmito principy byly publikovány v Archives Homeopatiques de Normandie roku 1959. Správnost Henryho úvah byla postupem času potvrzována v mnohých dalších publikacích z oboru (Donno et al., 2015). První studie se týkala extraktu z břízy pýřité, u něhož Henry dokázal pozitivní účinek na játra, konkrétně se jedná o aktivaci makrofágů a drenáž Kupfferových buněk. Francouzský lékař Max Tétou spolupracoval s Polem Henrym, rozšířil jeho práci a vytvořil pojem gemmoterapie (Adrienne, 2007). Zastával „teorii terénu“ (doslov. překlad), kdy mikroorganismy jako původci nemocí vidí v těle zaneseném toxiny vhodné prostředí. Eliminace škodlivých látek z orgánů umožňuje organismu, aby se léčil sám. Fernando Piterà byl přední lékař, homeopat a vědec na Univerzitě Genoa v Itálii. Díky jeho výzkumům v oblasti gemmoterapie se stal autoritou v tomto oboru. Zabýval se biologicky aktivními molekulami meristemických pletiv, které z chemického hlediska představují fyto komplex, na rozdíl od ostatních (již vyvinutých) orgánů (listy, kořeny, kůra, semena nebo celá dospělá rostlina). Philippe Adrienne významnou měrou přispěl k poznání biochemického charakteru všech dosud známých gemmoterapeutik. Doktorka Sorina Soescu je zakládající členkou Rumunské asociace pro gemmoterapii a homeopatii (ARGH) a podílí se na vývoji a propagaci gemmoterapie ve své zemi. V rámci tohoto oboru dále vede rodinnou kliniku, pořádá fóra a působí jako mentorka. Několik let také řídila online kliniku mezinárodní školy gemmoterapie. ARGH jednou ročně publikuje sborník a pořádá konferenci, kde členští vědci různých zaměření prezentují výsledky svých prací v oblasti gemmoterapie (Hubele, 2016).

2.3 Extrakty z pupenů

2.3.1 Vlastnosti

Obecně se shodují informace o stabilitě preparátů ve smyslu jejich terapeutického účinku. Skladování ve tmě a chladu umožňuje použití produktu až pět let od výroby. Výzkumy potvrzují, že tato léčiva jsou vhodná i pro novorozence a starší lidi, většinu z nich mohou užívat těhotné ženy. Gemmoterapeutické preparáty snižují potřebu jiných doplňků a tím usnadňují léčbu akutních příznaků, zanechávají zasažené orgány čisté a posílené, přinášejí dobré výsledky i v případě chronických onemocnění, u kterých jsou sestavovány speciální kúry. Velkou výhodou je v neposlední řadě také snadné porozumění působení a užívání gemmoterapeutik ze strany pacientů. Extrakty se užívají ve formě kapek přidávajících se do vody nebo jiného (nealkoholického) nápoje (Hubele, 2016).

2.3.2 Příprava

K výrobě gemmoterapeutik se používají nejčastěji pupeny nebo výhonky (Donno et al., 2015). Hubele (2016) stručně uvádí postup podle evropského lékopisu. Pupeny jsou sbírány na jaře a za čerstva nakládány do lihoglycerinu v poměru 1:20. Doba macerace je 21 dní v chladu a temnu za pravidelného promíchávání. Získané maceráty se filtrují, potencují a nakonec ředí směsí lihu, glycerinu a vody v poměru 1:10. Přefiltrované extrakty označuje Zentrich (2007) jako základní matečnou tinkturu D_0 a její zředěnou formu jako koncentraci D_1 . Podobný protokol vychází z francouzského lékopisu, jen s několika specifiky. Materiál je ihned po sběru očištěn, v případě větších pupenů rozmělněn (např. v mixéru), a poté macerován ve směsi 95% etanolu a glycerinu v poměru 1:1. Poměr rozpouštědla a pupenů o suché hmotnosti je opět 1:20 s tím, že u složek roztoku se rovněž jedná o váhové díly (nikoli objemové). Před samotnou macerací je zjišťována dehydratovaná hmotnost pupenů. Této neměnné hmotnosti je dosaženo vysušením materiálu při 105 °C po dobu několika dní. Maceráty se po třech týdnech slijí, přefiltrují, nechají dva dny stát a poté znovu přefiltrují, přičemž zbytku extraktu se získá manuálně tlakem. Takto vzniklá matečná tinktura se poté ředí v poměru 1:10 ve směsi 50 dílů glycerolu, 30 dílů etanolu a 20 dílů vody (opět hmotnostní díly). Výsledný extrakt je nakonec důsledně promíchán. Finální produkt je testován na aroma a chuť (pomocí smyslů), barvu (spektrofotometricky) a obsah alkoholu (plynová chromatografie). Další modifikací přípravy extraktů je např. ředění matečné tinktury v poměru 1,5:10 kvůli vyššímu terapeutickému potenciálu (Donno et al., 2015). Adrianna (2007) píše o metodě používané v Česku, kdy se čerstvé pupeny také rozmělnují, avšak k maceraci je kromě 96% etanolu a lékárenského glycerinu použita ještě voda, přičemž hmotnostní díly těchto složek rozpouštědla jsou stejné. Poměr pupenů a vyluhovačů je 1:5, macerace probíhá stejně jako v prvním, výše uvedeném postupu. Ředění se provádí roztokem použitým při maceraci v poměru 1:10. Následně se extrakt v nádobce homeopaticky protřepe, tzn. 21 krát prudce od shora dolů v natažené ruce, přičemž bezprostředně poté se nádobka prudce přitrhne k tělu.

2.3.3 Produkty

V Evropě figuruje několik velkých výrobců gemmoterapeutik, kteří distribuují do USA (Hubele, 2016). Na českém trhu se nejčastěji objevují produkty firem Naděje a Rabštejn. Podhorná (2007) a její firma Naděje nabízí bylinné tinktury (označení T) a pupenové extrakty (označení P). Tyto základní typy produktů mohou být obohaceny betaglukanem (TG a PG) nebo energií včelího biopole (TB a PB) působící jen v době aktivity včel po dobu tří měsíců.

2.3.4 Užívání

Adrianna (2007) popisuje třífázovou léčbu s týdenní pauzou po každých třech týdnech, kdy se vždy mimo jídlo podává 15 kapek ráno (popř. dvakrát denně) či pět kapek třikrát denně s tím, že dávkování zůstává stejné nebo se postupně zvyšuje z pěti kapek na 15-20 a nakonec opět snižuje na počáteční množství. Tento postup je vztažen ke koncentrované formě (matečné tinktuře), dávkování ředěných extraktů bude tedy desetkrát vyšší.

2.4 Obsahové látky a účinky rostlin

V rostlinách vzniká obrovské množství různých látek. Základními produkty primárního metabolismu jsou sacharidy, proteiny a lipidy, které přímo zajišťují růst a vývoj rostlin. Sekundární metabolity vychází z těchto primárních, jsou však mnohem diverzifikovanější. Nachází se ve specializovaných buňkách rostlin, nejsou sice nezbytné pro základní životní funkce jako je fotosyntéza či respirace, hrají ovšem důležitou roli v adaptaci na prostředí, zajišťují ochranu proti stresům biotickým (např. herbivorie, konkurence nebo patogenní infekce) i abiotickým (oxidace, různé fyzikální faktory typu UV záření apod.). Fungují také jako signální látky, např. atraktanty opylovačů (Anu et al., 2018). Sekundární metabolity jsou specifické pro určitý rostlinný druh, popřípadě čeleď (Musilová et al., 2012). Mohou být rozmístěny rovnoměrně nebo se soustředí do různých orgánů (Cieśla et Michniewska, 2013). Látky rostlinného původu se kromě medicíny a farmacie využívají v potravinářství (chuť, aroma), parfumerii, zemědělství a pěstitelství (přírodní pesticidy, cílené šlechtění pro požadovanou barvu květů atd.) a v neposlední řadě také v kosmetice (Smith, 1996; Ahuja et al., 2013; Jeandet et al., 2013).

U všech níže uvedených druhů se předpokládá antioxidační aktivita vzhledem k obsahu fenolických látek (viz níže). Jak bylo zmíněno, pupeny každé rostliny obsahují stejné látky jako jednotlivé orgány, jsou zde koncentrovány veškeré rostlinné metabolity.

2.4.1 *Acer campestre* (javor babyka)

Listy obsahují flavonoidy, třísloviny a saponiny. Používají se při léčbě hemoroidů, revmatu a vykazují aktivitu proti bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (Sen-Utsukarci et al., 2020). Pupeny působí protizánětlivě, podporují trávení, činnost jater a kardiovaskulární systém (Herboplanet, 2020), konkrétně snižují hladinu cukru a cholesterolu, předchází vzniku žlučových a močových kamenů, trombóz a léčí aterosklerózu. Dále pomáhají při bolestech hlavy a závratích a mají antivirotické a antimykotické účinky (Adrienne, 2007).

V listech *Acer pseudoplatanus* (javor klen) jsou obsaženy terpenoidy a deriváty kyseliny benzoové a hydroxyskořicové (Zhang et al., 2015), květy *Acer platanoides* (javor mléč) obsahují rutin (Rajdlová, 2008).

2.4.2 *Betula pendula* (bříza bělokorá)

V listech se vyskytují lignany, flavonoidy myricetin (Phytochemical Interactions DB, 2020) a kvercetinové glykosidy (hyperosid, kvercitrin a rutin), třísloviny, silice (Tomko et al., 1999), fenolové kyseliny, triterpeny (LEROS, 2020), slizy, pryskyřice, vitamín C a karoteny. Významné jsou saponiny s diuretickým (Korbelář et al., 1981) a fytoestrogeny s estrogením účinkem. Obsahové látky kůry jsou účinné proti rakovině a Epstein-Baarové viru, který způsobuje herpes a mononukleózu (Jahodář, 2010).

Extrakt z pupenů podporuje normální vývoj kostí. Obsahuje glykosid salicin působící proti zánětům, revmatu a horečce (Herboplanet, 2020) a další fenolické látky jako platyphylosid a apigenin (Sunnerheim et al., 1988). Pupeny dále usnadňují trávení, podporují funkci ledvin, jater a střev, mají obecně detoxikační účinky (Naděje, 2020), pomáhají při léčbě vrozené kardiopatie (porucha funkce srdce), fibromatózy (nádoru) prsu, snižují hladinu cholesterolu a kyseliny močové, a mají drenážní účinky. Také vykazují aktivitu proti bakterii *Streptococcus pyogenes* (Adrienne, 2007), u druhu *Betula pubescens* (bříza pýřitá) zase proti *Streptococcus aureus* (Orodan et al., 2016).

2.4.3 *Fagus sylvatica* (buk lesní)

Kůra obsahuje flavonoidy (deriváty kvercetinu, katechiny, epikatechiny), fenolové kyseliny (vanilová, gallová, protokatechuová, chlorogenová a ferulová), je účinná proti bakteriím (např. *Staphylococcus aureus*) a kvasinkám (Tanase et al., 2019). Listy obsahují flavanoly a flavonoly, deriváty kyseliny hydroxyskořicové a kondenzované třísloviny (Cadahía et al., 2014), v pupenech jsou navíc obsaženy antokyany a kyselina šťavelová (BIOOO.CZ, 2020).

Pupeny podporují imunitní systém (např. tvorba antihistaminů a gammaglobulinů), játra a ledviny (redukce močoviny a kyseliny močové) a jsou použitelné při léčbě aterosklerózy (Adrienne, 2007).

2.4.4 *Quercus robur* (dub letní)

Kůra obsahuje třísloviny, flavonoidy (např. katechiny), kyselinu gallovou, triterpeny, fytoestrogeny a lignany. Působí protizánětlivě a antimikrobiálně, zevně se užívá na ekzémy, hemoroidy, omrzliny (Jahodář, 2010), lehčí popáleniny, pocení nohou (Bylinná lékárna, 2020) a křečové žíly (LÉROS, 2020), listy s obdobnými obsahovými látkami působí ještě proti krvácení a chorobám vylučovací soustavy (Milota, 2020).

Pupeny *Quercus robur* (dub letní) léčí hypotenzi, chronický opar, paradentózu, průjem, působí jako afrodiziakum, stimuluje tvorbu testosteronu (Adrienne, 2007) a kortikoidů (Herboplanet, 2020).

2.4.5 *Tilia cordata* (lípa srdčitá)

Květy obsahují flavonoidy z řad glykosidů kvercetinových (kvercitrin a isokvercitrin, rutin, hyperosid), kempferolových (astragalín a tilirosid) a myricetinových, dále slizy, silice (farnesol, geraniol a eugenol), třísloviny (včetně leukoantokyanů), kyseliny kávovou, chlorogenovou (Tomko et al., 1999) a *p*-kumarovou (ROOTS, 2020), listy navíc kyseliny dihydroxybenzoovou a ferulovou (Kivrak et al., 2017). Květy i listy rodu *Tilia* (lípa) jsou v tradiční medicíně běžně používány při nachlazení díky protikřečovým, diaforetickým (vyvolávajícím pocení) a sedativním účinkům (Allio et al., 2015). Samotné květy ještě navíc působí jako diuretikum, usnadňují vykašlávání, tlumí migrény a nervové napětí, pozitivně ovlivňují žaludek, játra, žlučník (Toker et al., 2004) a střeva, snižují krevní tlak a hladinu cholesterolu, posilují stěny cév (Salvia Paradise, 2020).

Pupeny *Tilia tomentosa* (lípa stříbrná) obsahují aminokyseliny, flavony a deriváty terpenů. Mají protikřečové a sedativní účinky (Tetau, 2013), mohou tak nahradit syntetická léčiva při úzkostných stavech. Jsou využitelné při léčbě degenerativních onemocnění nervové soustavy (Allio et al., 2015), a to díky flavonoidům stimulujícím neurogenezi u dospělých lidí, přičemž tyto látky produkuje celý rod *Tilia* (An et al., 2008; Zainuddin et Thuret, 2012). Pupeny lípy stříbrné s obsahem chlorofylu, polyfenolů, karotenoidů, fytohormonů a hemolytických saponinů mají potenciál ve výrobě kosmetických přípravků přispívajících k normální funkci pokožky a prevenci jejího poškození (Peev et al., 2009).

2.4.2 Příklady dalších gemmoterapeutik

V této podkapitole je uvedeno několik vybraných výzkumů zaměřených na účinky pupenů různých druhů rostlin. Mnohé další příklady jmenuje ve své knize Adrienne (2007).

Donno et al. (2015) popisují využití pupenů *Ribes nigrum* (rybíz černý) při potížích s játry, dýcháním a oběhovým systémem. Další účinky jsou diuretické, protikřečové (Hyun et al.,

2008; Neacșu et al, 2002) protizánětlivé a působící také proti ekzémům nebo lupénce (Dvaranauskaitė et al., 2008). Tabart et al. (2006) uvádí vyšší antioxidační kapacitu pupenů a listů nežli plně dozrálých plodů. Rybíz černý stimuluje kůru nadledvin a funguje tak jako přírodní kortizon, čímž podporuje imunitní systém. Spolu s *Buxus sempervirens* (zimoztráz vřdyzelený) a *Vitis vinifera* (réva vinná) účinkuje proti revmatické artróze s možností snížení dávky běžných léčiv. Samotná réva vinná působí drenážně na mízní systém, čímž zlepšuje imunitu (Militaru et al., 2010). Pupeny (i mladé výhonky) rybízu černého vykazují antimykotické účinky proti *Aspergillus niger* a *Candida albicans* a aktivitu proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus subtilis* (Raiciu et al., 2010).

Pupeny *Rosa canina* (růže šípková) jsou účinné proti bakterii *Listeria monocytogenes*. Jsou bohaté na polyfenoly, přírodní antioxidanty a triterpeny (Orodan et al., 2016), z nichž kyselina betulová s betulinem působí proti parazitům (malárii, hlísti), rakovině, bolestem a zánětům (Moghaddam et al., 2012) a lupeol léčí srdeční choroby a cukrovku, detoxikuje játra a ledviny a má protizánětlivý účinek (Saleem, 2009).

Zajímavá studie Kamala et al. (2014) zkoumá potenciál pupenů *Feniculum vulgare* (fenykl obecný) nahradit antibiotika Amoxicilin a Flumequin standardně užívaná proti bakteriím (např. *Staphylococcus aureus*).

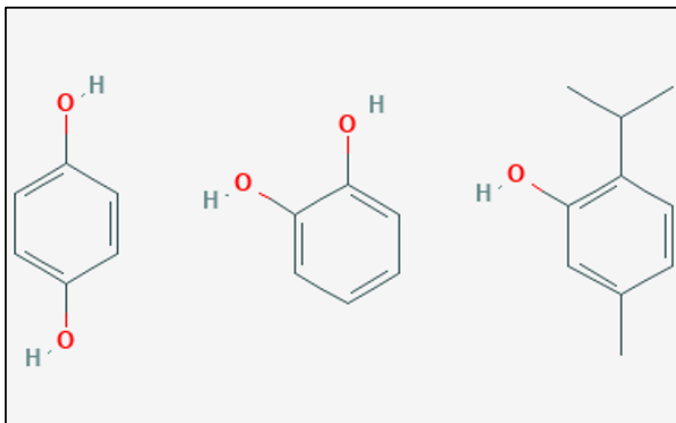
2.5 Přírodní antioxidanty

Antioxidační účinek spočívá v ochraně biologicky významných molekul (hlavně lipidů, bílkovin a nukleových kyselin) před degradací reaktivními formami kyslíku a dusíku (ROS a RNS), které však zároveň hrají důležitou roli ve fyziologických procesech: protizánětlivé reakce, fagocytóza (Paulová et al., 2004), vznik a přenos chemické energie nebo funkce signálních molekul. Oxidační stres je nerovnováha mezi antioxidanty a RONS (ROS a RNS), kam patří kromě volných radikálů (superoxidový anion, hydroxylový, (hydro)peroxylový a alkoxylový radikál, oxid dusnatý) také neutrální molekuly (popř. anionty) s oxidačním potenciálem, především peroxid vodíku, kyselina chlorná, ozon a singletový kyslík. Tyto oxidační látky jsou charakteristické chybějícím elektronem a jejich vznik může vést k řetězové reakci, která je zakončena až spojením dvou radikálů (Opletal et al., 2013) nebo zastavena právě antioxidanty, které fungují jako donory elektronů (Passwater, 2002).

