

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Stanovení flavonoidů v květech černého bezu

Bakalářská práce

Anna Němcová

Výživa a potraviny

PharmDr. Jan Kubeš, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "**Stanovení flavonoidů v květech černého bezu**" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1. 5. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Janu Kubešovi, Ph.D. za jeho čas, podporu, rady a odbornou pomoc při vedení bakalářské práce. Děkuji také členům Katedry botaniky a fyziologie rostlin za poskytnutí prostoru laboratoře a jejich pomoc při zpracování praktické části práce. Ráda bych také poděkovala spolužákům z fakulty, kterým vděčím za asistenci při sběru vzorků. V poslední řadě bych poděkovala rodině a přátelům za trpělivost a podporu v průběhu psaní bakalářské práce.

Stanovení flavonoidů v květech černého bezu

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá nejen hodnocením obsahů flavonoidů v květech bezu černého, sbíraného v ekologicky zatížených oblastech České republiky a množstvím těžkých kovů ve sbíraných vzorcích, ale také korelací mezi těmito dvěma hodnotami. Dále je sledován celkový obsah polyfenolů a spalné teplo, zjištěné na základě kalorimetrického měření. Práce je rozdělena na část informační, kde jsou pomocí literatury a dalších dostupných zdrojů shrnuty informace související s bezem černým, flavonoidy, těžkými kovy a analytickými metodami použitými v této práci. Druhá část názorně popisuje metodiku stanovení i získání drogy použité k analýze dle Českého lékopisu 2017. Květy bezu byly sbírány v několika různých oblastech České republiky. Jednalo se o okolí Mladé Boleslavi, Mariánských Lázní, Děčína a Prahy. Samsběr proběhl v průběhu června roku 2020. Výsledné hodnoty byly následně porovnány s obsahem flavonoidů předepsaných Českým lékopisem a dalšími dostupnými zdroji se záměrem porovnat a následně vyhodnotit jednotlivé oblasti z hlediska vlivu na rostlinu. Celkově nejvíce těžkých kovů bylo zaznamenáno v lokalitách Děčínska. Nejvyšší obsahy TPC i flavonoidů byly zjištěny v Praze a na Mladoboleslavsku. Po vyhodnocení vzorků a zohlednění dalších možných faktorů, které mohly vzorky ovlivnit, bylo zjištěno, že existuje závislost mezi obsahem těžkých kovů a obsahem flavonoidů v rostlině. Výsledky této práce ukazují, že se zvyšující se koncentrací těžkých kovů se snižuje obsah flavonoidů v rostlinách.

Klíčová slova: Sambucus nigra, kontaminace, ICP-MS, těžké kovy, flavonoidy

Determination of flavonoids content in flowers of *Sambucus nigra*

Summary

The bachelor thesis focuses on the evaluation of flavonoid content in elderberry flowers collected in ecologically polluted areas of the Czech Republic and the amount of heavy metals in the collected samples. It also deals with the correlation between these two values. The total content of polyphenols and the heat of combustion, determined on the basis of calorimetric measurements, are monitored too. The work is divided into a review that uses the literature and other available sources to summarize information related to elderberries, flavonoids, heavy metals and analytical methods used in this work. The second part clearly describes the methodology for determining and obtaining the drug used for analysis, according to the Czech Pharmacopoeia 2017. Elderberry flowers were collected in several different regions of the Czech Republic. These places were in the surroundings of cities like Mladá Boleslav, Mariánské Lázně, Děčín and Prague. The foraging of wild elderberry flowers took place during June 2020. The resulting values were then compared with the content of flavonoids as prescribed by the Czech Pharmacopoeia and other available sources, with the intention of comparing and subsequently evaluating individual regions in terms of impact on the plant. Overall, the heaviest metals were founded in the localities of the Děčín region. The highest levels of TPC and flavonoids were found in Prague and the Mladá Boleslav region. After evaluating the samples and adjusting for other possible factors that may have influenced the samples, it has been shown, that there is a relationship between the content of heavy metals and the content of flavonoids in the plant. The results of this thesis indicates that higher concentrations of heavy metals reduce the content in plants.

Keywords: *Sambucus nigra*, contamination, ICP-MS, heavy metals, flavonoids

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.).....	10
3.1.1 Význam v léčitelství	10
3.1.2 Obsahové látky	11
3.2 Polyfenolové látky v rostlinách	12
3.2.1 Fenolové kyseliny	12
3.2.2 Flavonoidy	13
3.2.3 Biosyntéza flavonoidů	17
3.2.4 Význam flavonoidů v lidské stravě	18
3.2.5 Pozitivní účinky polyfenolů.....	18
3.3 Analytické metody.....	20
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie s indukovaně vázaným plazmatem (ICP-MS)	20
3.3.2 Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti....	21
3.4 Vliv těžkých kovů na rostliny.....	22
3.4.1 Těžké kovy.....	22
3.4.2 Vstup těžkých kovů do rostlin	22
3.4.3 Měď	23
3.4.4 Zinek	24
3.4.5 Kadmium, rtuť a olovo	24
3.4.6 Chrom, kobalt a arsen	25
3.4.7 Nikl a železo	25
3.4.8 Mangan	25
3.4.9 Fytoremediace.....	26
3.4.10 Vliv těžkých kovů na člověka.....	27
4 Metodika	28
4.1 Charakteristika sběrných lokalit.....	28
4.1.1 Hydrometeorologická situace	30
4.2 Sběr a skladování materiálu.....	31
4.3 Zpracování materiálu	31
4.3.1 Stanovení obsahu flavonoidů.....	31
4.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC)	33
4.3.3 Stanovení obsahu těžkých kovů.....	33
4.3.4 Kalorimetrie.....	34
4.3.5 Statistická analýza dat.....	34

4.4	Použité chemikálie a pomůcky	35
5	Výsledky	36
5.1	Výsledky stanovení obsahu flavonoidů	37
5.2	Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC).....	38
5.3	Výsledky stanovení obsahu těžkých kovů	39
5.4	Výsledky kalorimetrie.....	42
6	Diskuze	44
7	Závěr.....	50
8	Literární zdroje	51
9	Elektronické zdroje.....	54
10	Přehled tabulek a obrázků	I
11	Samostatné přílohy	II

1 Úvod

Těžké kovy jsou přirozenou anorganickou součástí životního prostředí, avšak s rozsáhlou antropogenní činností se jejich koncentrace v životním prostředí zvyšují. Na rostoucí koncentrace následně reagují živé organismy. Rostliny patří k sesilným organismům, a proto jsou také často považovány za indikátory úrovně znečištění životního prostředí. Příznaky toxicity na rostlinných částech lze pozorovat prostřednictvím vnějších projevů, jako jsou chlorózy, ovlivnění růstu i jejich reprodukce. Řada z toxických prvků však působí na rostliny i z biochemického hlediska na buněčné úrovni. Nepříznivě ovlivňují přenos živin a základních prvků, a tím naruší rostlinnou rovnováhu i metabolické dráhy rostlin (Cheng 2003).

Flavonoidy jsou jednou z několika skupin polyfenolových látek, které jsou syntetizovány jako produkty sekundárního metabolismu rostlin, za účelem zabránit vzniku a šíření volných radikálů. Mimo antioxidantní aktivity, jsou flavonoidy v rostlinách zodpovědné za širokou škálu funkcí. Nejen barva květů a vůně je připisována právě flavonoidům. Vyskytují se v ovoci, zelenině, čaji, víně i léčivých rostlinách (Yao 2004).

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je významnou léčivkou rostoucí na území České republiky v hojném počtu. Zástupce bezu černého lze často vidět v blízkosti polí, silnic, ale i lesů a rumišť. Typickou obsahovou látkou bezu černého jsou právě flavonoidy. Květy bezu i plody, nazývané jako bezinky, obsahují mimo flavonoidů i anthokyany a fenolové kyseliny. Bez černý, díky svému vyššímu obsahu flavonoidů a přirozenému místu výskytu v okolí silnic, je vhodným zástupcem pro porovnání vlivu sběrného místa na kvalitu a obsahové látky.

S ohledem na možné riziko proniknutí těžkých kovů přes potraviny rostlinného původu do potravního řetězce zvířat a lidí, je žádoucí znát vliv těžkých kovů, jak na rostlinné, tak na lidské tělo. Obsah flavonoidů, jako antioxidantních látek, je stěžejní při následném použití bezu černého ve farmacii nebo potravinářství se záměrem využít jeho léčivého potenciálu. Korelace těchto dvou hodnot je závislá na místě, kde je rostlina sbírána. Vybraná lokalita tedy významně ovlivňuje obsahovou skladbu výsledné drogy, proto by při zpracování rostlin k potravinářským či farmaceutickým účelům, neměla být opomíjena.

2 Cíl práce

Bez černý patří mezi často sbírané rostliny s ohledem na jeho květenství, která nacházejí využití při přípravě nápojů. Keře, které se vyskytují podél komunikací nebo jiných zdrojů znečištění, mohou být zvýšeným stresem ovlivněny. Cílem práce je porovnání obsahu flavonoidů v závislosti na lokalitě a vlivu znečištění na kvalitu drogy. Hypotéza této bakalářské práce je, že v ekologicky zatížených oblastech dochází k zvýšenému výskytu rizikových prvků ve srovnání s nekontaminovanými oblastmi a místo sběru bezových květů tak významně ovlivňuje jejich vlastnosti.

3 Literární rešerše

3.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Bez černý (Obrázek 1) je opadavý keř, nebo vzácněji strom, z čeledi pižmovkovitých (*Adoxaceae*), který je známý zejména pro své léčivé účinky. Bílá až nažloutlá vrcholičnatá květenství, která se lidově nazývají „kosmatice“, rozkvétají v období od konce května až do začátku července, a poté jsou nahrazeny plody. Plodem bezu jsou lesklé, měkké černo fialové peckovice sdružené v plodenství s tendencí převísat při plném dozrání. Má šedohnědou kůru s bílou dřevní uprostřed. Listy jsou lichozpeřené a pilovité až na spodní část listu, kde přecházejí v celokrajné okraje (Příhoda 1973; Slavík & Štěpánková 2011).

Díky adaptaci bezu na širokou škálu klimatických podmínek se hojně rozšířil do mnoha oblastí a stanovišť. Roste v okolí rumišť, v lesích, v parcích a také v zahradách, kde byl často záměrně vysazován, odkud se díky ptákům, kteří šířili semena, dále rozšiřoval do okolí. Najít ho lze taktéž v narušených místech, na polích kolem elektrických sloupů nebo podél silnic. Není příliš náročný na půdní podmínky, nicméně v půdách bohatých na dusík se mu obzvlášť daří. Vhodné jsou plně osluněná stanoviště či částečný stín (Příhoda 1973; Janick 2010; Slavík & Štěpánková 2011). Přirozeně se vyskytuje po celé Evropě (až na výjimky některých severovýchodních oblastí) i severní Africe. Směrem na východ od Evropy končí jeho přirozené stanoviště 55° východní délky. Byl zavlečen i do některých oblastí Asie, severní Ameriky, na Nový Zéland a do jižní Austrálie. Nadmořská výška, ve které roste závisí na stanovišti. V Tatrách rostl bez do nadmořské výšky 900 m n. m. a v pohoří Atlas byl pozorován až ve výškách 2200 m n. m. (Młynarczyk 2020).

3.1.1 Význam v léčitelství

Téměř každá část bezu černého má své využití. Hlavní drogou ve farmacii je však zejména květ. Květy se přidávají do léčivých čajů nebo jsou součástí uklidňujících nervových léků. Čaj z bezových květů pomáhá při nachlazení, při onemocnění horních dýchacích cest, má močopudné a odvodňovací účinky. Z květů bezu lze připravit také kloktadlo. Plody mají v čerstvém stavu projímavý účinek, naopak sušené plody působí proti průjmově (Příhoda 1973). Je jim také připisován příznivý účinek na nervovou soustavu zejména díky obsahu rutinu, který je neuroprotektivní a díky zvyšování hladiny serotoninu a noradrenalinu působí proti depresím (Ganeshpurkar & Saluja 2017). Šťáva z čerstvých plodů je využívána při léčbě různých nervových onemocnění, migrén i bolestivých nervových zánětů (Příhoda 1973).

Odvar z kůry pomáhá proti revmatismu a vodnatelnosti. Z kůry se pak připravují masti. Výluh z listů bezu je vhodný obklad na výrony a podvrknutí a zároveň má dezinfekční účinky. Této vlastnosti lze využít při ošetřování různých vředů. Nálevem ze sušených větví se podle lidového léčitelství léčí bolesti hlavy (Příhoda 1973; Janick 2010).

Listy jsou ve Střední Americe dodnes používány při léčbě spalniček. Výtažky květů se přidávají do nitrožilních infuzí z důvodu zmírnění alergických vyrážek a střevních problémů. Kůra obsahuje proteiny, které mají pozitivní vliv na léčbu rakoviny. Látky obsažené v plodech stimulují sekreci insulinu, a tím se stávají potenciálním nástrojem v boji proti cukrovce (Janick 2010).

3.1.2 Obsahové látky

V celé rostlině se nachází celá řada rostlinných metabolitů, z nichž některé jsou zdraví prospěšné a některé toxické. Květy i plody obsahují sacharidy, lipidy, flavonoidy, fenolové kyseliny, terpenoidy a alkaloidy (Janick 2010). Všechny části bezu obsahují kyanogenní glykosidy. Hlavní dva jsou sambunigrin a prunasin. Studie prokazují, že obsah sambunigrinu je závislý na nadmořské výšce. S rostoucí nadmořskou výškou byl zaznamenán zvýšený obsah sambunigrinu (Młynarczyk 2020). Stejně tak v kůře jsou přítomny obdobné látky, navíc je zde kyselina valerová. Tato kyselina usnadňuje dýchání a vhodně působí při léčbě astmatu (Janick 2010).

Plody jsou bohaté na vitamín C, A, B₆, dále vápník, železo, fosfor a vlákninu. Vysoký léčivý potenciál bezu je zapříčiněn obsahem polyfenolových sloučenin, zejména flavonolů ze skupiny flavonoidů, fenolových kyselin a antokyanů. Tyto látky vylučují volné radikály a chrání organismus před vznikem oxidačního stresu. Nejhojnějšími fenolovými sloučeninami pak jsou právě flavonoidy, konkrétně rutin a kvercetin (Domínguez et al. 2020).



Obrázek 1. Bez černý (foto: autorka práce, 2020)

3.2 Polyfenolové látky v rostlinách

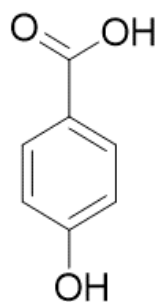
Fenolové látky v rostlinách jsou sekundární metabolity, jejichž syntéza může být v rostlinách způsobena oxidačním stresem za účelem zabránit vzniku a šíření volných radikálů (Domínguez et al. 2020). Ne nadarmo je jim připisována celá řada biologických funkcí. Svoji biologickou aktivitou se staví do role potencionálních léků na léčení řady lidských chorob, od nervových poruch přes bakteriální infekce až po AIDS. V rostlinách jsou pak také zodpovědné za zbarvení květů (Handique & Baruah 2002). Vyšší schopnost vázat se na makromolekuly (bílkoviny, sacharidy) snižuje jejich nutriční hodnotu v potravě. Jsou hojně zastoupeny v každé rostlině, kde plní řadu funkcí. Mimo ochrany před oxidativním stresem, mohou fungovat jako signální molekuly či ochraňovat rostlinu před požitáním býložravci. V zásadě platí závislost mezi šlechtěním rostlin a obsahem sekundárních metabolitů. Čím prošlechtěnější rostlina a složitější systém pěstování, s lepšími podmínkami pro růst, tím méně těchto látek rostlina produkuje (nejen polyfenoly, ale obecně i další fytochemikálie) (Domínguez et al. 2020).