Původ přírodních antioxidantů je endogenní (v organismu) či exogenní (příjem z potravy). Do druhé skupiny patří např. kyselina askorbová a tokoferol (vitamíny C a E), karotenoidy a především polyfenoly (Rice-Evans et al., 1996), které mají vyšší antioxidační účinek než vitamíny (Paulová et al., 2004). Fenolické látky jsou nejrozšířenější sekundární metabolity (Anu et al., 2018). Sestávají z jednoho nebo více aromatických jader a na ně navázaných hydroxylových skupin (Bravo, 1998; Sujak et al., 2006), jejichž počet a poloha ovlivňuje antioxidační potenciál (Donno et al., 2015). Mechanismy antioxidačního působení jsou inhibice enzymů vytvářejících volné radikály (Štípek et al., 2000), chelatace volných iontů kovů podílejících se na vzniku reaktivních forem kyslíku (Luštinec et Žárský, 2003) a nízký redoxní potenciál polyfenolů, které poskytují vodík, čímž redukují volné radikály a sami se přeměňují na málo reaktivní radikály či nereaktivní neradikálové formy (Gerritsen et al., 1995). Existuje několik různých rozdělení polyfenolů, níže uvedené vychází z Velíška et Hajšlové (2009).

2.5.1 Jednoduché fenoly

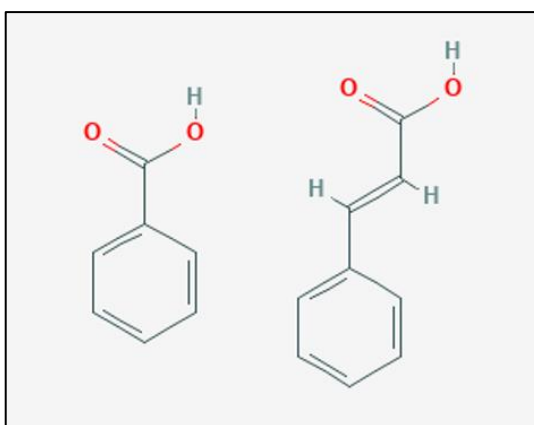
Nejčastějšími zástupci jsou mono- a difenoly, méně pak trifenoly. Většinou se vyskytují jako glykosidy, popřípadě methylethery. Příklady uvedené na Obrázek 1 jsou hydrochinon (Parr et Bowlel, 2000), katechol (Urquiaga et Leighton, 2000) a thymol známý ze zástupců čeledi hluchavkovité (Hertog, 1998). Stich (1991) uvádí antimikrobiální a protirakovinné účinky.



Obrázek 1: Struktura hydrochinonu (vlevo), katecholu (uprostřed) a thymolu (vpravo) - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.5.2 Fenolové kyseliny

Jedná se o volné či esterifikované hydroxyderiváty aromatických kyselin (King et Young, 1999). Kyselina gallová a její dimer vychází z kyseliny benzoové, kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová jsou odvozené od kyseliny skořicové (Obrázek 2). Kyselina chlorogenová je esterem kyseliny kávové, kromě kávy se nachází v různých druzích ovoce a zeleniny (např. brambory). Kyselina ferulová tvoří estery s hemicelulózami ve vláknině (Clifford, 2000), např. v pšeničných otrubách (Kroon et al., 1997).

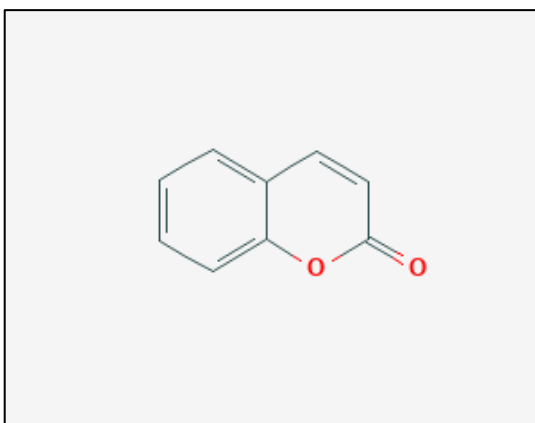


Obrázek 2: Struktura kyseliny benzoové (vlevo) a skořicové (vpravo) - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Fenolové kyseliny (společně s flavonoidy) jsou důležité pro vývoj rostlin a zajišťují jejich obranu při infekcích (Cetkovic et al., 2007). Xiao-Li et al. (2013) popisují potenciální fytoterapeutické využití protizánětlivých účinků kyseliny chlorogenové obsažené např. v *Chrysanthemum indicum* (listopadka indická). Vardar-Ünlü et al. (2008) uvádí působení kyseliny benzoové proti bakteriím. Kyselina kávová má potenciál zpomalovat stárnutí pokožky (Dudonné et al., 2011).

2.5.3 Kumariny

Tyto látky vychází z kyseliny *o*-kumarové (Jahodář, 2011) a rozdělují se na několik skupin. Jednoduché kumariny zastupuje kromě samotného kumarinu (Obrázek 3) např. fraxetin (Dudek-Makuch et Matlawska, 2013), eskulin s eskuletinem, skopoletin, hernianin, skimin, a umbiliferon. Do kondenzovaných kumarinů patří furanokumariny psoralen, xanthotoxin, imperatorin, bergapton, angelicin a pimpinelin a pyranokumariny xanthyletin a visnadin (Bourgaud et al., 2006; Tomko et al., 1999). Existují ještě bikumariny (např. euphorbetin a ismailin) a trikumariny (Hussain, et al., 2012). Čeledi *Apiaceae* (miříkovité), *Fabaceae* (bobovité), *Poaceae* (lipnicovité), *Asteraceae* (hvězdnicovité) a *Rutaceae* (routovité) jsou typické pro výskyt kumarinů (Bruneton, 1999)



Obrázek 3: Struktura kumarinu - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

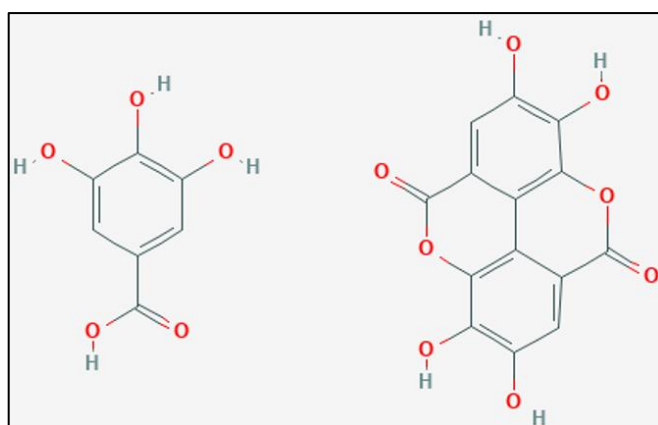
Kumariny jsou v současnosti považovány za enzymatické inhibitory s velkým potenciálem v léčbě neurodegenerativních onemocnění (Anand et Singh, 2013; Huang et al., 2013; Patil et al., 2013; da Silva et al., 2013; Zhou et al., 2008). Venugopala et al. (2013) doplňují ještě účinky hubnoucí, hypoglykemické, antibakteriální (např. proti tuberkulóze) a antifugální.

Konkrétně bergapton, isopimpinelin a xantotoxin mají antialergické (Kimura et Okuda, 1997) a imunosupresivní (Kuzel et al., 1992) účinky. Eskuletin obsažený v pupenech *Aesculus hippocastaneum* (jírovec maďal) působí protizánětlivě, tlumí bolest (Rzodkiewicz et al., 2015) a léčí artrózu (Mao et al., 2015). Dále spolu s glykosidem eskulinem vykazují příznivé účinky na oběhový systém (při hypotenzi, trombózách, hemoroidech). Skopoletin působí proti vysokému tlaku a křečím. Visnadin z *Ammis visnaga* (morač zákrovnatý) léčí anginu pectoris a tlumí příznaky senility (Bruneton, 1999; Dudek-Makuch et Matlawska, 2013). Li et al. (2013) uvádí možné protirakovinné účinky collininu, obsahové látky *Zanthoxylum schinifolium* (žlutodřev vínobobovitý). Podobný potenciál mají nordentatin, xanthoxyletin a clausarin obsažené v rostlině *Clausena excavata* z čeledi routovitých (Arbab et al., 2011). *Aegle marmelos* (oslizák líbezný) obsahuje kumarin marmelid, který působí proti Coxsackie viru bez vedlejších účinků, na rozdíl od současně používaného ribavarinu (Dhankhar et al., 2011). Aegelinol spolu s jeho esterem agasyllinem přítomné v rostlině *Ferulago campestris* (čeď miříkovité) inhibují bakterie *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Salmonella typhi* a *Helicobacter pylori*, která způsobuje onemocnění žaludku jako vředy či gastritida (Basile et al., 2009). Imperatorin z *Angelica sinensis* (děhel čínský) má serotonergní účinky (zlepšuje náladu, chování) a tlumí návaly horka při menstruaci a menopauze (EMA, 2020).

2.5.4 Třísloviny

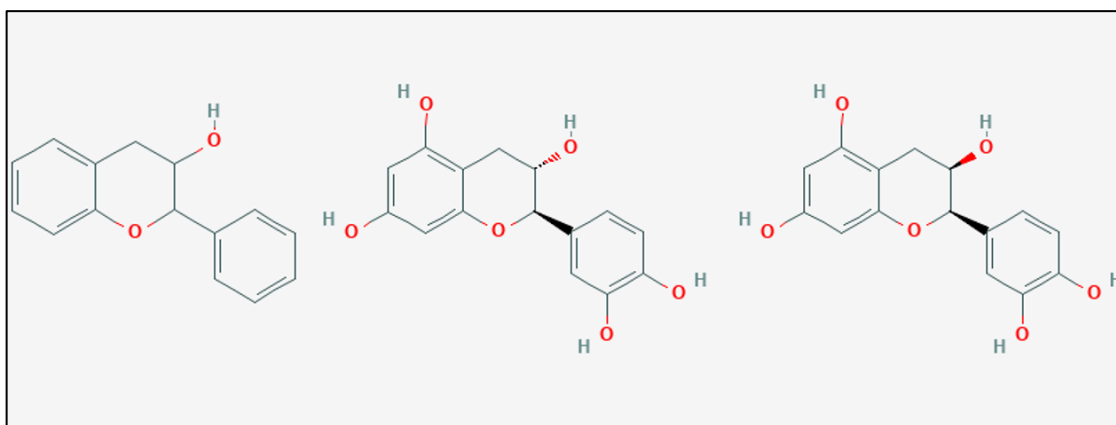
Tyto látky plní v rostlinách různé důležité funkce: chrání pupeny před mrazem, listy před herbivory (dodávají trpkou chuť), kořeny před vstupem patogenů, v semenech vykazují alopatické a baktericidní účinky, v kmeni regulují růst a působí proti mikrobům (Ahok et Upadhyaya, 2012). Terapeutický potenciál spočívá kromě antioxidačních účinku také v enzymatické inhibici nebo snižování mutagenity některých karcinogenů (Bruneton, 1999). Třísloviny se vyskytují např. v čajovníku čínském (Juneja et al., 2013), kakaovníku pravém (Othman et al., 2007), révě vinné, trnce obecné (Velíšek et Hajšlová, 2009), mangovníku indickém (Oliveira et al., 2016) a angreštu indickém (Yang et Liu, 2014).

Hydrolyzovatelné třísloviny neboli taniny existují ve formě esterů sacharidů (nejčastěji D-glukóza) a fenolických kyselin. Rozdělení taninů do dílčích skupin závisí na produktech jejich hydrolýzy. Kyselina gallová vzniká z **gallotaninů** (Bruneton, 1999) vyskytujících se zejména v hálkách na škumpě čínské a v bobech sapanu ostnitého (Ahok et Upadhyaya, 2012). U ellagotaninů vzniká k. ellagová oxidací a následným spojením dvou sousedních zbytků kyseliny gallové (Obrázek 4). **Monomerní ellagotaniny** zastupují korilagin (listy brusnice brusinky), geraniin (čeledi kakostovité a pryšcovité) tellimagrandiny, pedunculagin, kasuariktin, a kastalagin s veskalaginem přítomné v dubovém dřevě (Velíšek et Hajšlová, 2009). Mezi **oligomery ellagotaninů** patří např. grandinin a roburin (dubové dřevo), dále agrimoniin (růžovité, hlavně řepík sibiřský), nupharin (leknínovité), rugosiny a sanguin v rostlinách rodu krvavec a ostružiník (Velíšek, 2002).



Obrázek 4: Struktura kyseliny gallové (vlevo) a ellagové (vpravo) - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

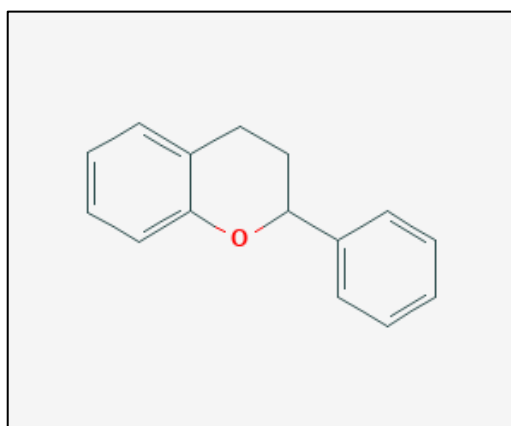
Kondenzované třísloviny neboli proanthokyanidiny vytvářejí dimery či vyšší polymery flavonoidních jednotek tvořené flavan-3-olem, katechinem a epikatechinem (Bruneton, 1999), viz Obrázek 5. Monomerů jsou bezbarvé prekurzory anthokyanidinů a nazývají se leukoanthokyanidiny (Velíšek et Hajšlová, 2009).



Obrázek 5: Struktura flavan-3-olu (vlevo), catechinu (uprostřed) a epikatechinu (vpravo) - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.5.5 Flavonoidy

Základní strukturní jednotkou je flavan (Obrázek 6) tvořený dvěma benzenovými jádry, spojených pyranem. Flavonoidy se odlišují počtem a polohou navázaných hydroxy- a keto-skupin (Brown et al., 2001) a také podle stupně oxidace (Buer et Muday, 2004). U rostlin se podílejí na obraně proti hmyzu a při mechanickém poškození, jejich obsah je vyšší právě v postižených částech (Čopíková, 1999). Vyskytují se hlavně jako glykosidy vázané nejčastěji s glukózou (Scalbert et Williamson, 2000).



Obrázek 6: Struktura flavanu - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Flavony jsou žlutá rostlinná barviva (Cermak et Wolfram, 2006) s protizánětlivými účinky (Terra et al., 2009). Příkladem je luteolin v přesličce a apigenin v celeru či pertželi (Luštinec et Žárský, 2003). **Chalkony** jsou otevřené deriváty flavonů, přítomné např. v jablkách, hruškách a rajčatech (Čopíková, 1999), vykazující antimikrobiální, insekticidní, protirakovinné, protizánětlivé, estrogenní a další účinky (Dimmock et al., 1999; Opletalová et al., 2000).

Flavonoly se vyskytují hlavně v ovoci a zelenině. Jsou zastoupeny především kvercetinem, který je obsažen např. v čaji, jeřábu a rakytníku (Davalos et al., 2006), má protirakovinné, protizánětlivé a protialergické účinky, působí proti kornatění tepen a vzniku trombóz (Zee et al., 2010) a spolu s kaempferolem zvyšuje imunitu, konkrétně byla prokázána účinnost proti některým typům herpes simplex viru (Arena et al., 2007).

Flavanony jsou typickými flavonoidy citrusů (např. grepfruit, pomeranč). Příkladem jsou naringenin a hesperetin (Manach et al., 2004).

Anthokyany jsou pigmenty květů, plodů i listů a nabývají barev od červené, přes fialovou až po modrou (kyselé, neutrální nebo zásadité pH). Jejich necukerné (aglykonové) složky (formy) se nazývají anthokyanidiny (Kosieradzka et al., 2004), jsou to např. pelargonidin, kyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin a malvidin (Kong et al., 2003). Anthokyany mají zásadní vliv na antioxidační kapacitu rostlin vzhledem k celkovému obsahu polyfenolů (Eichhorn et Winterhalter, 2005). U člověka posilují imunitu, působí proti alergiím, zánětům, kardiovaskulárním chorobám a cukrovce a mají protirakovinné a antibakteriální účinky (Bonertz et al., 2006).

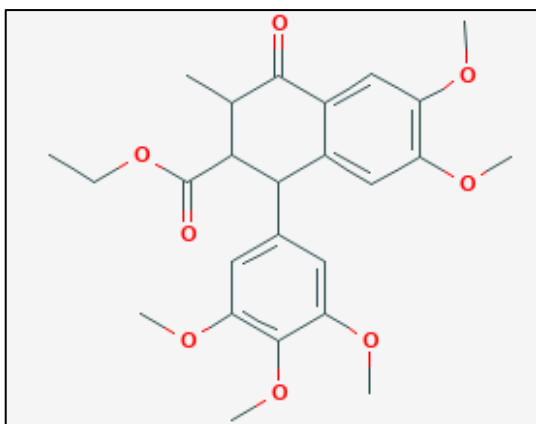
Isoflavonoidy patří do tzv. fytoalexinů, které se tvoří v rostlinách jako odpověď na stres různého původu (Barlass et al., 1987), a to především v luštěninách. Např. *Medicago sativa* (vojtěška setá) produkuje při infekci patogenními houbami látku medicarpin (Čopíková, 1999). Vyskytují se zejména necukerné formy neboli aglykony (Reynaud et al., 2005), např. isoflavony daizein a genistein s estrogením účinkem (Andersen et Markham, 2006). Isoflavonoidy obecně také snižují riziko vzniku osteoporózy a rakoviny prsu (Adlercreutz et Mazur, 1997).