Strukturu v molekule tvoří aromatické jádro s navázanými dvěma či více hydroxylovými skupinami. Chemická struktura polyfenolů je však velmi různorodá. Od jednoduchých sloučenin tvořených jedním aromatickým kruhem (fenolové kyseliny) až po velmi složité polymerní sloučeniny (kondenzované třísloviny).

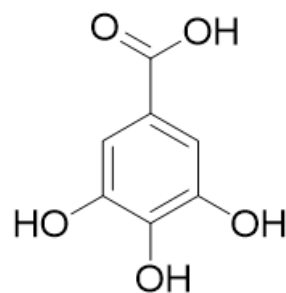
V závislosti na počtu aromatických kruhů a způsobu vazby je rozdělujeme na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. Nejčastějšími metabolity ve stravě jsou flavonoidy a fenolové kyseliny, zbytek polyfenolů tvoří minoritní část z celkového příjmu (Manach et al. 2004).

3.2.1 Fenolové kyseliny

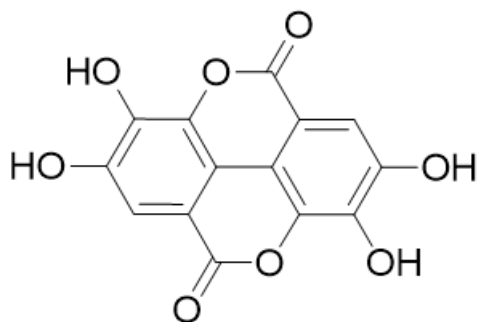
Fenolové kyseliny (Obrázek 2) jsou známé, jak ve volné, tak v esterifikované nebo glykosidové formě. Rozlišují se dvě třídy fenolových kyselin. Jedná se jednak o deriváty kyseliny benzoové, kam patří například kyselina gallová a ellagová, které se vyskytují například v cibuli či ředkvi, a mimo zmíněné potraviny se v jedlých rostlinách vyskytují v nízkých koncentracích. Druhým typem jsou deriváty kyseliny skořicové, kam se řadí kyselina kávová či ferulová, které jsou obsaženy v bramborách nebo kávových zrnech. Obě zmíněné kyseliny se vyskytují v zelenině, ovoci a také v luštěninách. Jejich obsahy značně kolísají, například v borůvkách se nachází až 2200 mg/kg čerstvé hmotnosti fenolových kyselin a v jahodách jsou fenolové kyseliny obsaženy v rozpětí 20–90 mg/kg (Lattanzio 2013; Manach et al. 2004).



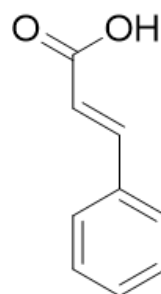
benzoová kyselina



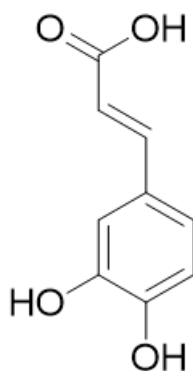
gallová kyselina



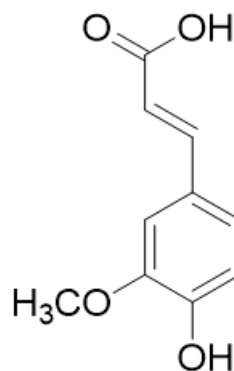
ellagová kyselina



skořicová kyselina



kávoá kyselina



fellurová kyselina

(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

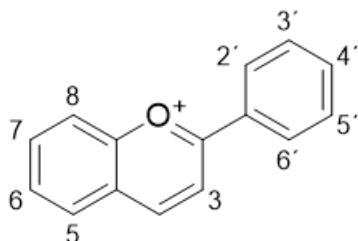
Obrázek 2. Vzorce vybraných fenolových kyselin

3.2.2 Flavonoidy

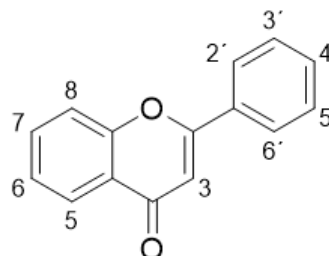
Flavonoidy jsou nejvýznamnější skupinou polyfenolů. Mají odlišné vlastnosti od ostatních polyfenolů. Molekula je tvořena dvěma benzenovými jádry spojenými tříuhlíkovým řetězcem (Lattanzio 2013). Název flavonoidů je odvozen jednak od heterocyklické sloučeniny flavonu, tak i dle latinského slova „flavus“, které znamená žlutý (David et al. 2016, Mandelová 2006). Nejčastěji se flavonoidy vyskytují jako glykosidy, jsou tedy vázané na různé cukry. Necukerná složka se nazývá aglykon (Mandelová 2006).

Flavonoidy se dělí na dvě základní skupiny, antocyaniny (Obrázek 3) a antoxanthiny (Obrázek 4). Antokyany jsou takzvané barevné pigmenty. Jsou zodpovědné za modré či fialové zbarvení plodů. Dominují v čajích, medu, zelenině a ovoci, jako jsou například bobule černého rybízu či borůvky. Mají pozitivní vliv na kardiovaskulární systém, zrak, nebo rozklad cholesterolu. Hlavní nutriční biochemickou výhodou antokyanů je však jejich antioxidační působení. K nejčastějším zástupcům patří: malvidin, petunidin, kyanidin, delphinidin.

Antoxanthiny nemají příliš výraznou barvu. Barva, stejně jako u antokyanů, může být závislá na pH. Jedná se o velmi světlé odstíny barev až do žluta. Řadíme mezi ně flavonoly, flavony, flavan-3-oly, flavanony a isoflavonoidy (Lattanzio 2013; Brodowska 2017).



Obrázek 3. Antocyanin



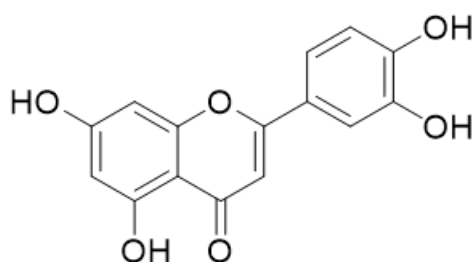
Obrázek 4. Antoxantin

(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2.2.1 Flavonoly

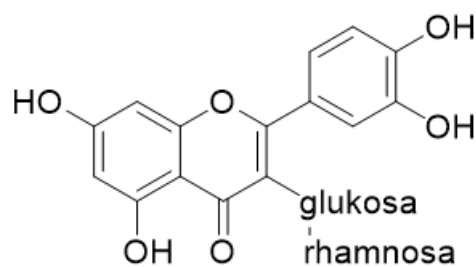
Flavonoly jsou žluté pigmenty rostlin, které se akumulují zejména v nadzemních rostlinných částech, protože jejich syntéza je stimulována světlem. Významné koncentrace flavonolů jsou v zelenině i ovoci, jako jsou jablka, rajčata, cibule, brokolice a bobule vinné révy. Nejznámějšími aglykony jsou kvercetin, kempferol a myricetin. Kvercetin je považován za silný antioxidant. Svoji antioxidační aktivitou chrání buněčné struktury a krevní cévy. Působí také jako antihistaminikum, tudíž brání rozvoji alergie či astmatu. Kvercetin (Obrázek 5) je také považován za fytoestrogen (viz isoflavonoidy). Kempferol je flavonol vyskytující se zejména v brokolici a mezi jeho pozitivními účinky byla pozorována vlastnost inhibovat růst rakovinných buněk. U posledního zmiňovaného zástupce, myricetinu, pak bylo zjištěno, že pozitivně ovlivňuje rezistenci receptorů na insulin, a tím by mohl přispívat k léčbě cukrovky. Tyto metabolity se vyskytují zejména jako glykosidy, kdy cukernou složku tvoří glukosa či rhamnosa. (Manach et al. 2004; Brodowska 2017).