Stilbeny se vyskytují v révě vinné, borovici lesní a podzemnici olejné (Čopíková, 1999). Jsou zastoupeny zejména resveratrolem, který patří mezi fytoalexiny (Jeandet et al., 1995), má protirakovinné, protizánětlivé a antimutagení účinky a snižuje hladinu cholesterolu a riziko vzniku trombózy (Flémond, 2000). Jeho *trans* izomer vykazuje estrogení účinky (Cornwell et al., 2004).

Katechiny a jejich *cis* izomery **epikatechiny** jsou nejvíce obsaženy v čajovníku čínském (Higdon, 2003; Khan et Mukhtar, 2007), poté v ovoci, luštěninách (Arts et al., 2000), červeném vínu a čokoládě (Frankel et al., 1995). Pozitivně ovlivňují kardiovaskulární systém (snižují tlak, riziko vzniku sraženin a hladinu cholesterolu), redukují tuky, působí proti zánětům (Crespy et Williamson, 2004), a dokonce vykazují aktivitu proti HIV (Liu et al., 2005). Konkrétně epigallokatechin má protirakovinné účinky (Ahmad et Mukhtar, 1999).

2.5.6 Lignany

Skládají se ze dvou fenylypropanových jednotek (Obrázek 7) a vyskytují se spíše ve formě aglykonů. Jsou hojně obsaženy v jehličnanech, typicky ve dřevě, kůře a pryskyřici. Lignany vykazují účinky antioxidační, antimikrobiální (působí také proti HIV), cytostatické (Slanina, 2000), (anti)estrogení a protirakovinné (Konoshima et al., 1991).



Obrázek 7: Struktura lignanu - upraveno dle zdroje <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.5.7 Ostatní fenolické látky

Mezi tzv. **prenylované flavonoidy** patří z chalkonů xanthohumol, desmethylxanthohumol a xanthogalenol a z flavanonů isoxanthohumol, 6- prenylnaringenin, 8-prenylnaringenin a 8-geranylnaringenin. Tyto látky se vyskytují v hlávkách *Humulus lupulus* (chmel otáčivý), mají protirakovinné, protizánětlivé, estrogenní, antimikrobiální a protisrážlivé vlastnosti (Karabín et al., 2012). Velíšek (2002) ještě doplňuje **diterpeny kyseliny karnosové** obsažené v rozmarýnu a šalvěji.

3 Metodika

3.1 Zpracování materiálu

Výběr stromů pro analýzy se odvíjel od zakoupených produktů firmy Naděje (Obrázek 8), vzorky sebrané v terénu by tedy měly pocházet z druhů *Betula pendula* (bříza bělokorá), *Fagus sylvatica* (buk lesní), *Quercus robur* (dub letní), *Acer campestre* (javor babyka) a *Tilia cordata* (lípa srdčitá). Lípa nebyla přesně určena z důvodu přítomnosti intermediálních znaků. Javor babyka nebyl nalezen na žádné z vybraných lokalit, místo něj byl použit běžněji rostoucí *Acer pseudoplatanus* (javor klen).



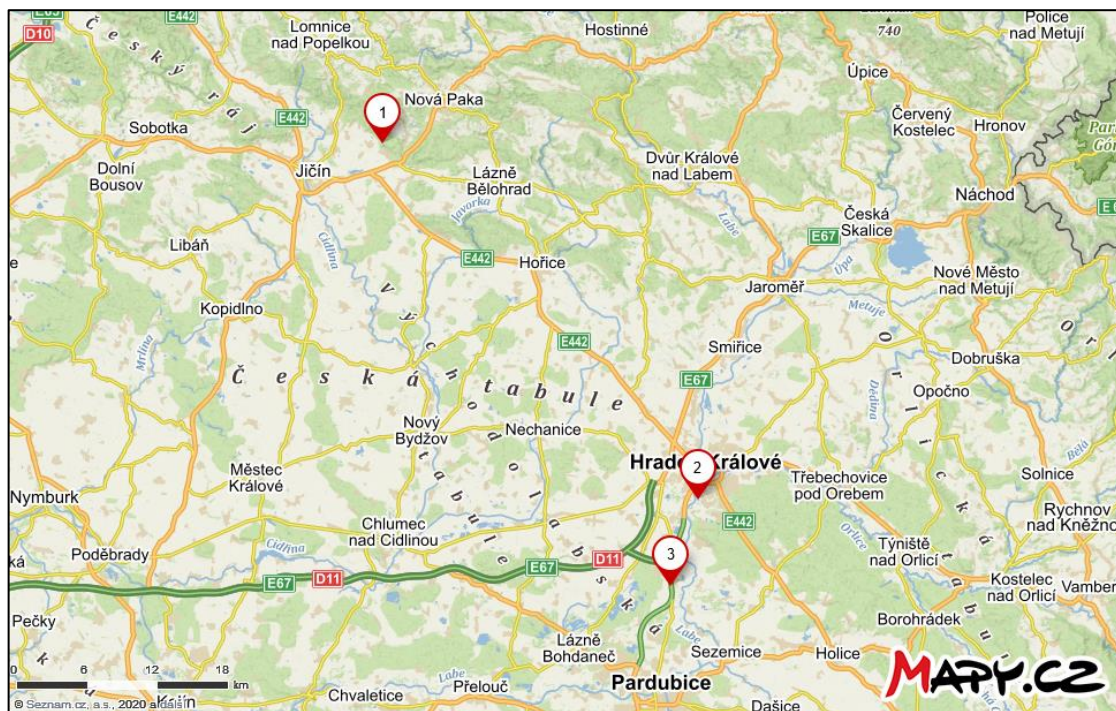
Obrázek 8: Extrakty z pupenů, zleva bříza bělokorá, buk lesní, dub letní, javor babyka a lípa srdčitá - upraveno dle zdroje <https://nadeje-byliny.eu/>

Výchozím zdrojem pro zhotovení extraktů ze sebraných pupenů, tedy macerace a následné filtrace a ředění, byl Zentrich (2007).

3.1.1 Sběr pupenů

Rostlinný materiál pocházel ze tří různých lokalit (Obrázek 9). Hospodářský smíšený les nad chatovou osadou mezi obcemi Tužín a Dolánky (okres Jičín) byl vybrán jako lokalita „čistá“ (Obrázek 10). Porosty kolem slepých ramen Labe v Hradci Králové (městská část Třebeš) jako lokalita „běžná“ (Obrázek 11) a okolí tepelné elektrárny Opatovice n. Labem, kde rostou spíše umělé výsadby s občasným zmlazením (veřejná zeleň a lemy cest), jako

lokality „znečištěná“ (Obrázek 12). GPS souřadnice zájmových stromů jsou zaznamenány v Tabulka 1. Z důvodu cíleně omezené rozlohy lokalit (kvůli zachování co nejpodobnějších podmínek prostředí) nebyl na Třebši nalezen buk a na lokalitě u Jičína chybí lípa.



Obrázek 9: Topografie lokalit "Jičín", "Hradec" a "Opatovice" - upraveno dle zdroje <https://mapy.cz/>

Tabulka 1: Souřadnice vybraných stromů na jednotlivých lokalitách

lokality	strom				
	bříza	buk	dub	javor	lípa
Jičín	50.4595510N 15.4451834E	50.4593813N 15.4448632E	50.4593745N 15.4454486E	50.4597806N 15.4447885E	-
HK	50.1881916N 15.8205388E	-	50.1882557N 15.8204760E	50.1891604N 15.8208727E	50.1903332N 15.8219516E
O. n/L	50.1235543N 15.7894273E	50.1239993N 15.7886433E	50.1205056N 15.7890121E	50.1237417N 15.7891927E	50.1229275N 15.7883574E



Obrázek 10: Vybrané stromy z podzimního sběru na lokalitě "Jičín", zleva bříza, buk, dub a javor (vlastní foto)



Obrázek 11: Vybrané stromy z podzimního sběru na lokalitě "Hradec", zleva bříza, dub, javor a lípa (vlastní foto)



Obrázek 12: Vybrané stromy z podzimního sběru na lokalitě "Opatovice", zleva bříza, dub, buk, javor a lípa (vlastní foto)

Materiál byl sbírán na podzim a na jaře. Obrázek 13 ilustruje pupeny jednotlivých stromů sebraných na jaře. Tabulka 2 ukazuje konkrétní data podzimních a jarních sběrů.



Obrázek 13: Ukázka příkladně pootevřených pupenů z jarních sběrů, a. bříza, b. dub, c. lípa, d. javor a e. buk (vlastní foto)

Tabulka 2: Data podzimních a jarních sběrů pupenů jednotlivých stromů

období	lokalita	strom				
		bříza	buk	dub	javor	lípa
podzim	Jičín	8. 12. 2019	8. 12. 2019	8. 12. 2019	8. 12. 2019	-
	HK	9. 12. 2019	-	9. 12. 2019	9. 12. 2019	9. 12. 2019
	O. n/L	9. 12. 2019	9. 12. 2019	9. 12. 2019	9. 12. 2019	9. 12. 2019
jaro	Jičín	4. 4. 2020	24. 4. 2020	24. 4. 2020	11. 4. 2020	-
	HK	1. 4. 2020	-	12. 4. 2020	10. 4. 2020	1. 4. 2020
	O. n/L	1. 4. 2020	26. 4. 2020	17. 4. 2020	12. 4. 2020	17. 4. 2020

3.1.2 Macerace

Podzimní vzorky byly macerovány všechny najednou 10. 12. 2019, většina jarních vzorků 18. 4. (kromě dubu z lokality Třebeš a obou vzorků buku) a zbývající jarní 10. 5. 2020.

Jako vyluhovadlo byl zvolen 42% lihoglycerin, který byl připraven v množství 600 ml smícháním 420 ml 60% etanolu (nedenaturovaný) a 180 ml 85% glycerinu. Obě výchozí látky bylo nutné kvůli jejich koncentrované formě (98, respektive 96 %) předem naředit destilovanou vodou, a to v poměru 300 ml etanolu ku 200 ml H₂O, resp. 153 ml glycerinu ku 27 ml H₂O.

Pupeny byly odváženy na analytických vahách (podzimní sběr) a kapesních digitálních vahách (jarní sběr) do kalibrovaných 50ml baněk. Poté byl přidán lihoglycerin o objemu 20,05 ml (ekvivalent 20ti g rozpouštědla, zjištěný na analytických vahách s pomocí mikropipet). Navážky čerstvých pupenů jednotlivých stromů ukazuje Tabulka 3, podle literatury (Zentrlich, 2007) mělo být naváženo po 1,8 g pupenů břízy a buku a 2,3 g pupenů lípy. Navážka u javoru byla odhadnuta na 2,3 g, u dubu na 2 g. Směsi v baňkách byly ponechány ve tmě za pokojové teploty po dobu přibližně čtyř týdnů. Asi v polovině tohoto období byly maceráty lehce protřepány.

Tabulka 3: Přesné navážky pupenů u experimentálně připravovaných extraktů

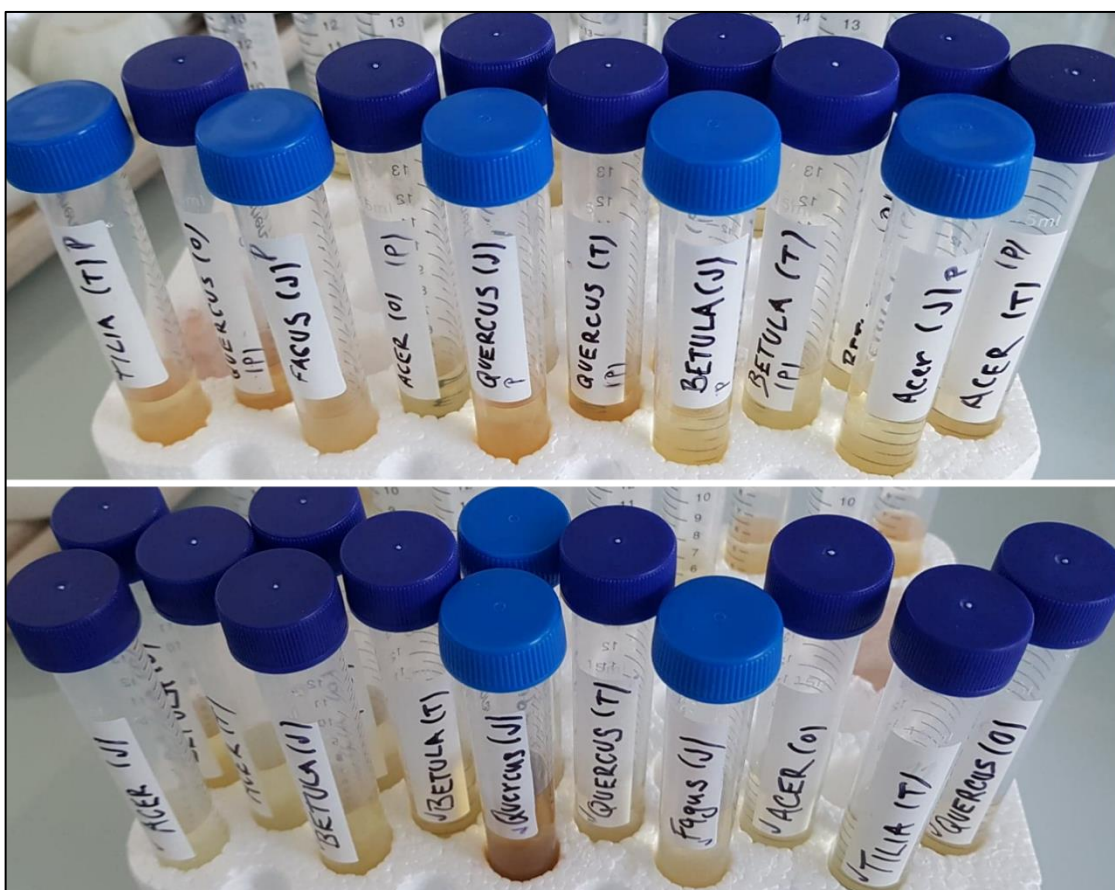
lokalita	přesná navážka v g - podzimní/jarní sběr				
	<i>Acer</i>	<i>Betula</i>	<i>Quercus</i>	<i>Fagus</i>	<i>Tilia</i>
Jičín	2,2959/2,28	1,7973/1,8	1,992/2,0	1,8034/1,82	-
HK	2,3084/2,28	1,8005/1,7	1,9926/2,03	-	2,2984/2,31
O. n/L	2,308/2,36	1,8066/1,7	1,9949/2,0	1,7999/1,8	2,2971/2,31

3.1.3 Filtrace a ředění

Hotové maceráty byly přefiltrovány v nálevce přes filtrační papír do nově popsaných 50ml baněk (Obrázek 14), ze slitých pupenů byl ještě manuálním tlakem získán zbytek extraktu pro maximální výtěžnost. Tato základní tinktura byla zředěna lihoglycerinem, který byl použit při maceraci (42%) v poměru 1:10. Od každého vzorku bylo připraveno 10 ml extraktu (Obrázek 15). Podzimní sběry byly filtrovány a ředěny 9. 1., většina jarních sběrů (kromě dubu z Třebše a obou vzorků buku) 18. 5. a zbývající jarní 8. 6. 2020. Takto připravené extrakty byly následně použity pro pozdější analýzy.



Obrázek 14: Nová sada odběrných baněk připravených na filtraci macerátů (vlastní foto)



Obrázek 15: Hotové extrakty z pupenů (vlastní foto)

3.2 Analýzy

Tabulka 4 ukazuje časovou chronologii analýz. Jednotlivé reakční směsi byly připravovány do Eppendorf zkumavek adekvátního objemu (1,5 a 2 ml). Koncentrace účinných látek a jejich antioxidační kapacita byly zjišťovány pomocí hodnot absorbance reakčních směsí vzorků (a standardů) získaných měřeními ve spektrofotometru Cintra 101 (Obrázek 16),

pomocí softwaru Cintral. Pro měření byly použity plastové kyvety. Ve všech analýzách byla provedena tři opakování u každého vzorku (včetně extraktů od firmy Naděje).

Tabulka 4: Přehled provedených analýz

datum	9. 1. 2020	10. 1. 2020	18. 5. 2020	19. 5. 2020	9. 6. 2020	23. 6. 2020	
analýza	fenoly, flavonoidy	DPPH ¹	flavonoidy, DPPH	fenoly	fenoly, flavonoidy	DPPH	všechny analýzy
materiál	podzimní sběry		většina jarních sběrů ³		zbývající jarní ⁴		Naděje
Vysvětlivky: ¹ 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl ^{3,4} všechny jarní sběry kromě dubu z Třebše a obou vzorků buku							



Obrázek 16: Spektrofotometr Cintra 101 s plastovými kyvetami uvnitř (vlastní foto)

3.3.1 Celkový obsah rozpustných fenolů a flavonoidů

Obsah rozpustných fenolů byl stanoven FC (Folin-Ciocalteu) metodou podle Singletona et Rossiho (1965). Reakční směs sestávala z 30 μl macerátu, 470 μl destilované vody, 975 μl 2% roztoku Na_2CO_3 (v destilované vodě) a 25 μl 2N FC činidla (Sigma-Aldrich). Vzorky jsme inkubovali jednu hodinu při 45 °C a jejich absorbanci jsme měřili při vlnové délce 750 nm. Blank obsahoval místo macerátu dalších 30 μl (celkem 500 μl) destilované vody. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky jsme použili kyselinu gallovou (Sigma-Aldrich). Výsledky jsme vyjádřili v mg g^{-1} FW (čerstvá hmotnost).