Rutin (Obrázek 6), derivát kvercetinu, jako důležitá nutriční složka potravin, je glykosid nacházející se v rostlinách. Významné koncentrace rutinu obsahuje pohanka a jablko. Název získal rutin odvozením od routy vonné (*Ruta graveolens*), která ho také hojně obsahuje. Rutinu je připisována celá řada pozitivních biologických účinků, od antioxidačních přes antikarcinogenní, má kardioprotektivní i neuroprotektivní vliv. Studie prokázaly pozitivní účinky při léčbě Alzheimerovy choroby, vysokého krevního tlaku a mrtvice. Svou schopností zvyšovat dostupnost serotoninu a noradrenalinu působí jako antidepresivum. Při podávání rutinu testovaným zvířecím modelům, byl prokázán pokles artritidy oproti zvířatům, kterým rutin podáván nebyl. U potkanů rutin inhiboval záněty. K dalším výhodným účinkům rutinu patří působení spojené s rekonvalescencí po chemoterapii, působí proti malárii, použití rutinu v prevenci apoptózy buněk vlasových folikulů, jednou z příčin plešatosti. Rutin vykazuje mnoho dalších žádoucích účinků, nicméně není možné všechny popsat v rozsahu této práce (Ganeshpurkar & Saluja 2017).



Obrázek 5. Kvercetin

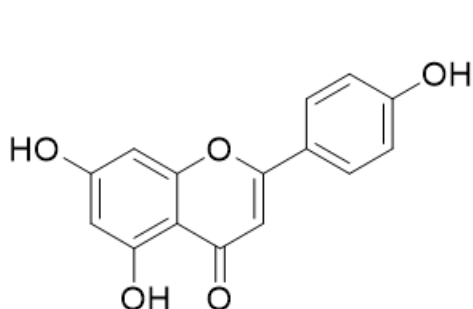
(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)



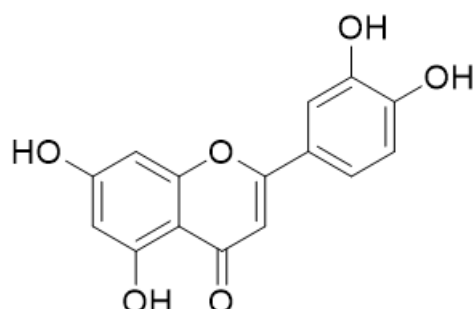
Obrázek 6. Rutin

3.2.2.2 Flavony

Flavony (Obrázek 7) společně s flavonoly jsou žlutým pigmentem rostlin, ve vyšších koncentracích jsou zodpovědné za barvu rostlinných pletiv. Přirozeně se vyskytují v zelenině a ovoci. Hlavními zástupci jsou apigenin a luteolin. Apigenin se nachází v cibuli, ale i heřmánku, kde tvoří hlavní složku flavonoidů. Působí antibakteriálně i protirakovinně. Luteolin se vyskytuje v brokolici, celeru či mrkvi. V tradiční čínské medicíně se využívá k léčbě hypertenze, zánětů i rakoviny. Opět nese mnoho biologických účinků, antialergické i protizánětlivé. V závislosti na prostředí však může působit nejen jako antioxidant, ale i prooxidant. Z celé skupiny flavonoidů jsou díky své struktuře právě flavony nejvíce hydrofobními sloučeninami (Manach et al. 2004; Brodowska 2017).



apigenin



luteolin

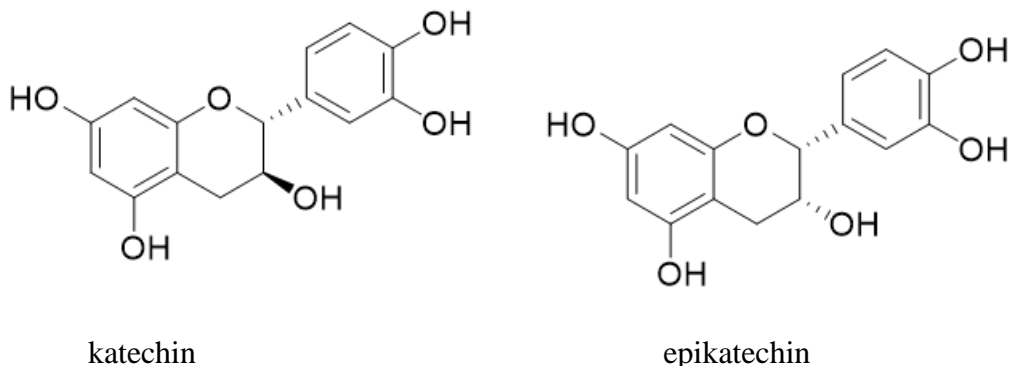
(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Obrázek 7. Vzorce vybraných flavonů

3.2.2.3 Flavan-3-oly

Tyto flavonoidy jsou také běžně nazývané katechiny (Obrázek 8) a vyskytují se nejčastěji ve formě gallátů, tedy esterů s kyselinou gallovou. V zeleném čaji je hojně zastoupen epigalokatechin gallát (EGCG). Vyskytují se zejména v ovoci, nebo slupkách či semenech zeleniny, avšak celkově se v zelenině téměř nevyskytují. Dále se hojně vyskytují také v čokoládě a červeném víně. V rostlinách katechiny polymerují na dimery, trimery či složitější polymery, které označujeme jako kondenzované trisloviny. V krvi kuřáků mohou stimulovat tvorbu oxidu dusného, a předcházet tak poruchám cév. Nejběžnějšími flavan-3-oly jsou epikatechin, katechin a gallokatechin. Katechin jako nejdůležitější zástupce skupiny, je obsažen

zejména v semenech a slupkách plodů, které nejsou ještě zcela zralé. Mimo jiné katechin brání oxidaci bílkovin vychytáváním volných radikálů, a tím snižuje oxidační stres. Vykazuje antisklerotické i antikarcinogenní vlastnosti. Katechiny v zeleném čaji mají i antibiotické účinky (Lattanzio 2013; Brodowska 2017).

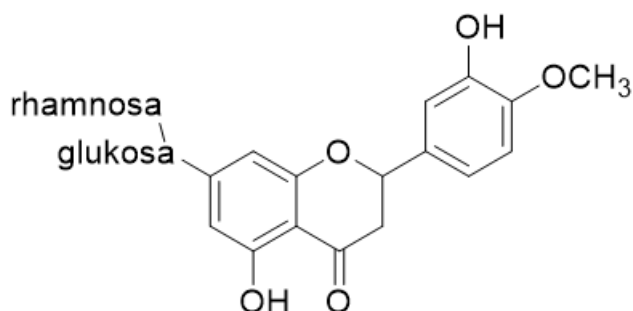


(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Obrázek 8. Vzorce uvedených flavan-3-olů

3.2.2.4 Flavanony

Flavanony se nachází ve vysokých koncentracích zejména v citrusech, dále například v rajčatech či aromatických bylinách. Fyziologicky je lze najít ve všech částech rostlin, a to i v těch podzemních. Hlavními aglykony v citrusech jsou hesperetin v pomerančích, narigenin v grapefruitech, který je odpovědný za hořkou chuť tohoto ovoce, a eriodictol v citrónech. V alkalickém prostředí se flavanony přeměňují na chalkony, významné inhibitory enzymů. V acidickém prostředí se chalkony zpět konvertují na flavanony. Hlavní výhodou, kterou flavanony nesou je jejich antioxidační aktivita, která je závislá na počtu a umístění OH skupin. Mimo jiné mohou působit antikarcinogenně i protizánětlivě a hrají roli v prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním. U myši, které byly krmeny tučnou stravou bohatou na cholesterol se po podávání naringeninů, snížila navozená ateroskleróza. Hlavními zástupci glykosidů flavanonů jsou poté hesperidin (Obrázek 9), neohesperidin a naringin (Lattanzio 2013; Manach et al. 2004; Brodowska 2017).