Obsah flavonoidů jsme stanovili klasickou reakcí s ionty hliníku, které specificky interagují s keto- nebo hydroxy- skupinou (Ordoñez et al., 2006). Reakční směs, obsahující 500 μl macerátu a 500 μl 2% roztoku AlCl_3 (v 100% metanolu), jsme inkubovali při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Absorbanci jsme měřili při 420 nm. Blank obsahoval místo macerátu 470 μl 80% metanolu. Jako standard pro sestavení kalibrační křivky jsme použili kvercetin (Sigma-Aldrich). Výsledky jsme vyjádřili v mg g^{-1} FW.

3.3.2 Zhášení radikálu DPPH

Podle upravené metodiky Brand-Williamse et al. (1995) jsme připravili 0,06 mM roztok radikálu rozpuštěním 2,4 mg DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) ve 100 ml

100% metanolu. K 10 μ l vzorku, respektive kvercetinu jako standardu, jsme přidaly 2 ml radikálu. Reakční směs jsme inkubovali 30 min za laboratorní teploty v temnu. Absorbanci vzorků jsme měřili při vlnové délce 515 nm. Jako blank byl použit 100% metanol.

Zásobní roztok **kvercetinu** byl připraven rozpuštěním 2 mg v 1 ml 100% metanolu. Poté byla zhotovena koncentrační řada o deseti bodech od 0,1 mg/ml po 1 mg/ml.

Kapacita zhášet radikál DPPH byla vypočtena v procentech podle Šilera et al. (2014): **DPPH Sc = [(AA-AB)/AA]*100**, kde Sc = scavenged, AB = absorbance blanku v čase 0 min, AA = absorbance vzorku v čase 30 min.

3.3 Statistické zpracování výsledků

Naměřené hodnoty absorbance vzorků byly zpracovány v MS Excel pomocí funkcí Průměr a Směrodatná odchylka, která byla statisticky zpracována v jednorozměrné analýze rozptylu (Anova) na hladině významnosti 5 %, což je nejnižší hodnota, na které zamítáme signifikantní rozdíl. V případě, že $P < 0,05$, jsou průměrné hodnoty naměřené absorbance vzájemně signifikantně odlišné. Pro porovnání rozdílnosti byl použit Tukeyho test, který zjišťuje, zda jsou rozdíly pouze uvnitř konkrétní skupiny nebo mezi skupinami navzájem. Tukeyho test se využívá, pokud porovnáujeme stejně početné výběry. Všechny tyto výstupy byly zaneseny do přehledných sloupcových grafů.

4 Výsledky

Následující grafy demonstrují hodnoty obsahových látek v mg g^{-1} FW (čerstvá hmotnost pupenů) a antioxidační (zhášecí) kapacity v % u jednotlivých extraktů z pupenů. Hodnoty představují průměr ze tří opakování měření absorbance ve spektrofotometru. Každý graf je vždy doprovázen tabulkou průměrných hodnot a doplněn o chybové úsečky vyjadřující standardní chybu průměru, která udává, jak se průměr náhodného výběru liší od střední hodnoty základního souboru. Písmena nad sloupci hodnot získaná pomocí Tukeyho testu znázorňují rozdílnost výsledných dat. Různá písmena mezi dvěma sloupci značí statisticky průkazný vzájemný rozdíl.

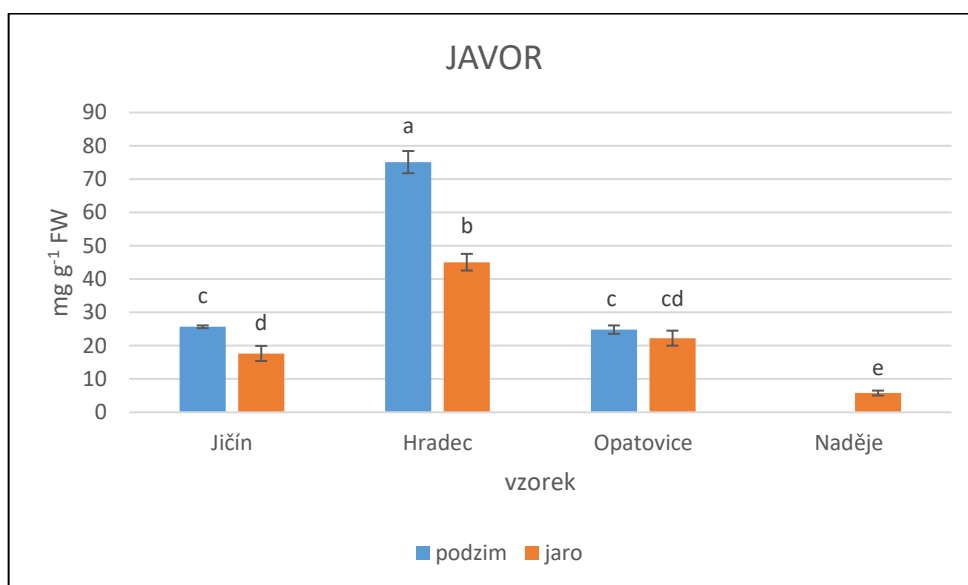
Porovnávání vzorků mezi různými lokalitami má smysl pouze v rámci stejných sběrů, tedy jarních nebo podzimních. Podobně srovnání jarních sběrů s podzimními má smysl pouze v rámci stejné lokality. Extrakty od firmy Naděje jsou vyrobeny z jarních pupenů, proto je možné porovnávat pouze s jarními sběry vybraných lokalit Jičín, Hradec a Opatovice.

4.1 Celkový obsah rozpustných fenolů a flavonoidů

Obsah fenolů, respektive flavonoidů byl vypočten pomocí naměřených hodnot absorbancí vzorků a hodnot získaných z koncentrační řady kyseliny gallové, respektive kvercetinu.

4.1.1 Fenoly

Z grafu (Obrázek 17) a Tabulka 5 vyplývá následující. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů javoru je patrný u lokalit Jičín a Hradec, kde se hodnoty liší o $8,01 \text{ mg g}^{-1}$ FW (45,34 %) a $30,05 \text{ mg g}^{-1}$ FW (66,69 %). Srovnání lokalit Hradec/Opatovice, respektive Hradec/Jičín vykazuje rozdíl podzimních sběrů $50,29 \text{ mg g}^{-1}$ FW (202,67 %), respektive $27,39 \text{ mg g}^{-1}$ FW (155,09 %) a jarních $22,8 \text{ mg g}^{-1}$ FW (102,45 %), respektive $49,43 \text{ mg g}^{-1}$ FW (192,58 %). Vzájemně se významně neliší lokality Jičín a Opatovice, ani podzimní a jarní sběry u Opatovic. Nejvyšší obsah fenolů má vzorek z podzimního sběru v Hradci, nejnižší hodnota je patrná u vzorku od firmy Naděje, který se liší o $11,89 \text{ mg g}^{-1}$ FW (205,87 %) oproti Jičínu, $39,28 \text{ mg g}^{-1}$ FW (680,26 %) oproti Hradci a $16,48 \text{ mg g}^{-1}$ FW (285,41 %) oproti Opatovicím.

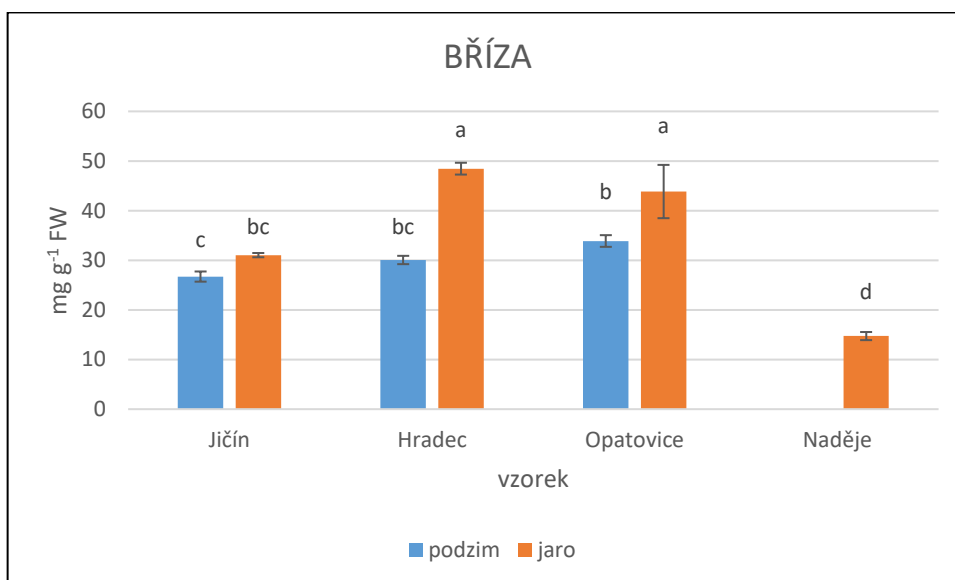


Obrázek 17: Obsah fenolů u jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru

Tabulka 5: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu fenolů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru

JAVOR	podzim	jaro
Jičín	25,6682 ± 0,413	17,6612 ± 2,2675
Hradec	75,0992 ± 3,3398	45,0523 ± 2,4992
Opatovice	24,8121 ± 1,2586	22,2535 ± 2,2512
Naděje	-	5,774 ± 0,7413

Z grafu (Obrázek 18) a Tabulka 6 vyplývá následující. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů břízy je patrný u lokalit Hradec a Opatovice, kde se hodnoty liší o 18,4 mg g⁻¹ FW (61,23 %), respektive 9,97 mg g⁻¹ FW (29,41 %). Sběry z Jičína nejsou mezi sebou statisticky odlišné, podobně srovnání Hradec/Opatovice nepřináší významný rozdíl. Vzorek pupenů z břízy od Naděje vykazuje nejnižší obsah fenolů, rozdíl jeho hodnoty činí 16,31 mg g⁻¹ FW (110,72 %) oproti Jičínu, 33,73 mg g⁻¹ FW (229 %) oproti Hradci a 29,12 mg g⁻¹ FW (197,72 %) oproti Opatovicím.

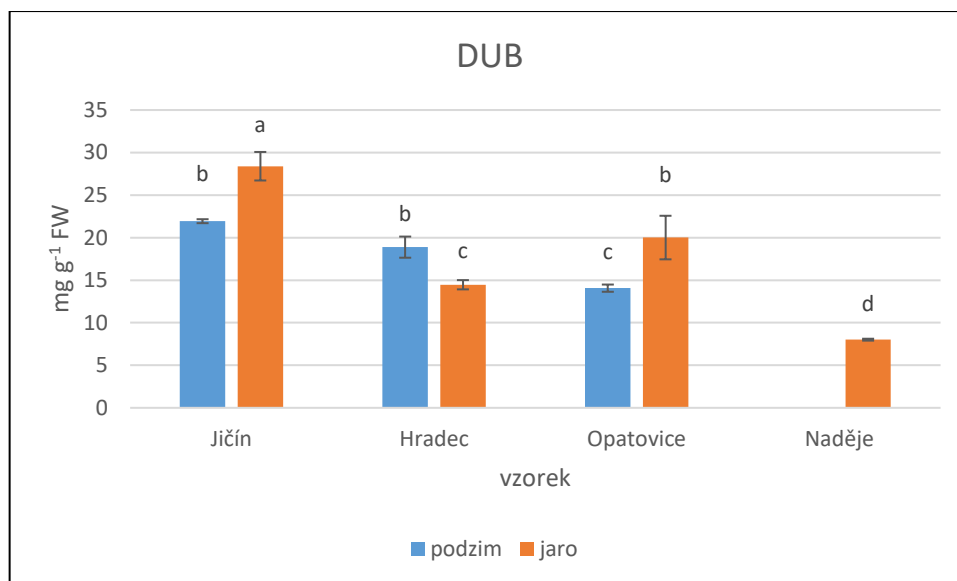


Obrázek 18: Obsah fenolů u jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy

Tabulka 6: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu fenolů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy

BŘÍZA	podzim	jaro
Jičín	26,7169 ± 1,0231	31,0366 ± 0,4313
Hradec	30,0563 ± 0,839	48,4585 ± 1,1912
Opatovice	33,8842 ± 1,1775	43,851 ± 5,3695
Naděje	-	14,7291 ± 0,8171

Z grafu (Obrázek 19) a Tabulka 7 vyplývá následující. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů dubu je patrný u všech lokalit, 6,46 mg g⁻¹ FW (29,45 %) u Jičína, 4,42 mg g⁻¹ FW (30,55 %) u Hradce a 5,95 mg g⁻¹ FW (42,3 %) u Opatovic. Všechny lokality se navzájem liší v rámci jarních sběrů, srovnání Jičín/Hradec přináší rozdíl 13,93 mg g⁻¹ FW (96,28 %), Hradec/Opatovice 5,55 mg g⁻¹ FW (38,33 %) a Jičín/Opatovice 8,38 mg g⁻¹ FW (41,89 %). Lokality Jičín a Hradec se v rámci podzimních sběrů liší oproti Opatovicím o 7,87 mg g⁻¹ FW (55,98 %) a 4,82 mg g⁻¹ FW (34,29 %), vzájemně jsou však v tomto směru statisticky uniformní. Nejvyšší obsah fenolů má jarní sběr z Jičína, nejmenší Naděje, která je rozdílná oproti Jičínu o 20,38 mg g⁻¹ FW (254,47 %), oproti Hradci o 6,46 mg g⁻¹ FW (80,59 %) oproti Opatovicím o 12 mg g⁻¹ FW (149,82 %).

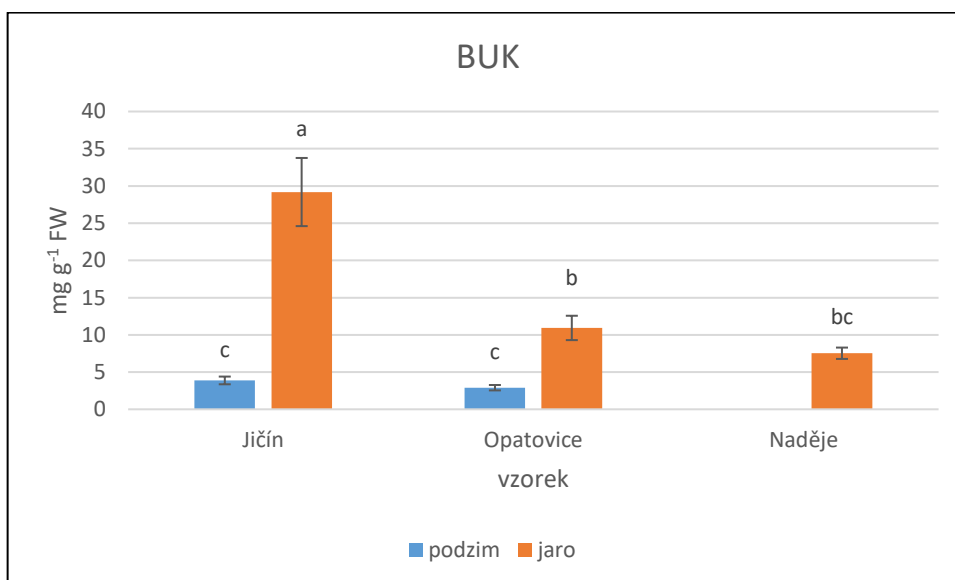


Obrázek 19: Obsah fenolů u jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu

Tabulka 7: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu fenolů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu

DUB	podzim	jaro
Jičín	21,9353 ± 0,2315	28,3955 ± 1,6755
Hradec	18,8853 ± 1,2416	14,4665 ± 0,5441
Opatovice	14,0633 ± 0,4251	20,0119 ± 2,5588
Naděje	-	8,0107 ± 0,1113

Z grafu (Obrázek 20) a Tabulka 8 vyplývá následující. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů buku má hodnotu 25,3 mg g⁻¹ FW (652,1 %) u lokality Jičín a 8,03 mg g⁻¹ FW (276,41 %) u Opatovic. Tyto lokality mají podobné hodnoty podzimních sběrů, v jarních jsou odlišné o 18,25 mg g⁻¹ FW (166,96 %). Hodnota u Naděje je výrazně odlišná pouze oproti jarnímu sběru z Jičína, který obsahuje nejvíce fenolů. Tento rozdíl činí 21,65 mg g⁻¹ FW (287,54 %).

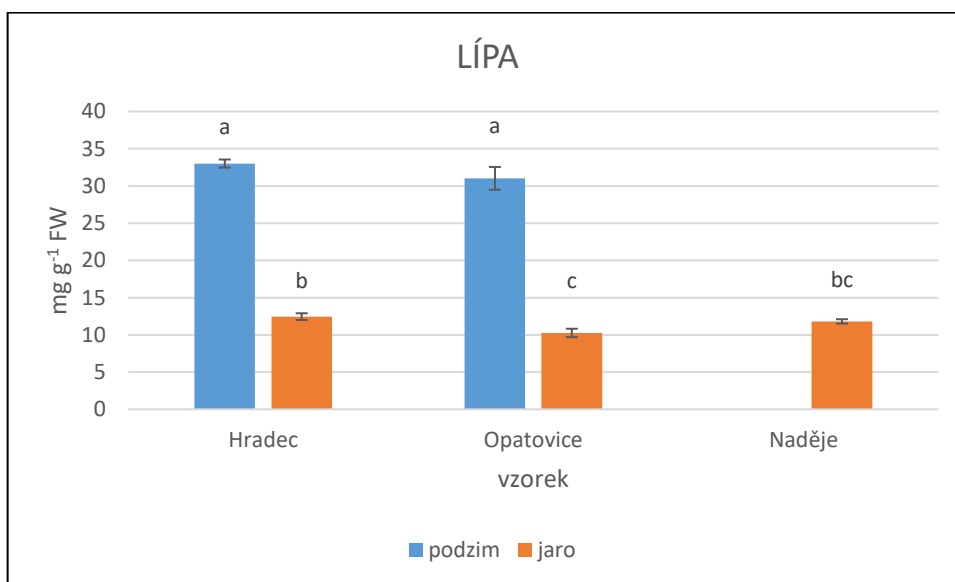


Obrázek 20: Obsah fenolů u jednotlivých variant extraktů z pupenů buku

Tabulka 8: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu fenolů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů buku

BUK	podzim	jaro
Jičín	3,8804 ± 0,518	29,1843 ± 4,5189
Opatovice	2,9043 ± 0,361	10,932 ± 1,6362
Naděje	-	7,5307 ± 0,7618

Z grafu (Obrázek 21) a Tabulka 9 vyplývá následující. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů lípy má hodnotu 20,56 mg g⁻¹ FW (165,16 %) u Hradce a 20,77 mg g⁻¹ FW (202,42 %) u Opatovic. Tyto lokality jsou vzájemně statisticky odlišné pouze v rámci jarních sběrů, a to o 2,19 mg g⁻¹ FW (21,36 %). Relativně nejnižší obsah fenolů je patrný u jarního sběru z Opatovic. Extrakt lípy od Naděje není významně rozdílný oproti ostatním vzorkům.



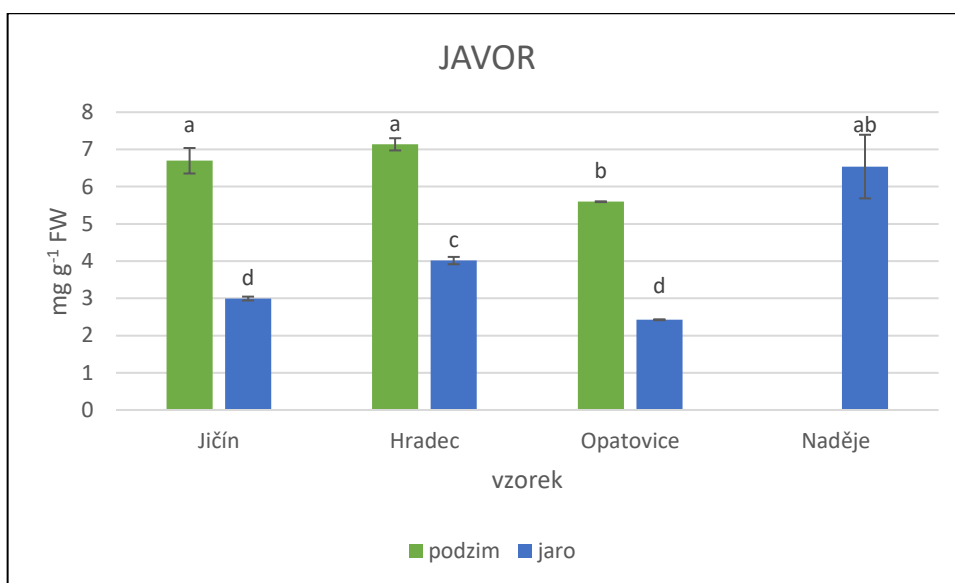
Obrázek 21: Obsah fenolů u jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy

Tabulka 9: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu fenolů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy

LÍPA	podzim	jaro
Hradec	33,0123 ± 0,5434	12,4499 ± 0,4519
Opatovice	31,0245 ± 1,5289	10,2589 ± 0,5622
Naděje	-	11,8125 ± 0,2904

4.1.2 Flavonoidy

Z grafu (Obrázek 22) a Tabulka 10 jsou patrné následující výsledky. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů javoru je vidět u všech lokalit, kde se hodnoty liší o 3,7 mg g⁻¹ FW (123,62 %) u Jičína, 3,12 mg g⁻¹ FW (77,81 %) u Hradce a 3,17 mg g⁻¹ FW (130,78 %) u Opatovic. Mezi lokalitami Hradec a Opatovice je rozdíl v obou sběrech, konkrétně 1,54 mg g⁻¹ FW (27,56 %) u podzimních a 1,59 mg g⁻¹ FW (66,56 %) u jarních. Lokality Jičín a Hradec se liší jenom v jarních sběrech o 1,02 mg g⁻¹ FW (34,05 %), srovnání Jičín/Opatovice přináší rozdíl naopak ve sběrech podzimních, o 1,1 mg g⁻¹ FW (19,67 %). Extrakt javoru od Naděje se liší v porovnání se všemi lokalitami – s Jičínem o 3,55 mg g⁻¹ FW (118,4 %), Hradcem o 2,53 mg g⁻¹ FW (62,92 %) a Opatovicemi o 4,12 mg g⁻¹ FW (169,73 %).

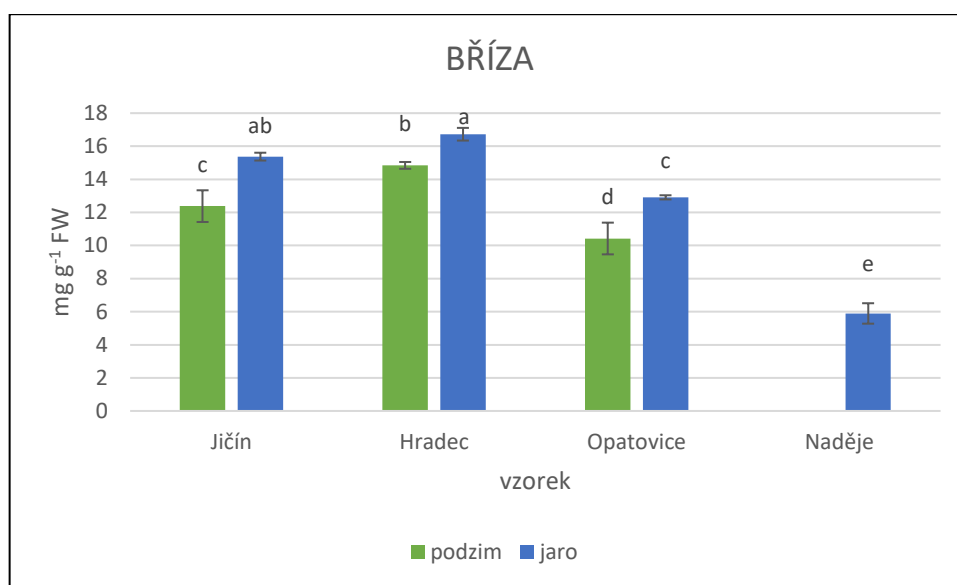


Obrázek 22: Obsah flavonoidů u jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru

Tabulka 10: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu flavonoidů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru

JAVOR	podzim	jaro
Jičín	6,6961 ± 0,3425	2,9944 ± 0,0517
Hradec	7,1373 ± 0,1643	4,0141 ± 0,0984
Opatovice	5,5954 ± 0,0101	2,4246 ± 0,0118
Naděje	-	6,5398 ± 0,8541

Z grafu (Obrázek 23) a Tabulka 11 jsou patrné následující výsledky. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů břízy je vidět u všech lokalit, kde se hodnoty liší o 3 mg g⁻¹ FW (24,17 %) u Jičína, 1,88 mg g⁻¹ FW (12,69 %) u Hradce a 1,24 mg g⁻¹ FW (11,88 %) u Opatovic. Všechny lokality se navzájem statisticky odlišují v rámci podzimních sběrů, Jičín/Hradec o 2,46 mg g⁻¹ FW (19,9 %), Jičín/Opatovice o 1,96 mg g⁻¹ FW (18,77 %) a Hradec/Opatovice o 4,42 mg g⁻¹ FW (42,41 %). Jarní sběry se liší pouze v porovnání lokalit Jičín/Opatovice o 2,46 mg g⁻¹ FW (19,06 %) a Hradec/Opatovice o 3,82 mg g⁻¹ FW (29,55 %). Relativně nejvyšší obsah flavonoidů má jarní sběr z Hradce, signifikantně nejnižší hodnota připadá vzorku břízy od Naděje, která vykazuje rozdíl oproti Jičínu 9,48 mg g⁻¹ FW (160,85 %), Hradci 10,83 mg g⁻¹ FW (183,84 %) a Opatovicím 7,02 mg g⁻¹ FW (199,09 %).

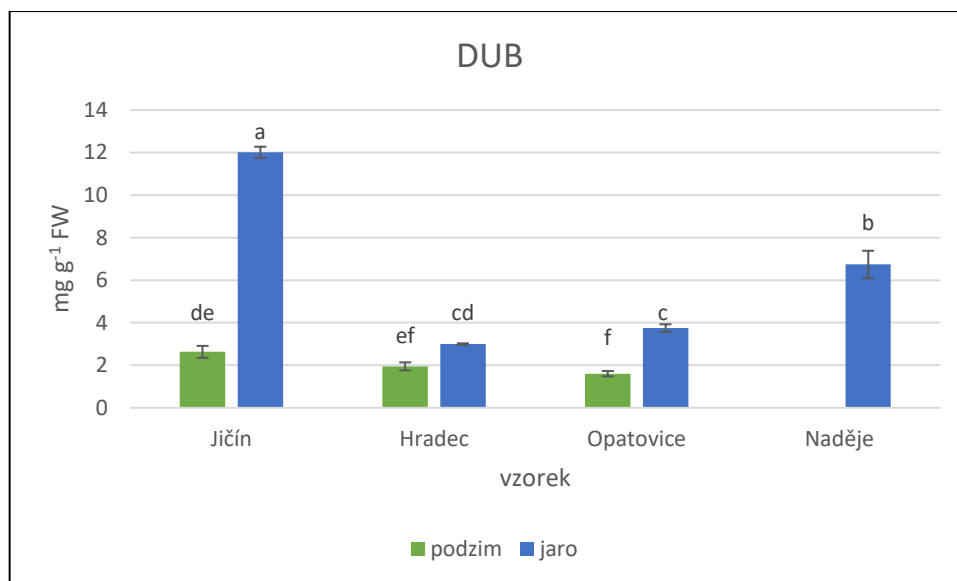


Obrázek 23: Obsah flavonoidů u jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy

Tabulka 11: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu flavonoidů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy

BŘÍZA	podzim	jaro
Jičín	12,3799 ± 0,9582	15,3719 ± 0,2366
Hradec	14,8429 ± 0,2061	16,7263 ± 0,3828
Opatovice	10,423 ± 0,9590	12,9106 ± 0,1263
Naděje	-	5,8929 ± 0,6176

Z grafu (Obrázek 24) a Tabulka 12 jsou patrné následující výsledky. Signifikantní rozdíl mezi podzimním a jarním sběrem pupenů dubu je vidět u všech lokalit, o 9,38 mg g⁻¹ FW (356,57 %) u Jičína, 1,05 mg g⁻¹ FW (53,65 %) u Hradce a 2,15 mg g⁻¹ FW (133,87 %) u Opatovic. Lokality Jičín a Opatovice se liší ve srovnání podzimních sběrů o 1,03 mg g⁻¹ FW (64,06 %) a jarních sběrů o 8,26 mg g⁻¹ FW (220,29 %). Srovnání lokalit Jičín/Hradec přináší rozdíl pouze v jarních sběrech o 9,02 mg g⁻¹ FW (301,23 %). Hradec a Opatovice nejsou významně odlišné. Podzimní vzorek dubu z Opatovic je na flavonoidy relativně nejchudší, signifikantně nejvyšší hodnotu vykazuje jarní vzorek z Jičína. Vzorek od Naděje se liší oproti Jičínu o 5,27 mg g⁻¹ FW (78,24 %), oproti Hradci o 3,75 mg g⁻¹ FW (125,11 %) a oproti Opatovicím o 3 mg g⁻¹ FW (79,7 %).

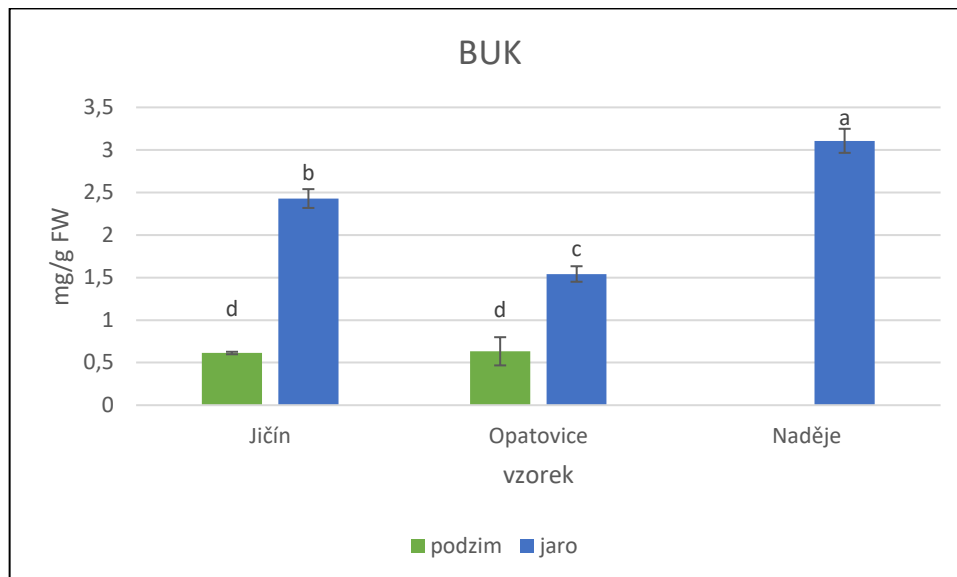


Obrázek 24: Obsah flavonoidů u jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu

Tabulka 12: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu flavonoidů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu

DUB	podzim	Jaro
Jičín	2,6314 ± 0,2806	12,0143 ± 0,2606
Hradec	1,9488 ± 0,1875	2,9944 ± 0,0373
Opatovice	1,6039 ± 0,1260	3,7511 ± 0,1775
Naděje	-	6,7407 ± 0,6435

Z grafu (Obrázek 25) a Tabulka 13 vyplývá následující. Mezi podzimním a jarním sběrem pupenů buku je signifikantní rozdíl 1,82 mg g⁻¹ FW (296,07 %) u Jičína a 0,91 mg g⁻¹ FW (143,42 %) u Opatovic. Lokality se vzájemně liší pouze v jarních sběrech, o 0,89 mg g⁻¹ FW (57,52 %). Nejvíce flavonoidů jednoznačně obsahuje extrakt z buku od Naděje, který se liší od Jičína o 0,68 mg g⁻¹ FW (27,93 %) a od Opatovic o 1,57 mg g⁻¹ FW (101,52 %).

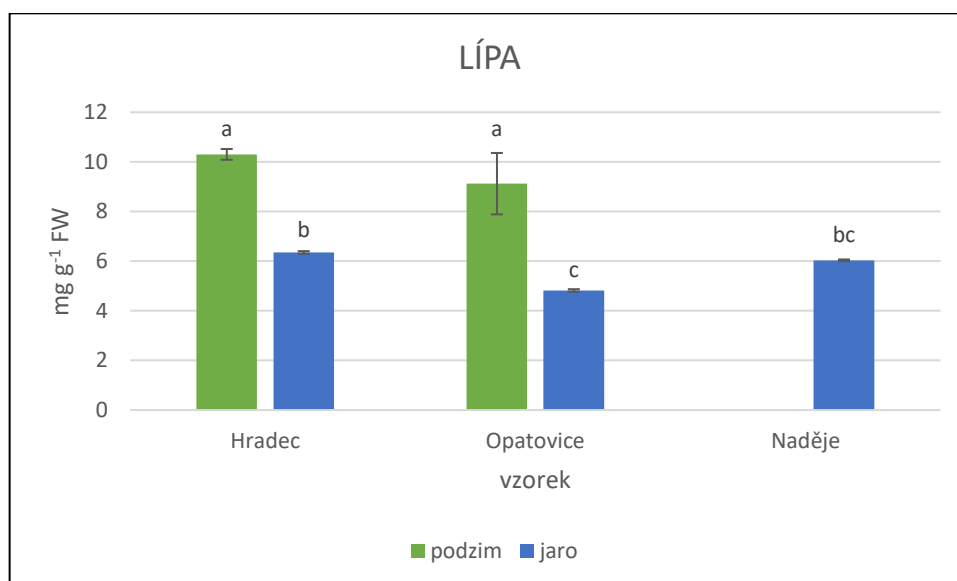


Obrázek 25: Obsah flavonoidů u jednotlivých variant extraktů z pupenů buku

Tabulka 13: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu flavonoidů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů buku

BUK	podzim	jaro
Jičín	0,6132 ± 0,0148	2,4287 ± 0,1106
Opatovice	0,6334 ± 0,1658	1,5418 ± 0,0913
Naděje	-	3,1071 ± 0,1414

Z grafu (Obrázek 26) a Tabulka 14 vyplývá následující. Obsah flavonoidů v extraktech lípy je mezi sběry signifikantně odlišný u obou lokalit, o 3,95 mg g⁻¹ FW (62,23 %) u Hradce a 4,3 mg g⁻¹ FW (89,28 %) u Opatovic. Lokality se liší pouze v jarních sběrech, o 1,53 mg g⁻¹ FW (31,76 %). Mezi extraktem od Naděje a lokalitami není statisticky významný rozdíl.