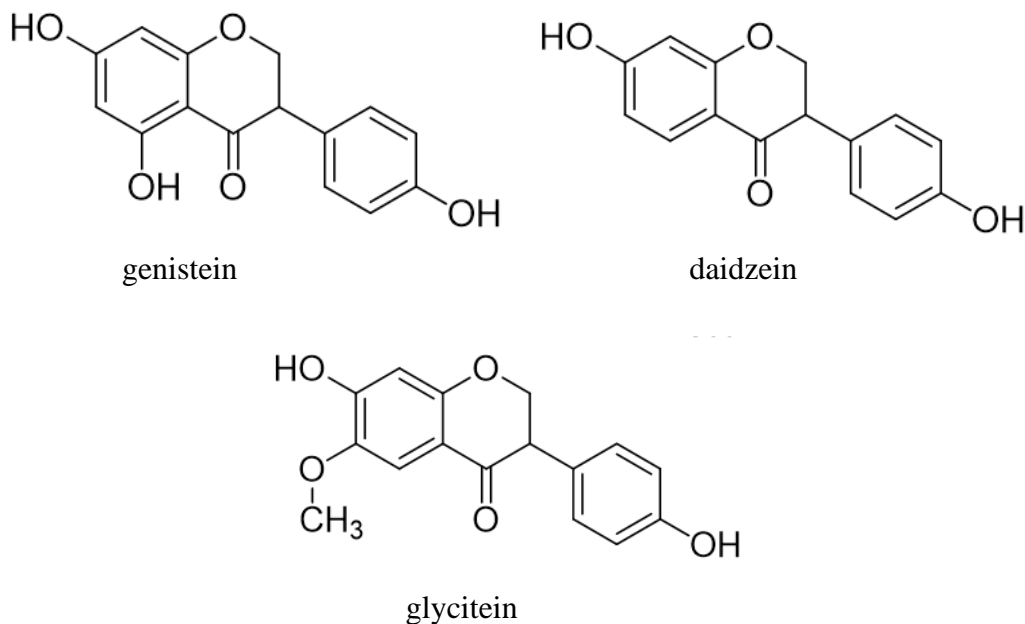


Obrázek 9. Hesperidin

(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.2.2.5 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy (Obrázek 10) mají velmi podobnou strukturu flavonoidům, avšak při syntéze dochází ke změně struktury – změna polohy fenylové skupiny z druhého na třetí uhlík pyranového kruhu. Díky této struktuře jsou isoflavonoidy podobné molekulám estradiolu, označují se jako fytoestrogeny. Vyšší koncentrace se nacházejí v luštěninách. Jsou typické pro zástupce z čeledi bobovitých. V sóje jsou isoflavonoidy zastoupené v podobě daidzeinu, genisteinu a glyciteinu. Sójové boby obsahují 580–3800 mg isoflavonoidů na kilogram čerstvé hmotnosti (Manach et al. 2004).



(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Obrázek 10. Vzorce uvedených isoflavonoidů

3.2.3 Biosyntéza flavonoidů

Syntéza flavonoidů v rostlině probíhá v rámci fenyylpropanoidových drah. Základním bodem v tomto procesu je vznik 4-kumaroyl-CoA, který je odvozen od L-fenylalaninu. 4-kumaroyl-CoA vstupuje do kondenzované reakce s malonyl-CoA za vzniku klíčového meziproduktu tetrahydroxychalkonu. Následujícími biochemickými reakcemi vznikají již výše zmíněné různě modifikované podskupiny flavonoidů (Winkel-Shirley 2002).

Úloha flavonoidů při stresové reakci rostlin stále není detailně prozkoumána, nicméně v mnoha případech lze připsat antioxidantní aktivitu těchto sloučenin právě stresovým reakcím rostlin. Existují případy, kdy flavonoidy v rostlině plní funkci „detektoru“ škodlivého záření, vážou fytotoxiny či pomáhají regulovat a zmírňovat projevy stresu. Charakteristickým znakem stresu u rostlin je právě hromadění antokyanových pigmentů ve vegetativních pletivech rostlin (Winkel-Shirley 2002).

3.2.4 Význam flavonoidů v lidské stravě

Flavonoidy jsou zodpovědné za senzorické a nutriční vlastnosti lidské stravy. Typická vlastnost, která může být způsobena přítomností flavonoidů, je svíravá a hořká chuť. V lidské stravě mohou být prospěšné i nežádoucí. Nejvíce biologicky dostupné jsou isoflavonoidy (až 30 %) a nejméně antokyany (do 6 %). Isoflavonoidy mají prospěšný vliv na ženský organismus. Zmírňují příznaky menopauzy a snižují riziko osteoporózy. Vysoké koncentrace ve stravě mají vliv na hormonální stav a regulaci menstruačního cyklu. Zvýšený příjem sójových isoflavonoidů pravděpodobně snižuje riziko rakoviny prsu (Ali & Coombes 2000).

Rakovina prsu je hned po rakovině plic druhým nejčastějším smrtelným onemocněním u žen žijících v průmyslových zemích. Jedna z deseti žen je v určitém stádiu života zasažena právě tímto onemocněním. Odpovědným hormonem je estrogen, který řídí růst rakoviny prsu (Ali & Coombes 2000).

V asijských zemích převažuje konzumace luštěnin výrazně dávky, které konzumují Evropané či obyvatelé severní Ameriky. Lidé ve východní Asii konzumací sójových výrobků denně přijmou v průměru 25 až 50 mg isoflavonoidů, zatímco západní civilizace v průměru denně ze stravy vstřebá do metabolismu méně než 1 mg. Studie dokazují, že v Asii je hlášen menší výskyt estrogendependentních nádorů a osteoporózy oproti západním zemím. Nicméně existují i hypotézy, které připisují isoflavonoidům, jako fytoestrogenům, naopak účinky zvyšující riziko onemocnění rakovinou prsu (Trock et al. 2006).

Obsah flavonoidů je závislý na řadě několika faktorů. Ovlivňují ho podmínky pěstování rostlin, jejich odrůda, zralost v době sklizně. Podíl na obsahu může mít následně skladování, zpracování produktů, a nakonec kulinární úprava. Nejvyšší koncentrace se nachází v nadzemních částech rostlin, protože tvorba flavonu a flavonolu je úzce závislá na světle. V podzemních částech rostlin jsou pak koncentrace stopové (Lattanzio 2013; Burda et al. 1990).

3.2.5 Pozitivní účinky polyfenolů

Jak bylo popsáno u některých flavonoidů, tak polyfenoly vykazují řadu prospěšných účinků na organismus. Jejich mechanismus působení je závislý na chemické struktuře. Působí protizánětlivě, antioxidačně, antimutageně a antikarcinogenně a mají vliv na hladinu hormonů v těle.

3.2.5.1 Antioxidační účinky

V organismu během metabolických procesů a na ně navazujících reakcí, vznikají látky se silně oxidačními účinky, které mohou svou aktivitou poškozovat buněčné struktury. Jedná se o radikály s vysokou reaktivitou. Tyto radikály vyvolávají oxidaci za vzniku dalších radikálů. Nejběžnějšími zástupci jsou radikály kyslíkové – superoxid, peroxid vodíku, peroxylový a hydroxylový radikál. Jedná se o atomy nebo skupiny atomů s lichým (nepárovým) počtem elektronů. Hydroxylový radikál je z kyslíkových radikálů nejreaktivnější, tudíž jeho biologický poločas rozpadu je nejnižší. Biologický poločas rozpadu charakterizuje vzdálenost mezi vznikem volného radikálu a nejbližším místem, kde se mohou projevit jeho účinky. Volné radikály mají tendenci reagovat s vysokomolekulárními sloučeninami, jako jsou

bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny a další. Reakce vede k modifikaci molekul a tyto změny se podílejí na vzniku řady onemocnění (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, ateroskleróza, rakovina a další) (Zendulka 2008; Mandelová 2006).