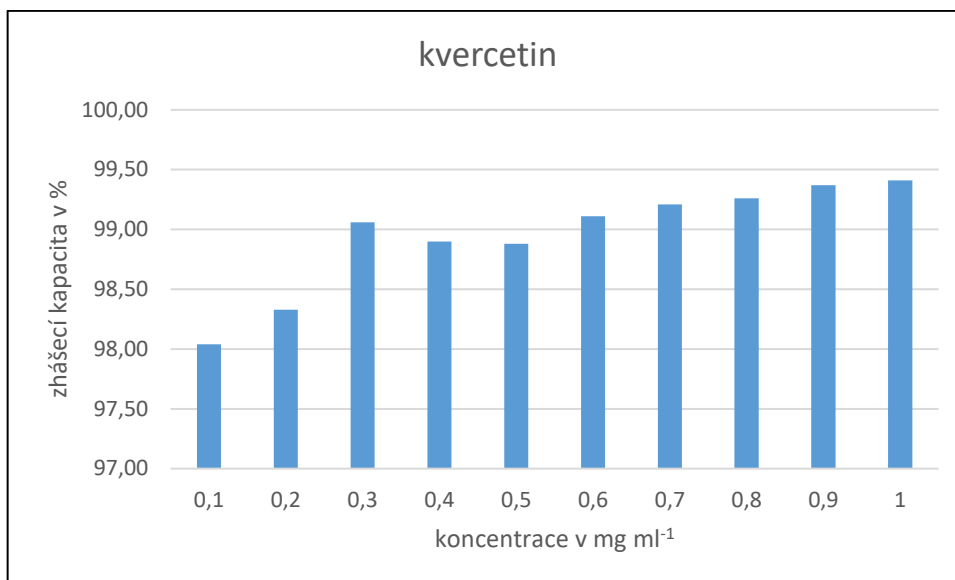
Obrázek 26: Obsah flavonoidů u jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy

Tabulka 14: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) obsahu flavonoidů v mg g⁻¹ FW u jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy

LÍPA	podzim	jaro
Hradec	10,3027 ± 0,2173	6,3506 ± 0,0528
Opatovice	9,1233 ± 1,2372	4,8199 ± 0,0510
Naděje	-	6,0333 ± 0,0355

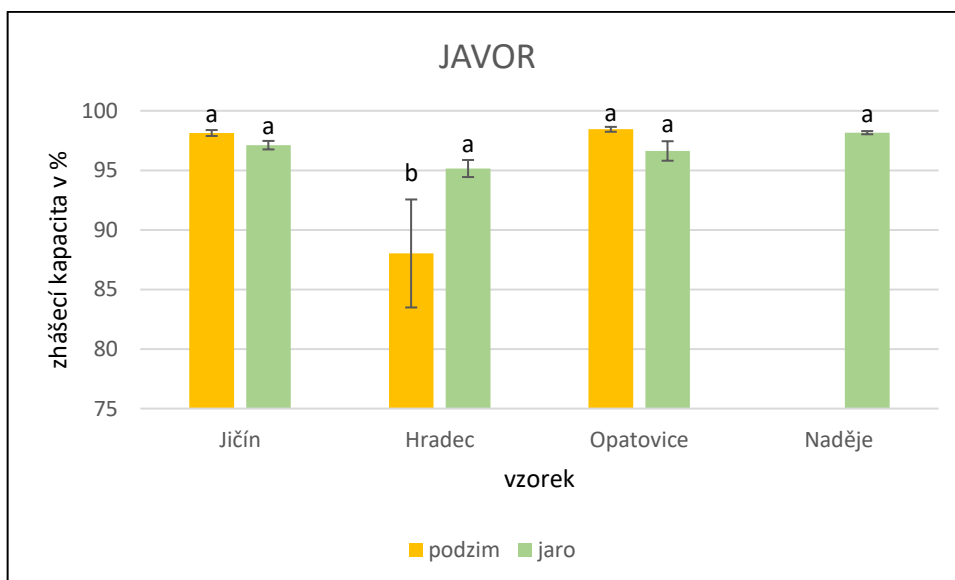
4.2 Zhášení radikálu DPPH

V grafu (Obrázek 27) je znázorněna zhášecí kapacita koncentrační řady kvercetinu, který byl použit jako standard v rámci porovnání s antioxidačními účinky jednotlivých extraktů z pupenů. Nejnižší koncentrace kvercetinu $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ má kapacitu zhášet $98,04 \%$ DPPH, u nejvyšší koncentrace (1 mg ml^{-1}) má zhášecí kapacita hodnotu $99,41 \%$.



Obrázek 27: Kapacita koncentrační řady kvercetinu zhášet radikál DPPH

Z grafu (Obrázek 28) a Tabulka 15 vyplývá následující. Kapacita extraktů z pupenů javoru zhášet radikál DPPH je v rámci Hradce o $7,13 \%$ vyšší u jarního sběru oproti podzimnímu. V rámci podzimních sběrů má Hradec o $10,11 \%$ nižší hodnotu oproti Jičínu a o $10,42 \%$ oproti Opatovicím. Všechny ostatní hodnoty nejsou dále nijak signifikantně rozdílné.



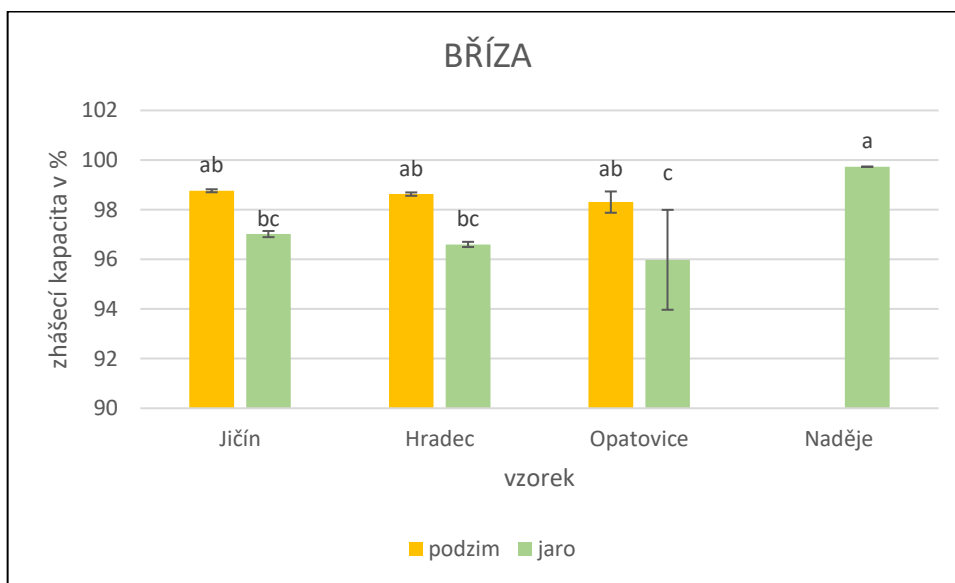
Obrázek 28: Kapacita jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru zhášet radikál DPPH

Tabulka 15: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) procentuální kapacity zhášet radikál DPPH u jednotlivých variant extraktů z pupenů javoru

JAVOR	podzim	jaro
Jičín	$98,1335 \pm 0,2494$	$97,114 \pm 0,3567$

Hradec	88,021 ± 4,5330	95,1523 ± 0,7172
Opatovice	98,4439 ± 0,2044	96,6254 ± 0,8177
Naděje	-	98,162 ± 0,1333

Z grafu (Obrázek 29) a Tabulka 16 vyplývá následující. Kapacita extraktů z pupenů břízy zhášet radikál DPPH je rámci lokality Opatovice signifikantně větší u podzimního sběru oproti jarnímu o 2,32 %, u lokalit Jičín a Hradec jsou si tyto hodnoty podobné. Naděje má v rámci jarních sběrů větší zhášecí kapacitu než všechny ostatní varianty, u lokality Jičín o 2,71 %, u Hradce o 3,13 % a Opatovic o 3,75 %.

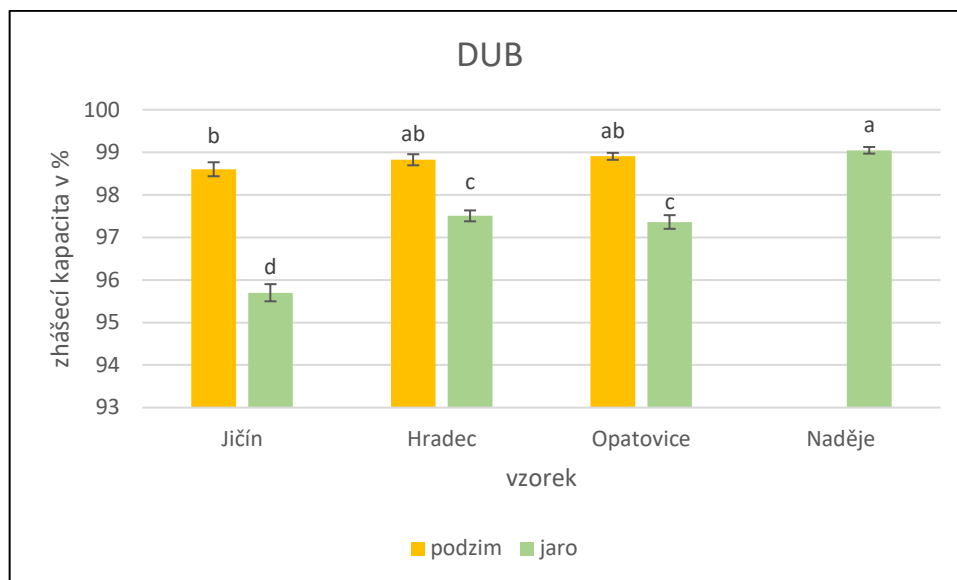


Obrázek 29: Kapacita jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy zhášet radikál DPPH

Tabulka 16: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) procentuální kapacity zhášet radikál DPPH u jednotlivých variant extraktů z pupenů břízy

BŘÍZA	podzim	jaro
Jičín	98,7640 ± 0,0599	97,0197 ± 0,1241
Hradec	98,6287 ± 0,0684	96,6017 ± 0,1046
Opatovice	98,3068 ± 0,4287	95,9822 ± 2,0135
Naděje	-	99,7325 ± 0,0067

Z grafu (Obrázek 30) a Tabulka 17 vyplývá následující. Kapacita extraktů z pupenů dubu zhášet radikál DPPH je větší u podzimního sběru oproti jarnímu o 2,9 % v rámci lokality Jičín o 1,32 % v rámci Hradce a 1,54 % v rámci Opatovic. Rozdíl mezi lokalitami je signifikantní pouze u jarních sběrů, kde je hodnota Jičina menší o 1,81 % oproti Hradci a 1,66 % oproti Opatovicím, lokality Hradec a Opatovice jsou ve srovnání obou sběrů prakticky totožné. Prokazatelně nejmenší kapacitu zhášet radikál DPPH má jarní extrakt dubu z Jičina, relativně nejvyšší má Naděje, jejíž hodnota je větší v porovnání s lokalitou Jičín o 3,35 %, s Hradcem o 1,54 % a Opatovicemi o 1,69 %.

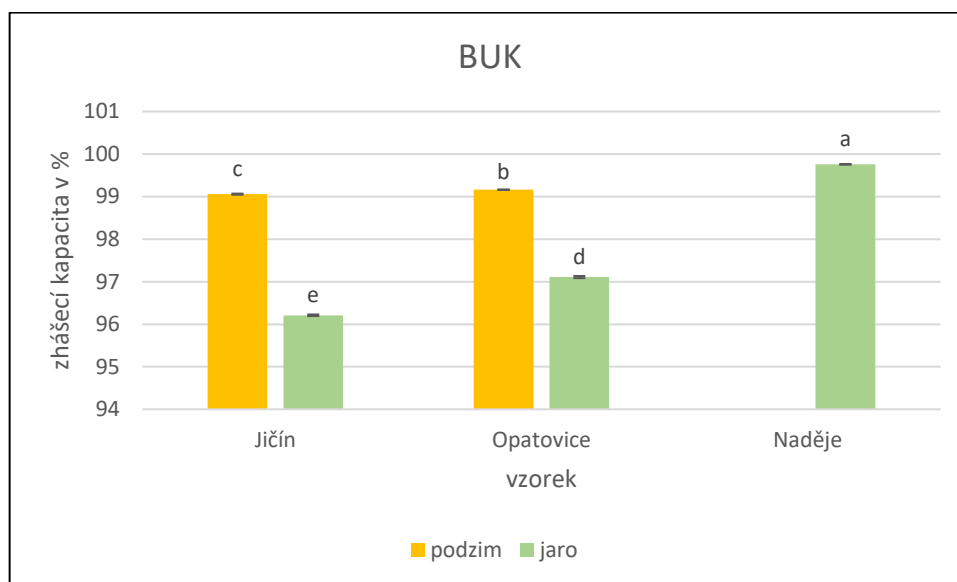


Obrázek 30: Kapacita jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu zhášet radikál DPPH

Tabulka 17: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) procentuální kapacity zhášet radikál DPPH u jednotlivých variant extraktů z pupenů dubu

DUB	podzim	jaro
Jičín	98,6019 ± 0,1646	95,6989 ± 0,2017
Hradec	98,8246 ± 0,1302	97,5061 ± 0,1283
Opatovice	98,9055 ± 0,0822	97,3619 ± 0,1609
Naděje	-	99,0476 ± 0,0778

Z grafu (Obrázek 31) a Tabulka 18 vyplývá následující. Kapacita extraktů z pupenů buku zhášet radikál DPPH je větší u podzimního sběru oproti jarnímu o 2,85 % u lokality Jičín a 2,05 % u Opatovic. V rámci podzimních i jarních sběrů jsou hodnoty z Opatovic větší oproti Jičínu o 0,1, respektive 0,9 %. Nejmenší kapacitu zhášet radikál DPPH má vůči ostatním variantám pupenový extrakt buku z jarního sběru v Jičíně, největší hodnotu naopak vykazuje vzorek od Naděje, který se liší od Jičína o 3,55 % a Opatovic o 2,65 %.

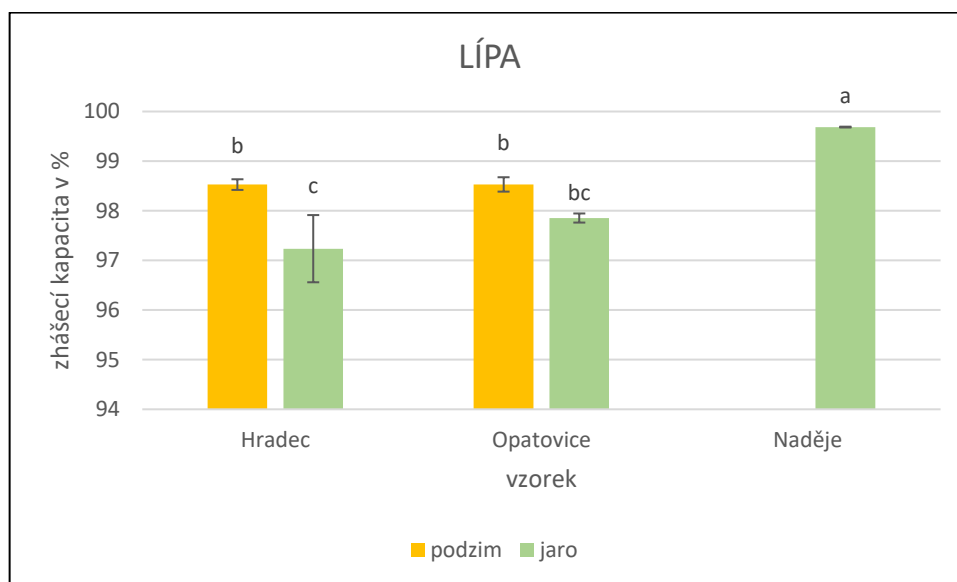


Obrázek 31: Kapacita jednotlivých variant extraktů z pupenů buku zhášet radikál DPPH

Tabulka 18: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) procentuální kapacity zhášet radikál DPPH u jednotlivých variant extraktů z pupenů buku

BUK	podzim	jaro
Jičín	99,0574 ± 0,0132	96,2109 ± 0,0188
Opatovice	99,1619 ± 0,0023	97,1087 ± 0,0253
Naděje	-	99,7577 ± 0,0070

Z grafu (Obrázek 32) a Tabulka 19 vyplývá následující. Zhášecí kapacita extraktů z pupenů lípy je v rámci Hradce u podzimního sběru větší o 1,29 % ve srovnání s jarním, mezi sběry z Opatovic se tato hodnota výrazně neliší. Mezi lokalitami v rámci obou sběrů také není signifikantní rozdíl. Největší kapacitu zhášet radikál DPPH má oproti zbývajícím vzorkům pupenový extrakt lípy od Naděje, který se odlišuje o 2,45 % v případě Hradce a 1,83 % v případě Opatovic.



Obrázek 32: Kapacita jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy zhášet radikál DPPH

Tabulka 19: Průměrné hodnoty (včetně směrodatných odchylek) procentuální kapacity zhášet radikál DPPH u jednotlivých variant extraktů z pupenů lípy

LÍPA	podzim	jaro
Hradec	98,5276 ± 0,1073	97,2366 ± 0,6771
Opatovice	98,5307 ± 0,1449	97,8542 ± 0,0915
Naděje	-	99,6866 ± 0,0084

4.3 Další vyhodnocení

Tabulka 20 ukazuje přepočtené hodnoty fenolů a flavonoidů extraktů od Naděje z jednotek hmotnosti na jednotky objemu.

Tabulka 20: Hodnoty obsahových látek vybraných extraktů z pupenů v mg ml⁻¹

Naděje	javor	bříza	buk	dub	lípa
fenoly	0,2008	0,5123	0,2619	0,2786	0,4109
flavonoidy	0,2274	0,2049	0,1081	0,2345	0,2099

5 Diskuze

5.2 Porovnání obsahových látek a antioxidačních účinků

Nejvyšší hodnoty obsahu fenolů i flavonoidů v extraktech z pupenů jednotlivých stromů byly předpokládány u všech vzorků od firmy Naděje, naopak nejnižší u podzimních sběrů z lokality Opatovice. Byl tedy očekáván sestupný trend směrem od nejkvalitnějšího zdroje pupenů daného stromu k nejvíce znečištěné lokalitě, přičemž u jarních sběrů by se měly objevovat vyšší hodnoty než u podzimních. Stejná hypotéza byla definována u kapacity obsahových látek pupenů zhašet radikál DPPH, byla tedy předpokládána velká zhašecí kapacita díky vysokému obsahu fenolů a flavonoidů.