Nejen kyslík může být základní molekulou pro utváření volných radikálů, ale i jiné strukturně podobné látky. Příkladem jsou volné dusíkové radikály, jako oxid dusnatý (NO). Vyjma negativního účinku volných radikálů v organismu, mají nezastupitelné funkce. Jsou signálními molekulami nebo jsou součástí imunitního systému. Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku vede ke vzniku oxidačního stresu (Zendulka 2008; Mandelová 2006).

Látky se schopnostmi tyto radikály neutralizovat, vychytávat je, působit proti jejich účinku či dokonce zabránit jejich vzniku, se označují jako antioxidanty. Mimo přirozené antioxidační mechanismy těla (glutathionperoxidáza) se na inaktivaci podílí antioxidanty přijaté ze stravy. Jsou pozorovány dva mechanismy působení antioxidačních látek v organismu. Přímé ovlivňování antioxidačních mechanismů je považováno za méně častý způsob. Častějším způsobem je potom reakce antioxidantů, které se vstřebaly v trávicím traktu, s molekulami radikálů, za vzniku méně reaktivních látek. V případě polyfenolů mechanismus funguje na základně fenolických skupin, jež akceptují nepárový elektron radikálu a následně oxidují na ketoskupiny. Počet fenolických skupin je přímo úměrný antioxidačním účinkům, tedy polymerní fenoly mají silnější antioxidační aktivitu než jednoduché polyfenoly. Polyfenoly také ovlivňují aktivitu přirozených antioxidačních mechanismů organismu, například zvyšují hladinu výše zmíněné glutathionperoxidázy (Zendulka 2008; Mandelová 2006).

3.3 Analytické metody

V této kapitole jsou uvedeny dvě stěžejní analytické metody, kterých byly v práci využity. Jedná se o hmotnostní spektrometrii s indukovaně vázaným plazmatem, která byla využita k stanovení těžkých kovů. Druhá metoda byla využita k stanovení obsahu flavonoidů, jednalo se o molekulovou absorpční spektrometrii v ultrafialové a viditelné oblasti, kterou se měřila vlnová délka obsažených metabolitů.

3.3.1 Hmotnostní spektrometrie s indukovaně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Analytická spektrální metoda je kombinací indukčně vázané plazmy (ICP) a hmotnostní spektrometrie (MS). Hmotnostní spektrometr detekuje kladně nabitě částice, jejichž zdrojem je právě indukčně vázaná plazma. Využívá se ve všech oblastech prvkové analýzy, od rozboru vod přes jaderný i jiný průmysl, až po analýzu vzorků životního prostředí. Vhodná je zejména při stanovení ultrastopových koncentrací toxických či esenciálních prvků v biologickém materiálu. Výhodou, oproti jiným spektrometrickým metodám, jsou extrémně nízké detekční limity, víceprvkové charakteristiky vzorku a rychlost analýzy. Je využívána nejen ke stanovení kovů, ale díky své vysoké citlivosti a selektivitě i k dalším specifickým analýzám. Pro analýzu platí, že těžké kovy se analyzují lépe, než ty lehké (Mestek 2010; Thomas 2013).

3.3.1.1 Princip

Vzorek se uvádí do spektrometru v kapalně formě. Peristaltická pumpa přečerpá vzorek do nebulizéru neboli zmlžovače, který přemění kapalnou vzorek na aerosol. Nebulizér přivádí velkou rychlostí argon na proud kapalného vzorku. Protože atomy argonu mají velkou kinetickou energii, tak se po srážce s proudem oddělují částičky vzorku, které se následně roztrhají na stěnách nebulizéru. Další částí přístroje je plazmová hlavice s hořákem. Do plazmového hořáku je přiváděn aerosol vzorku a argon, který je hlavním zdrojem vzniku plazmatu. Energie je do plazmatu předávána indukční cívkou. V nejteplejší části plazmového prstence lze naměřit teplotu až 10 000 °K. Tato teplota je schopná ionizovat většinu prvků (Mestek 2010; Thomas 2013; Mihaljevič et al. 2004).

Spojení mezi plazmatem a vlastním spektrometrem zprostředkovává expanzní komora. Tu oddělují dva děliče tlaku. Výsledný tlakový gradient tvoří paprsek ionizovaných částic, který vstupuje do spektrometru. Po vstupu je paprsek usměrněn iontovou optikou, která mimo jiné zabraňuje, pomocí fotonové zářky, fotonům, aby pronikly k detektoru. Před detektorem se nachází kvadrupól. Kvadrupól zajišťuje oscilaci svého elektromagnetického pole, aby se ionty pohybovaly směrem k detektoru. Podmínky kvadrupólu se mění v řádu sekund, a proto lze ICP-MS metodou provést rychlou hmotnostní analýzu celého spektra. Ty ionty, které projdou jsou zachycené na detektoru. Signál je zesilován a výsledně zachycen jako kaskádový tok elektronů a následně počítačem vyhodnocen (Mestek 2010; Thomas 2013; Mihaljevič et al. 2004).

3.3.2 Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

UV/VIS spektrofotometrie je metoda využívající ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) záření ke stanovování koncentrací složitých organických či biochemických látek v životním prostředí. Ultrafialové záření je záření odpovídající vlnové délce 10–380 nm. Od vlnové délky 380 nm začíná další kategorie záření, a to viditelné spektrum, které tedy odpovídá vlnovým délkám v rozsahu 380–780 nm (Gorog 2018).

3.3.2.1 Princip

Princip metody je založený na absorpci záření vzorkem. Vzorek je zředěný roztok molekul, které absorbují buď UV záření nebo viditelné záření. Samotná absorpce je vyjádřením excitace elektronů, tedy jevem, kdy se elektrony dostávají z nižší do vyšší energetické hladiny. Při přestupu mezi jednotlivými hladinami spotřebovávají energii, kterou lze pozorovat jako určitou část záření. K samotnému měření se využívá přístroj zvaný UV/VIS spektrofotometr (Obrázek 11), který se skládá ze tří hlavních částí. Jedná se o zdroj záření, část pro umístění vzorku a detektor (Kaňa & Mestek).

Zdrojem záření bývá nejčastěji halogenová žárovka, která s sebou nese výhodu pokrytí jak UV spektra, tak VIS spektra. Avšak existují i jiné emitory, například žárovka s wolframovým vláknem, která se používá jako zdroj světla vlnových délek větších než 350 nm. Pouze pro ultrafialovou oblast spektra lze využívat deuteriovou lampu. Lampa generuje záření s vlnovou délkou pod 375 nm (Gorog 2018). Součástí spektrofotometrů jsou i monochromátory, které izolují přijímané záření na vhodné vlnové délky (Kaňa & Mestek).

Roztoky vzorků jsou umístěny do skleněných (plastových) nebo křemenných kyvet v závislosti na používaném spektru záření. Pokud se využívá k analýze UV záření, vzorky se převedou do křemenných kyvet. Pokud se jedná o VIS spektrum, vzorky se měří ve skleněných případně plastových kyvetách. Důraz je kladen na čistotu těchto kyvet. Případné znečištění může výrazně ovlivnit výsledné hodnoty vzhledem k povaze fungování přístroje (Gorog 2018).

Detektorem je nejčastěji fotonásobič. Detektor transformuje intenzitu světla na elektrický signál. Proud fotonů se tedy přemění na proud elektronů. Výsledkem je absorpční spektrum při vhodné zvolené vlnové délce. Vlnová délka je volena podle maxima absorpce měřeného vzorku (Gorog 2018).