Nepotvrzené hypotézy (neprůkaznost některých variant) nebo jejich odchylky (viz níže) mohly být způsobeny různými více či méně ovlivnitelnými faktory jako mikroklimatické podmínky daných lokalit (srážky, teplota, substrát, vliv konkurence apod.), nejasné taxonomické určení a původ zkoumaných jedinců (tendence ke křížení, případně poddruhy či odrůdy), větší či menší rozdíly ve fenologii i v rámci druhu (obtížně odhadnutelná ideální doba sběrů) a samotný sběr pupenů včetně další selekce (případně nepřesné navážky).

Výzkum Iery et al. (2015) identifikuje konkrétní fenolické látky zjištěné v komerčně dostupných extraktech z pupenů *Tilia tomentosa* (lípa stříbrná): saponarin, kvercetin (plus (iso)kvercitrin), (hydroxy)apigenin, kaempferol, rutin, hyperosid, astralagin, linarin, akacetin, *cis* a *trans* isomer tilirosidu (vše flavonoidy), kyselina hydroxyskořicová, (neo)chlorogenová a kyseliny *p*-kumarová s kávoovou a jejich deriváty. Autoři zde také uvádí rozsah celkových polyfenolů od 25,5 do 56,5 mg l⁻¹. Peev et al. (2009) zkoumali jarní pupeny stejného druhu pocházející z botanické zahrady v rumunské Kluži a extrahované po dobu deset dní. Obsah celkových polyfenolů měl hodnotu 3,8 mg g⁻¹. Pro porovnání, vzorky *Tilia cordata* (lípa srdčitá) od firmy Naděje zkoumané v této diplomové práci obsahují 410,9 mg l⁻¹ fenolů a 209,9 mg l⁻¹ flavonoidů (dohromady 619,8 mg l⁻¹).

Orodan et al. (2016) uvádí obsahové látky pupenů *Betula pubescens* (bříza pýřitá): kyseliny *p*-kumarová, ferulová a sinapová a dále flavonoidy hyperosid, kvercetin (plus (iso)kvercitrin), rutin, myricetin, luteolin, kaempferol a apigenin. Celkový obsah flavonoidů, resp. polyfenolů v komerčně dostupných extraktech z pupenů tohoto druhu je 16,3 mg ml⁻¹, resp. 19,5 mg ml⁻¹. Hodnoty extraktů z *Betula pendula* (bříza bělokorá) od Naděje jsou 0,2 mg ml⁻¹ pro flavonoidy a 0,5 mg ml⁻¹ pro fenoly (celkem 0,7 mg ml⁻¹).

5.2.1 Fenoly

Žádný extrakt z pupenů od firmy Naděje nevykazoval ve srovnání s ostatními variantami v rámci jednotlivých stromů nejvyšší obsah fenolů, maximální hodnoty dosáhl extrakt z pupenů břízy (14,7 mg g⁻¹ FW). Absolutně nejvyšší obsah fenolů ze všech variant byl zaznamenán u podzimního sběru pupenů javoru v Hradci (75,1 mg g⁻¹ FW). Nejnižší obsah očekávaný v extraktech z podzimních pupenů lokality Opatovice byl potvrzen u buku, kde měl hodnotu 2,9 mg g⁻¹ FW. Jednalo se zároveň o absolutně nejnižší obsah fenolů ze všech variant.

Sestupný obsah fenolů byl viditelný pouze v rámci lokalit (mimo extraktů od Naděje). Buk vykazoval pokles hodnot v pořadí jaro-Jičín (29,2 mg g⁻¹ FW) > jaro-Opatovice (10,9 mg g⁻¹

FW) > podzim-Jičín (3,9 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Opatovice (2,9 mg g⁻¹ FW), hodnoty dubu klesaly v pořadí jaro-Jičín (28,4 mg g⁻¹ FW) > podzim-Jičín (21,9 mg g⁻¹ FW) ~ jaro-Opatovice (20 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Hradec (18,9 mg g⁻¹ FW) > jaro-Hradec (14,5 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Opatovice (14,06 mg g⁻¹ FW). Při porovnávání dvou po sobě jdoucích variant bylo použito znaménko „>“ (signifikantně vyšší hodnota) nebo „~“ (signifikantně podobná hodnota). Popsané výstupy zhruba odpovídají hypotéze o závislosti obsahu fenolů na kvalitě pupenů a jejich vyšším obsahu u jarních sběrů oproti podzimním. Objevil se výkyv v rámci intermediální lokality Hradec, kde byla podzimní varianta dubu posunuta k nižším hodnotám škály.

Signifikantně vyšší obsah fenolů v jarních pupenech oproti podzimním byl zjištěn u břízy z Hradce a Opatovic, kde rozdíl mezi sběry činil 18,4 mg g⁻¹ FW (61,2 %) a 10 mg g⁻¹ FW (29,4 %). Dalším takto potvrzeným stromem byl dub z Jičína a Opatovic, kde se hodnoty lišily o 6,5 mg g⁻¹ FW (29,5 %) a 6 mg g⁻¹ FW (42,3 %), a buk z obou lokalit s rozdílem 25,3 mg g⁻¹ FW (652,1 %) u lokality Jičín a 8 mg g⁻¹ FW (276,4 %) u Opatovic.

5.2.2 Flavonoidy

Nejvyšší obsah flavonoidů v extraktech z pupenů od firmy Naděje v porovnání ostatních variant v rámci jednotlivých stromů vykazoval buk s hodnotou 3,1 mg g⁻¹ FW. Extrakt od Naděje zaznamenal vysokou hodnotu (6,5 mg g⁻¹ FW) také mezi podzimními variantami javoru, od kterých se signifikantně nelišil. Absolutně nejvyšší obsah flavonoidů ze všech variant byl zaznamenán u jarního sběru pupenů břízy v Hradci (16,7 mg g⁻¹ FW). Nejnižší obsah flavonoidů očekávaný v extraktech z podzimních pupenů lokality Opatovice byl potvrzen pouze u dubu, kde měl hodnotu 1,6 mg g⁻¹ FW. Absolutně nejnižší obsah flavonoidů vykazují statisticky navzájem podobné podzimní sběry buku z Opatovic (0,63 mg g⁻¹ FW) a Jičína (0,61 mg g⁻¹ FW).

Sestupný obsah fenolů v rámci všech variant byl viditelný u buku, kde hodnoty klesaly v pořadí Naděje (3,1 mg g⁻¹ FW) > jaro-Jičín (2,4 mg g⁻¹ FW) > jaro-Opatovice (1,5 mg g⁻¹ FW) > podzim-Opatovice (0,63 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Jičín (0,61 mg g⁻¹ FW). Pokles hodnot v rámci lokalit samotných (mimo extraktu od Naděje) vykazoval dub v pořadí: jaro-Jičín (12 mg g⁻¹ FW) > jaro-Opatovice (3,8 mg g⁻¹ FW) ~ jaro-Hradec (3 mg g⁻¹ FW) > podzim-Jičín (2,6 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Hradec (1,9 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Opatovice (1,6 mg g⁻¹ FW) a bříza v pořadí jaro-Hradec (16,7 mg g⁻¹ FW) ~ jaro-Jičín (15,4 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Hradec (14,8 mg g⁻¹ FW) > jaro-Opatovice (12,9 mg g⁻¹ FW) ~ podzim-Jičín (12,4 mg g⁻¹ FW) > podzim-Opatovice (10,4 mg g⁻¹ FW). Popsané výstupy zhruba odpovídají hypotéze o závislosti obsahu fenolů na kvalitě pupenů a jejich vyšším obsahu u jarních sběrů oproti podzimním. Objevily se následující výkyvy. Podzimní sběr buku z Jičína dosáhl minima ve svém souboru hodnot. Oba sběry dubu z Hradce byly posunuty k vyšším hodnotám škály, stejně jako oba vzorky břízy z téže lokality.

Signifikantně vyšší obsah flavonoidů v jarních pupenech oproti podzimním u všech lokalit vykazovaly následující vzorky. Rozdíl hodnot u břízy činil v Jičíně 3 mg g⁻¹ FW (24,2 %), v Hradci 1,9 mg g⁻¹ FW (12,7 %) a v Opatovicích 1,2 mg g⁻¹ FW (11,9 %). Dub se lišil v Jičíně o 9,4 mg g⁻¹ FW (356,6 %), v Hradci o 1,1 mg g⁻¹ FW (53,7 %) a v Opatovicích o 2,2 mg g⁻¹ FW (133,9 %) a buk v Jičíně o 1,8 mg g⁻¹ FW (296,1 %), v Opatovicích o 0,9 mg g⁻¹ FW (143,4 %).

5.2.3 Zhášení radikálu DPPH

Signifikantně největší zhášecí kapacitu extraktů z pupenů od firmy Naděje v porovnání ostatních variant v rámci jednotlivých stromů vykazovaly bříza (99,7 %), dub (99 %), buk (99,8 %) a lípa (99,7 %). Velkou kapacitu vykazoval také vzorek javoru (98,2 %), který byl s ostatními jarními variantami statisticky podobný. Maximální hodnoty v rámci extraktů ze studovaných lokalit dosahoval paradoxně vzorek podzimních pupenů buku z lokality Opatovice (99,2 %). Signifikantně nejmenší kapacitu nevykazoval naopak žádný strom v rámci podzimních sběrů v Opatovicích. Absolutně nejnižší hodnotu měl podzimní sběr javoru z Hradce (88 %).

Hypotéza poklesu zhášecí kapacity podle kvality pupenů nebyla signifikantně potvrzena u žádného ze studovaných stromů.

Signifikantně větší zhášecí kapacita jarních pupenů oproti podzimním byla zjištěna pouze u javoru z Hradce, kde rozdíl hodnot činil 7,1 %. Sběry ostatních lokalit téhož stromu byly vzájemně statisticky podobné, stejně jako varianty břízy z lokalit Jičín a Hradec a také lípy z Opatovic.

5.3 Možnosti domácí přípravy gemmoterapeutik

Příprava extraktů z pupenů byla naprostým základem praktické části této práce a přímo vycházela z knihy Zentricha (2007), kde jsou uvedeny základní principy výroby extraktů od firmy Naděje, které zde byly zkoumány. Existuje množství různých modifikací těchto postupů, které jsou dostupné v literatuře (např. Adrienne, 2007; Hubele, 2016). Přestože příprava extraktů jako taková byla za použití základních odměrných nádob velmi snadná, pro kvalitu výsledného produktu je zásadní zdroj použitých pupenů. Ty by měly pocházet z lokalit nejméně dotčených jakoukoli environmentální zátěží. Nezáleží tedy na prostředí výroby gemmoterapeutik, jako spíše na životním prostředí rostlin s léčivými účinky.

6 Závěr

Vliv kvality zdroje pupenů na jejich obsahové látky a antioxidační účinky byl potvrzen specifickým rozložením hodnot obsahu flavonoidů v případě buku, dubu a břízy, stejně tak rozsahem hodnot v rámci fenolů u vzorků buku a dubu. Tuto hypotézu navíc potvrdil nejnižší obsah fenolů v podzimním vzorku buku z Opatovic, poté nejvyšší obsah flavonoidů v extraktu od firmy Naděje (taktéž z pupenů buku) a také největší kapacita zhášet radikál DPPH u všech vzorků od Naděje.

Hodnoty břízy, dubu a buku ze všech studovaných lokalit potvrzují vyšší obsah flavonoidů v pupenech sbíraných na jaře. Podobně extrakty břízy z Hradce a Opatovic, dubu z Jičina a Opatovic a buku z obou jeho lokalit potvrzují vyšší obsah fenolů v jarních sběrech oproti podzimním.

Pokud by srovnání této práce s výzkumem Iery et al. (2015) bylo skutečně vypovídající, extrakt z pupenů lípy srdčité od Naděje by měl více než desetkrát vyšší obsah celkových fenolů a flavonoidů než je tomu u lípy stříbrné a dokonce více než 200x vyšší obsah oproti stejnému druhu studovaném Peev et al. (2009). Naopak ve srovnání obsahu fenolických látek břízy pýřité (Orodan et al., 2016) a bělokoré od Naděje, vykazuje extrakt zkoumaný v této práci mnohonásobně nižší hodnoty.

Z výsledků vyplývá, že celkový obsah fenolů a flavonoidů extraktů vybraných stormů téměř neměl vliv na jejich atioxidační kapacitu zkoumanou v této práci. Je tedy možné, že radikál DPPH je zhášen specificky pomocí konkrétních fenolických látek či jejich skupin, které nemusely být ve vzorcích přítomny a jejichž přesná identifikace nebyla předmětem experimentu.

Výše uvedené srovnávací studie jsou příkladným nástrojem k objasnění dosud ne zcela vysvětlených souvislostí mezi obsahovými látkami a jejich terapeutickými vlastnostmi. Doprovodné klinické testy by se měly stát samozřejmostí. Výzkumy, které se zaměřují na podrobný biochemický screening extraktů z pupenů a analýzy jejich schopnosti zhášet různé radikály, jsou nezbytným předpokladem k poznání principů antioxidačních i dalších účinků gemmoterapeutik.

Seznam použité literatury

- Adlercreutz H. et Mazur W., 1997: Phyto-oestrogens and western diseases. – *Ann. Med.*, 29 (2): pp. 95-120.
- Adrienne P., 2007: Velká kniha gemmoterapie. Fontána, Olomouc: pp. 262.
- Ahmad N. et Mukhtar H., 1999: Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr. Rev.*, 57: pp. 78-83.
- Ahok P. K. et Upadhyaya K., 2012: Tannins are Astringent. – *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 1 (3): pp. 45-50.
- Ahuja I. et al., 2013: Phytoalexins in defence against pathogens. – *Trends Plant Sci.*, 17 (2): pp. 73-90.
- Allio A. et al., 2015: Bud extracts from *Tilia tomentosa* Moench inhibit hippocampal neuronal firing through GABAA and benzodiazepine receptors activation. – *J. Ethnopharmacol.*, 172: pp. 288-296.
- An L. et al., 2008: The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang up-regulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. – *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 32: pp. 1484-1490.
- Anand P. et Singh B., 2013: A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. – *Arch. Pharm. Res.*, 36 (4): pp. 375-399.
- Andersen O. M. et Markham K. R., 2006: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications. – *Angewandte Chemie*, 118 (41): pp. 6939-6941.
- Anu S. et al., 2018: Health Benefits of Polyphenolic Compounds. – *Indo Am. J. Pharm. Sci.*, 5 (11): pp. 11564-11569.
- Arbab I. A. et al., 2011: *Clausena excavata* Burm. f. (*Rutaceae*): A review of its traditional uses, pharmacological and phytochemical properties. *J. Med. Plants Res.*, 5 (33): pp. 7177-7184.
- Arena A. et al., 2007: Antiviral and Immunomodulatory Effect of a Lyophilized Extract of *Capparis spinosa* L. Buds. – *Phytother. Res.*, 22 (3): pp. 313-317.
- Arts I. C. et al., 2000: Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods. – *J. Agric. Food Chem.*, 48 (5): pp. 1746-1751.
- Barlass M. et al., 1987: Development of Methods for Screening Grapevines for Resistance to Infection by Downy Mildew. II. Resveratrol Production. – *Am. J. Enol. Viticul.*, 38 (1): pp. 65-68.
- Basile A. et al., 2009: Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (*Apiaceae*). – *Molecules*, 14: pp. 939-952.
- Bent S. et Ko R., 2004: Commonly used herbal medicines in the United States: A review. –

Am. J. Med., 116: pp. 478-85.

BIOOO.CZ s.r.o., 2020: Buk lesní (*Fagus sylvatica*) [online]. [cit. 30. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://encyklopedie.bioooo.cz/vyhledat-slozeni/buk-lesni-fagus-sylvatica/?>>.

Bonerz D. et al., 2006: Analytical characterization and the impact of ageing in anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. – Eur. Food Res. Technol., 224: pp. 355-364.

Bourgaud F. et al., 2006: Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. – Phytochem. Rev., 5: pp. 293-308.

Brand-Williams W. et al., 1995: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. – Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie, 28: pp. 25-30.

Bravo L., 1998: Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. – Nutr. Rev., 56: 317-333.

Brown D. E. et al., 2001: Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. – Plant Physiol., 126: pp. 524–535.

Bruneton J., 1999: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants. 2nd ed., Intercept, Hampshire (England): pp. 1119.

Buer C. S. et Muday G. K., 2004: The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. – Plant Cell, 16: pp. 1191–1205.

Bylinná lékárna v Plzni, 2020: Dub letní (*Quercus robur*) [online]. [cit. 28. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.bylinnalekarna.cz/dub-letni-quercus-robur>>.

Cadahía E. et al., 2014: Non-targeted Metabolomic Profile of *Fagus Sylvatica* L. Leaves using Liquid Chromatography with Mass Spectrometry and Gas Chromatography with Mass Spectrometry. – Phytochem. Analysis, 26 (2): pp. 171-182.

Cermak R. et Wolffram S., 2006: The Potential of Flavonoids to Influence Drug Metabolism and Pharmacokinetics by Local Gastrointestinal Mechanism. – Curr. Drug Metab., 7 (7): pp. 729-744.

Cetkovic G. S. et al., 2007: Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *Satureja montana* L., subsp. *Kitaibelli* extracts. – Int. J. Mol. Sci., 8: pp. 1013-1026.

Cieśla P. et Michniewska A., 2013: Wpływ wybranych związków chemicznych na organizmy żywe. Uniwersytet Pedagogiczny, Instytut Biologii, Kraków: pp. 103.

Clifford M. N., 2000: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. – J. Sci. Food Agric., 80 (7): pp. 1033-1043.

Crespy V. et Williamson G., 2004: A review of the health effects of green tea catechins *in vivo* animal models. – J. Nutr., 134 (12): pp. 3431-3440.

Cornwell T. et al., 2004: Dietary phytoestrogens and health. – Phytochemistry, 65 (8): pp. 995–1016.

- Čopíková J., 1999: Technologie čokolády a cukrovinek. 1. vyd., VŠCHT, Praha: pp. 168.
- da Silva I. et al., 2013: Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. – J. Pharm. Biomed. Anal., 73: pp. 44-52.
- Davalos A. et al., 2006: Quercetin is bioavailable from a single ingestion of grape juice. – Int. Food Sci. Nutr., 57: pp. 391-398.
- Dhankhar S. et al., 2011: *Aegle marmelos* (Linn.) Correa: A potential source of Phytomedicine. – J. Med. Plants Res., 5 (9): pp. 1497-1507.
- Dimmock J. R. et al., 1999: Bioactivities of chalcones. – Curr. Med. Chem., 6 (12): pp. 1125-1149.
- Donno D. et al., 2015: Bud Extracts as New Phytochemical Source for Herbal Preparations – Quality Control and Standardization by Analytical Fingerprint. In: Venket A. et al. (eds.): Phytochemicals: Isolation, Characterisation and Role in Human Health. pp. 187-218.
- Dudek-Makuch M. et Matławska I., 2013: Coumarins in horse chestnut flowers: isolation and quantification by UPLC method. – Acta Pol. Pharm., 70 (3): pp. 517-522.
- Dudonné S. et al., 2011: Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Poplar Bud (*Populus nigra*) Extract: Individual Antioxidant Contribution of Phenolics and Transcriptional Effect on Skin Aging. – J. Agric. Food Chem., 59: pp. 4527-4536.
- Dvaranauskaite A. et al., 2008: Characterization of steam volatiles in the essential oil of black currant buds and the antioxidant properties of different bud extracts. – J. Agric. Food Chem., 56: pp. 3279-3286.
- Eichhorn S. et Winterhalter P., 2005: Anthocyanins from pigmented potato. – Food Res. Int., 38 (8-9): pp. 943-948.
- EMA (European Medicinal Agency), HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products): Assessment report on *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, radix [online]. [cit. 7. 5. 2020]. Dostupné z WWW: <www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-HMPC_assessment_report/2013/11/WC500155549.pdf>.
- Ercoli A., 2002: Clinica medica in fitogemmoterapia e omeopatia. Tecniche Nuove, Milán: pp. 275.
- Firenzuoli F., 2009: Interazioni tra erbe, alimenti e farmaci. Tecniche Nuove, Milán: pp. 360.
- Flémond L., 2000: Biological effects of resverarol. – Life Sciences, 66(8): pp. 663-673.
- Frankel E. N. et al., 1995: Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. – J. Agric. Food Chem. 43: pp. 890-894.
- Gencel V. et al., 2012: Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. – Mini-Rev. Med. Chem., 12: pp. 149-174.
- Gerritsen M. E. et al., 1995: Flavonoids inhibit cytosine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. – Am. J. Pathol., 147 (2): pp. 278-292.

- Harborne J. B., 2000: Advances in flavonoid research since 1992. – *Phytochemistry*, 55 (6): pp. 481-504.
- Herboplanet, The alchemical-spagyric phytotherapy, 2020: MSA *Acer campestre* – buds (Field Maple) [online]. [cit. 27. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.herboplanet.eu/en/p/109/acer-campestre-buds-field-maple->>.
- Herboplanet, The alchemical-spagyric phytotherapy, 2020: MSA *Betula verrucosa* – buds (White Birch) [online]. [cit. 27. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.herboplanet.eu/en/p/114/betula-verrucosa-buds-white-birch->>.
- Herboplanet, The alchemical-spagyric phytotherapy, 2020: MSA *Quercus pedunculata* - buds (Oak or Pedunculata oak) [online]. [cit. 28. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.herboplanet.eu/en/p/134/quercus-pedunculata-buds-oak-or-pedunculata-oak->>.
- Hertog M. G. L., 1998: Flavonols in wine and tea and prevention of coronary heart disease. – In: 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux (France). Polyphenols 96, Colloques De l'INRA, 87: pp. 117–131.
- Higdon J. V., 2003: Tea catechins an polyphenol: Heath effects, metabolit, and antioxidant function. – *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43 (1): pp. 89-143.
- Hubele L., 2016: Gemmotherapy for everyone – an introduction to acute care. Emryss, pp. 128.
- Hussain, H. et al., 2012: The chemistry and biology of bicoumarins. – *Tetrahedron.*, 68: pp. 2553-2578.
- Hyun A. J. et al., 2008: Re-evaluation of the Antioxidant Prenylated Flavonoids from the Roots of *Sophora flavescens*. – *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 31: pp. 908-915.
- IBA MUNI (Institut biostatistiky a analýz Masarickovy univerzity) [online]. [cit. 6. 5. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://telemedicina.med.muni.cz/pdm/detske-infekcni-lekarstvi/index.php?pg=vyukove-texty--alimetarni-nakazy--virove-alimentarni-nakazy-bez-prujmu--coxsackie-viry>>.
- Iery F. et al., 2015: Phenolic composition of “bud extracts” of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M. – *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 115: pp. 1-9.
- Jahodář L., 2010: Léčivé rostliny v současné medicíně. Havlíček Brain Team, Praha: pp. 233.
- Jahodář L., 2011: Farmakobotanika – semenné rostliny. 1. vyd., Karolinum, Praha: pp. 278.
- Jeandet P. et al., 1995: Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. – *J. Agric. Food Chem.*, 50: pp. 2731-2741.
- Jeandet P. et al., 2013: Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. – *Int. J. Mol. Sci.*, 14: pp. 14136-14170.
- Juneja L. R. et al., 2013: Green tea polyphenols: nutraceuticals of modern life. 1st edition, CRC Press, Boca Raton: 362 pp.

- Kamal S. et al., 2014: Mineral profile, antioxidant and antimicrobial activities of gemm *Foeniculum vulgare*. – *Current Biotica*, 8 (2): pp. 111-124.
- Karabín M. et al., 2012: Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. – *Chem. Listy*, 106: pp. 1095-1103.
- Khan N. et Mukhtar H., 2007: Tea polyphenols for health promotion. – *Life Sci.*, 81 (7): pp. 519-533.
- Kimura Y. et Okuda H., 1997: Histamine-release effectors from *Angelica dahurica* var. *dahurica* root. – *J. Nat. Prod.*, 60 (3): pp. 249-251.
- King A. et Young G., 1999: Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. – *J. Am. Diet Assoc.*, 99 (2): pp. 213-218.
- Kivrak Ş. et al., 2017: Determination of Phenolic Composition of *Tilia tomentosa* Flowers Using UPLC-ESI-MS/MS. – *Int. J. Sec. Metabolite*, 4 (3): pp. 249-256.
- Kong J. M. et al., 2003: Analysis and biological actives of anthocyanins. – *Phytochemistry*, 64 (5): pp. 923-933.
- Konoshima T. et al., 1991: Studies on Inhibitors of Skin Tumor Promotion, IX. Neolignans from *Magnolia officinalis*. – *J. Nat. Prod.*, 54 (3): pp. 816-822.
- Korbelář J. et al., 1981: Naše rostliny v lékařství. 4. vyd., Avicenum, Praha: pp. 504.
- Kosieradzka I. et al., 2004: Transgenic potato tubers as source of phenolic compounds. Localizations of anthocyanins in the epidermis. – *Anim. Feed Sci.*, 13 (2): pp. 87-92.
- Kroon P. A. et al., 1997: Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. – *J. Agric. Food Chem.*, 45: pp. 661-667.
- Kuzel T. M. et al., 1992: Suppression of anti-interferon alpha-2a antibody formation in patients with mycosis fungoides by exposure to longwave UV radiation in the A range and methosalen ingestion. – *J. Natl. Cancer Inst.*, 84 (2): pp. 119-121.
- LEROS, 2020: Bříza bělokorá [online]. [cit. 27. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.leros.cz/briza-belokora>>.
- LEROS, 2020: Dub letní [online]. [cit. 27. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.leros.cz/dub-letni>>.
- Li W. et al., 2013: Coumarins and Lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and Their Anticancer Activities. – *J. Agric. Food Chem.*, 61 (45): pp. 10730-10740.
- Liu S. et al., 2005: Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. – *Biochim. Biophys. Acta*, 1723 (1-3): pp. 270-281.
- Luštinec J. et Žárský V., 2003: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Karolinum, Praha: pp. 261.
- Mao et al., 2015: Synthesis, biological activities and therapeutic properties of esculetin and its derivatives. – *J. Chem. Pharm. Res.*, 7 (4): pp. 122-130.

Manach C. et al., 2004: Polyphenols: food sources and bioavailability. – Am. J. Clin. Nutr., 79 (5): pp. 727-747.

Militaru A. V. et al., 2010: Plant Extracts from Meristematic Tissues (Foliar Buds and Shoots): Antioxidant and Therapeutic Action. – Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii, 20 (3): pp. 45-47.

Milota Energie života, 2020: Dub letní kůra 50g Quercus robur L. et petraea cortex cons. [online]. [cit. 30. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.milota.com/eshop/p/dub-letni-kura-50g-quercus-robur-l-et-petraea-cortex-cons-0-7446>>.

Moghaddam M. G. et al., 2012: Biological activity of betulinic acid: a review. Pharmacol. Pharm., 3: pp. 119-123.

Musilová L. et al., 2012: Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. – Chem. listy, 106: pp. 1029-1033.

Naděje, Mgr. Jarmila Podhorná, 2020: Bříza - tinktura z pupenů 50 ml [online]. [cit. 30. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.milota.com/eshop/p/dub-letni-kura-50g-quercus-robur-l-et-petraea-cortex-cons-0-7446>>.

Neacșu M. C. et al., 2002: HPLC separation systems of flavonoids from buds of diverse medicinal plants. – Buletinul USAMV-CN, 57: pp. 45-51.

Oliveira B. G. et al., 2016: Chemical profile of mango (*Mangifera indica* L.) using electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS). – Food Chem., 204: pp. 37-45.

Opletal L. et al., 2013: Antioxidanty a degenerativní onemocnění. – Prakt. lékáren., 9 (3): pp. 135-138.

Opletalová V. et al., 2000: Chalcones and their heterocyclic analogues as potential medicaments. – Folia Pharm. Univ. Carol., 25: pp. 21-33.

Ordoñez A. A. L. et al., 2006: Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. – Food Chem., 97 (3): pp. 452-458.

Orodan M. et al., 2016: Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant effect of some gemmotherapeutic remedies used in respiratory diseases. – Farmacia, 64 (2): pp. 224-230.

Othman A. et al., 2007: Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. – Food Chem., 100 (4): pp. 1523-1530.

Parr A. J. et Bowlel G. P., 2000: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutriti-onal enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. – J. Sci. Food Agric., 80: pp. 985-1012.

Passwater R. A., 2002: O Antioxidantech. Pragma, Praha: pp. 94.

Patil P. O. et al., 2013: A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease. – Bioorg.Med. Chem. Lett., 21 (9): pp. 2434-2450.

- Paulová H. et al., 2004: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. – Chem. Listy, 98: pp. 174-179.
- Peev C. et al., 2007: Determination of some polyphenolic compounds in buds of *Alnus* and *Corylus* species by HPLC. – Chem. Natur. Comp., 43: pp. 259-262.
- Peev C. et al., 2009: *Tilia tomentosa* foliar bud extract: Phytochemical analysis and dermatological testing. – Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii, 19 (1): pp. 163-165.
- Phytochemical Interactions DB, 2020: *Betula pendula* [online]. [cit. 28. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <https://www.genome.jp/db/pcidb/kna_species/42>.
- Podhorná J., 2007: Pupeny léčí: gemmoterapie – medicína 3. tisíciletí. Naděje (Erika), 2. rozš. vyd., Praha: pp. 128.
- Raičiu A. D. et al., 2010: Antimicrobial activity of *Ribes nigrum*, *Rosmarinus officinalis*, *Betula pubescens*, *Salix alba*, *Vaccinium myrtillus* gemoderivatives. – Farmacia, 58: pp. 735-747.
- Rajdlová M., 2008: Analýza obsahových látek květů *Acer platanoides* L. – Ms. 61 pp. [Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové].
- Re R. et al., 2014: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. – Free Radic. Biol. Med., 26: pp. 1231-1237.
- Reynaud J. et al., 2005: Isoflavonoids in non-leguminous families an update. – Nat. Prod. Rep., 22: pp. 504–515.
- Rice-Evans C. A. et al., 1996: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med., 20: pp. 933–56.
- Robak J. et Gryglewski R. J., 1988: Flavonoids Are Scavengers of Superoxide Anions. – Biochem. Pharmacol. 37 (5): pp. 837-841.
- ROOTS ...časopis s kořeny, 2020: Lípa malolistá (*Tilia cordata*) [online]. [cit. 29. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <<https://www.casopisroots.cz/lipa-malolista/>>.
- Rzodkiewicz et al., 2015: Antinociceptive properties of esculetin in non-inflammatory and inflammatory models of pain in rats. – Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 42 (2): pp. 213-219.
- Saleem M., 2009: Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpen. – Cancer Lett., 285 (2): pp. 109-115.
- Salvia Paradise Shop, 2020: Lípa srdčitá – *Tilia cordata* [cit. 28. 7. 2020]. Dostupné z WWW: <https://www.salviaparadise.cz/herbar-rostlin-lipa-srdcita-tilia-cordata-c-736_1181.html>.
- Scalbert A. et Williamson G., 2000: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. – Am. J. Clin. Nutr., 130 (8): pp. 2073-2085.
- Sen-Utsukarci B. et al., 2020: Pharmacognostical Studies on *Acer campestre* L. subsp. *campestre*. – Int. J. Second. Metab., 7 (2): pp. 126-138.

- Singleton V. L. et Rossi J., 1965: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. – Am. J. Enol. Viticul., 16 (3): pp. 144-158.
- Slanina J., 2000: Biologická a farmakologická aktivita lignanů. – Chem. listy, 94: pp. 111-116.
- Smith C. J., 1996: Tansley Review No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. – New Phytol., 132 (1): pp. 1-45.
- Stich H. F., 1991: The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. – Mutat. Res./Gen. Tox., 259 (3-4): pp. 307-324.
- Sujak A. et al., 2006: Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds.: Food Chem., 98: pp. 711-719.
- Sunnerheim K. et al., 1988: Chemical defense in birch. Platyphylloside: A phenol from *Betula pendula* inhibiting digestibility. – J. Chem. Ecol., 14: pp. 549-560.
- Šiler B. et al., 2014: Centauries as underestimated food additives. Antioxidant and antimicrobial potential. – Food Chem., 147: pp. 367-376.
- Štípek S. et al., 2000: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vyd., Grada Publishing, Praha: pp. 320.
- Tabart C. et al., 2006: Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar. – J. Agric. Food Chem., 54: pp. 6271-6276.
- Tanase C. et al., 2019: Biological and Chemical Insights of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Bark: A Source of Bioactive Compounds with Functional Properties. – Antioxidants, 8 (9), 417: pp. 14.
- Terra et al., 2009: Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. – J. Nutr. Biochem., 20: pp. 210-218.
- Tetau M., 2013: Nové léčebné postupy v gemmoterapii. 1. přepracované vydání, Walker, Prostějov: pp. 93.
- Toker G. et al., 2004: Flavonoids of *Tilia argentea* DESF. ex DC. Leaves. – Turk. J. Chem., 28: pp. 745-749.
- Tomko J. et al., 1999: Farmakognózia. 2. vyd., Osveta, Martin: pp. 422.
- Urquiaga I. et Leighton F., 2000: Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. – Biological research, 33: pp. 55-64.
- Valentão P. et al., 2001: Antioxidant Activity of *Centaureum erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. – J. Agric. Food Chem., 49 (7): pp. 3476-3479.
- Vardar-Ünlü G. et al., 2008: Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. – World J. Microbiol. Biotechnol., 24: pp. 1011-1017.
- Velíšek J., 2002: Chemie potravin. 2. vyd., OSSIS, Tábor: pp 303.

- Velíšek et Hajšlová, 2009: Chemie potravin I. OSSIS, Tábor: pp. 602.
- Venugopala K. N. et al. 2013: Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. – BioMed Res. Int., 2013: pp. 1-14.
- Wang S. Y. et al., 1987: Metabolic changes associated with bud break induced by thidiazuron. J. Plant Growth Regul., 6: pp. 85-95.
- Wood J. E. et al., 2002: Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. – Food Chem., 77: pp. 155-161.
- Xiao-Li W. et al., 2013: Anti-Inflammatory Effect of Supercritical-Carbon Dioxide Fluid Extract from Flowers and Buds of *Chrysanthemum indicum* Linnén. – EvidBased Com. Alter. Med., 3: pp. 1-13.
- Yang B. et Liu P., 2014: Composition and Biological Activities of Hydrolyzable Tannins of Fruits of *Phyllanthus emblica*. – J. Agric. Food Chem., 62 (3): pp. 529-541.
- Zainuddin M. S. et Thuret S., 2012: Nutrition, adult hippocampal neurogenesis and mental health. – Br. Med. Bull., 103: pp. 89-114.
- Zee F. et al., 2010: Producing potted ornamental ohelo, *Vaccinium reticulatum* (Smith). – Ornamentals and Flowers, 50: pp. 1-8.
- Zhang L. et al., 2015: New gallotannin and other phytochemicals from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) leaves. – Nat. Prod. Commun., 10 (11): pp. 1977-80.
- Zhou X. et al., 2008: Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. – Bioorg. Med. Chem., 16: pp. 8011-8021.