Obrázek 11. UV/VIS spektrofotometr (foto: autorka práce 2021)

3.4 Vliv těžkých kovů na rostliny

Skupina těžkých kovů zahrnuje jak prvky pro růst rostlin nezbytné, tak prvky, které jsou potenciálně vysoce fyto toxické. Těžké kovy ve vysokých koncentracích značně inhibují fyziologické procesy rostlin, jako je dýchání, fotosyntéza, metabolismus dusíku, minerální výživa a ovlivňují hospodaření rostlin s vodou. Zvýšená akumulace kovů v životním prostředí je hlavně antropogenní záležitostí. Hlavními zdroji je kromě průmyslu i zemědělská činnost. Rostliny rostoucí na místech s vyšší koncentrací těžkých kovů v půdách/vodách vykazují změny v metabolismu (Nagajyoti et al. 2010).

Závěrem kapitola pojednává o vlivu těžkých kovů na člověka, která zohledňuje skutečnost, že člověk konzumuje rostliny a jejich části, a tím pádem i látky v nich obsažené.

3.4.1 Těžké kovy

Termínem těžké kovy jsou označovány polokovy či kovy s vyšším atomovým číslem než 20, které ve vysokých koncentracích negativně ovlivňují životní prostředí, avšak jsou pro různé organismy v různém množství nezbytné pro život (Asati et al. 2016). Jedná se o prvky: měď (Cu), mangan (Mn), olovo (Pb), kadmium (Cd), nikl (Ni), kobalt (Co), železo (Fe), zinek (Zn), chrom (Cr), železo (Fe), arsen (As), stříbro (Ag), rtuť (Hg), vanad (V), thalium (Tl) a platinum (Pt) (Alloway 2012). Avšak existuje mnoho definic, které zařazují různé kovy mezi těžké, proto je problematika zařazování prvků mezi těžké kovy poněkud složitá. Těžké kovy jsou běžnou součástí půdních složek v přirozených koncentracích. Vysoké koncentrace jsou ve většině případů důsledkem antropogenních činností, avšak i z přírodních zdrojů se mohou uvolňovat velmi velké koncentrace těžkých kovů, příkladem je vulkanická aktivita. Uvolňují se z dopravních prostředků v podobě výfukových plynů, dostávají se do životního prostředí v důsledku intenzivního zemědělství, těžby, výrobě energie a paliv, tavení kovů a dalších činností. V místech, kde se přirozeně vyskytují v koncentracích považovaných za nebezpečné, se nacházejí jako součást nerostů. Pro taková místa jsou charakteristická odlišná rostlinná společenstva. Tento jev se využívá při hledání ložisek nerostů k těžbě, kde rostliny hrají roli indikátoru. Jedním z příkladů je rostlina *Haumaniastrum katangense* (S.Moore) P.A.Duvign. & Plancke, označovaná jako „*the copper flower*“, v překladu měděný květ, která je tolerantní k vysokým koncentracím kobaltu a chromu (Asati et al. 2016).

Toxicita těžkých kovů je závislá na řadě faktorů, nezáleží jenom na druhu prvku, jeho chemické formě a koncentraci, ale i na druhu rostliny a vlastnostech půdy, zejména složení a pH. Některé z prvků jsou esenciální, tedy nezbytné pro život rostlin. Mezi takové prvky lze řadit Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V a Zn, jedná se o velmi malá množství, ve vyšších koncentracích se stávají toxickými. Nicméně Pb, Cd, Hg a As jsou prvky s vysokou mírou toxicity. Jsou velmi škodlivé nejen pro rostliny, ale i pro veškeré živé organismy, poškozují růst, reprodukci a narušují metabolismus (Asati et al. 2016; Raskin et al., 1994).

3.4.2 Vstup těžkých kovů do rostlin

Rostliny přijímají těžké kovy jako rozpuštěné složky v půdním roztoku, který přijímají kořeny. Kořeny mají schopnost redukce kovových iontů z půdních částic díky reduktázám kovů vázaných na plazmatickou membránu. Některé kovy jsou přijímány primárně v apikální

oblasti, jiné jsou přijímány celou délkou kořene. Těžké kovy se do rostlin dostávají také prostřednictvím plynů. Ve formě plynů vstupuje do listů průduchy například rtuť (Hg). Ionty pevných částic se do listů dostávají přes kutikulu. S vysokou vlhkostí roste i míra absorpce kovů kutikulou listů. Naopak při nízké relativní vlhkosti sraženiny kovů na povrchu listů spíše ulpívají. V závislosti na druhu kovu se také mění intenzita absorpce. Kadmium, zinek a měď pronikají listy snáze v porovnání s olovem, které většinou zůstává na povrchu listu. Úroveň absorpce se liší s druhem rostliny, kdy různé druhy mají různé chemické složení kutikuly, a tím se mění i míra jejich permeability (Asati et al. 2016).

Kromě absorpce dochází také k uvolňování kovů zpět do životního prostředí, konkrétně do vody a půdy z rostlinných pletiv nebo do vzduchu v plynné formě z listů. Velkou nevýhodou pro živé organismy je biologická nerozložitelnost těžkých kovů. Z tohoto důvodu se těžké kovy v rostlinách akumulují, a při překročení únosné hranice koncentrace, začnou rostlinu ovlivňovat, buď přímo, nebo nepřímo. Důsledkem je nakonec úhyn rostliny (Asati et al. 2016; Prasad 2013).

Přímé vlivy těžkých/toxických prvků na rostliny jsou v důsledku méně nebezpečné než ty nepřímé. Lze je totiž viditelně rozlišit zrakem a zabránit tak konzumaci postižených rostlin. Právě bioakumulace těžkých kovů v potravním řetězci je jeden z velmi nebezpečných jevů pro živé organismy. Přímé působení má vliv na fotosyntézu, která je snížena, dále inhibuje růst, a to v podzemních i nadzemních částech rostliny. V důsledku zmíněných procesů dochází k rychlejšímu stárnutí rostliny (Asati et al. 2016).

Nepřímé účinky jsou z hlediska působení složitější. Těžké kovy neovlivňují přímo metabolické procesy, ale jejich složky, které následně mění i procesy v metabolismu. U fazole (*Phaseolus vulgaris*), která byla vystavena působení kadmia a mědi, tyto prvky způsobily rostlině oxidační stres, který vyvolal nárůst sacharidů a současně pokles fotosyntézy. Pravděpodobně celková fotosyntetická činnost poklesla jako následek snížené činnosti temné fáze, kterou ovlivnila pozměněná hladina sacharidů (Maksymiec 2007). Další procesy spojené s nepřímými vlivy jsou ovlivnění růstu, aktivity půdních organismů či nahrazování esenciálních živin těžkými kovy v místech výměny kationtů (Asati et al. 2016).

3.4.3 Měď

Měď je pro rostliny nezbytným mikroprvkem potřebný k normálnímu růstu a vývoji, ačkoli je ve vyšších koncentracích potencionálně toxická. Hraje zásadní roli v syntéze ATP nebo při asimilaci oxidu uhličitého. Měď je také základní složkou řady důležitých proteinů, například je součástí plastocyaninu, který se účastní fotosyntetických procesů. Obsah mědi v rostlinách je závislý na druhu i půdních podmínkách (Asati et al. 2016). Průměrně se v rostlinných pletivech nachází 1,5 – 1,8 ppm v sušině. Vysoké koncentrace mědi se hromadí zejména v listových chloroplastech (Richter 1994). Antropogenní činnost zvyšuje množství mědi v ekosystémech. Byl prokázán nepříznivý účinek měděného prachu na fotosyntézu v listech u některých druhů stromů. Nadbytek Cu v rostlinách je původcem oxidativního stresu, který narušuje metabolické dráhy a v důsledku toho dochází ke změnám či poškození makromolekul. Omezuje růst kořenů, konkrétně u výše zmíněné fazole (*Phaseolus vulgaris*) je negativní vliv mědi pozorován jako redukce kořenového systému (Asati et al. 2016).

3.4.4 Zinek

Zinek je mikroživinou rostlin, u které je pozorována takzvaná hormeze, kdy nedostatek i nadbytek prvku, má na rostlinu negativní vliv (Piršelová et al. 2018).

Množství zinku přítomného v rostlinách se pohybuje do 100 ppm v sušině (Richter 1994). Zinek plní svou roli zejména při produkci chlorofylu, ovšem ovlivňuje i další metabolické procesy (Asati et al. 2016), například v metabolismu aminokyselin a bílkovin, kde plní funkci aktivátoru při tvorbě tryptofanu. Zasahuje i do syntézy sacharidů (Richter 1994). Tento prvek má dlouhý biologický poločas. Nedostatek zinku indikují bledé listy a zakrnělý růst rostliny. Nedostatek se prvně projevuje na spodních listech a s přetrvávajícím deficitem Zn poté postihuje i listy horní části rostliny. Nedostatek zinku může doprovázet i nedostatek manganu, mědi a také fosforu, kdy nedostatek fosforu indikují purpurově zbarvené listy (Asati et al. 2016). Deficit na rostlinách lze pozorovat už od hodnoty pod 10 ppm (Richter 1994). Vysoké koncentrace zinku v půdě inhibuje některé metabolické funkce rostlin. To se projevuje jako urychlování stárnutí, sníženou schopností růstu a vývoje celého organismu, kořenů a výhonků. Nadbytek zinku se projevuje jako chloróza mladých listů, později při přetrvávajícím nadbytku přechází chloróza i na listy starší. Vysoké koncentrace zinku v půdě pak také snižují klíčivost semen (Asati et al. 2016).

3.4.5 Kadmium, rtuť a olovo

Kadmium i rtuť nejsou nezbytnými prvky pro růst a vývoj rostlin. Do půd se dostávají z hnojiv, kalů a hnojů, průmyslovou činností nebo těžbou. Limitní koncentrace pro kadmium v zemědělských půdách odpovídá hodnotě 100 mg na kilogram půdy. Rostliny rostoucí v prostředí, kde jsou velmi vysoké koncentrace kadmia vykazují značné příznaky poškození. Kadmium v nadbytku ovlivňuje propustnost plazmatické membrány, čímž snižuje obsah vody v rostlině. Vysoká koncentrace inhibuje růst, snižuje aktivitu enzymů, které se podílejí na fixaci oxidu uhličitého, způsobuje hnědnutí špiček kořenů a chlorózy. Zmíněné příznaky vedou ke kompletnímu úhynu rostliny. Mimo jiné vysoké koncentrace kadmia snižují klíčivost semen, pokles živin v rostlině a zkracují délku kořene (Asati et al. 2016). Normální hladiny kadmia v rostlinách jsou stanoveny v rozpětí 0,2–0,8 mg/kg. Za toxické koncentrace jsou považovány hodnoty 5–30 mg/kg (Osmani et al. 2015).

Absorpce rtuti rostlinami závisí hned na několika faktorech, jako je pH půdy nebo druh rostliny. U rtuti je pozorována snadná bioakumulace zejména u vyšších a vodních rostlin. Rtuť se v prostředí vyskytuje v několika formách. V půdě se nejčastěji vyskytuje v pevné fázi adsorbovaná na sulfidy, jílové částice a organické látky. Vysoké koncentrace rtuti jsou silně fyto toxické pro rostlinné buňky. Vyvolává oxidační stres, který vede k narušení buněčného metabolismu. U rýže (*Oryza sativa*) bylo pozorováno snížení výšky rostlin i sníženou tvorbu lat v přítomnosti rtuti. U rajčat (*Lycopersicon esculentum*) zase byla patrná snížená klíčivost semen i výška rostlin, kvetení i hmotnost plodů. Konečnou fází je chloróza celé rostliny následovaná úhynem.

Olovo je těžký kov, který po příjmu rostlinami většinou zůstane zadržován v kořenech. Nepřímo snižuje růst a má negativní vliv na morfologii a fotosyntézu. Zvýšené koncentrace olova podmiňují vznik oxidačního stresu. Podáváním olova rostlinám cukrové řepy docházelo ke snižování růstu a chlorózám. U stromu *Thespesia populnea* (L.) Sol. ex Corrêa zapříčinilo

olovo snížení nejen výšky stromu, ale i počtu listů a samotnou listovou plochu. U ovsa (*Avena sativa*) byla pozorována inhibice enzymů fixujících CO₂ (Asati et al. 2016).

3.4.6 Chróm, kobalt a arsen

Chróm je toxický kov pro rostliny i živočichy a jeden z nejškodlivějších prvků v životním prostředí (Peralta-Videa 2009). Vyvolává oxidační stres způsobující peroxidaci lipidů a následné poškození buněčných stěn. Oxidačním stresem jsou také degradovány fotosyntetické pigmenty a tento jev vede k potlačení růstu rostliny. Nadměrné množství chrómu v půdě snižuje klíčivost semen i růst kořenů. (Asati et al. 2016)

Kobalt patří mezi těžké kovy, které jsou však významné svou biologickou funkcí. Konkrétně kobalt je součástí několika enzymů i koenzymů (důležitý kofaktor vitamínu B₁₂). (Kobayashi 1999) Pro správný růst i metabolismus rostlin jsou malá množství kobaltu nezbytná. V sušině rostlin se kobalt obvykle nachází v rozmezí 0,002 – 0,5 ppm. Do rostlin se kobalt dostává kořeny i listy. Toxický potenciál kobaltu se ukazuje už při koncentraci 0,2 mg/g, které do sebe rostlina může nahromadit. Toxicita se projevuje formou chlorózy. (Richter 2004) S ostatními prvky tvoří komplexy. Fytotoxicita je závislá na vlastnostech těchto komplexů. Přirozeně se v zemské kůře vyskytuje ve formě minerálů jako jsou: kobaltit (CoAsS), linnéit (Co₃S₄) nebo smaltin (CoAs₃) (Asati et al. 2016).

Arsen rovněž působí na rostliny fytotoxicky. U rajčat snižuje hmotnost čerstvých listů. V řepce (*Brassica napus*) arsen působí na růst, kdy jsou rostliny zakrnělé, postižené chlorózou a v pozdějším stádiu nekrózou. Klíčivost semen a výšku sazenic snižují vysoké koncentrace arsenu také u rýže (Asati et al. 2016).

3.4.7 Nikl a železo

Nikl je prvek nezbytný pro normální růst rostlin. Přirozeně se v půdě vyskytuje v rozpětí 10-1000 mg na kilogram půdy. S rostoucím znečištěním životního prostředí přibývá i koncentrace niklu v půdách. V kontaminované oblasti lze naměřit v půdě i 30× více tohoto prvku, než jsou přirozené hodnoty. Jedná se o rozpětí koncentrace 200 až 26 000 miligramů niklu na kilogram kontaminované půdy. S nadbytkem se váží fyziologické změny. Příznaky toxicity se projevují jako chloróza či nekróza narušení rovnováhy živin. Vysoký příjem niklu rostlinami snižuje obsah vody u dvouděložných i jednoděložných rostlin.

Hlavní funkcí železa, jako biologicky aktivního prvku je jeho role v procesech fotosyntézy. Dostupnost z půdy je závislá na půdním pH. Se snižující se kyselostí půdy roste dostupnost železa pro rostliny. Železo je hlavní složkou redoxních systémů buněk, tedy hemových proteinů či peroxidáz. Fytotoxicita není příliš častá u železa, nicméně pokud nastane, projevuje se sníženým výnosem rostliny, sníženou schopností fotosyntetizovat a zvýšením míry oxidačního stresu, která s sebou nese další následky narušení buněčného metabolismu (Asati et al. 2016).

3.4.8 Mangan

Mangan je základní živinou pro fyziologické procesy rostlin, jako je fotosyntéza. Nedostatek manganu se pojí s písčítými půdami nebo tropickými zvětralými půdami. Toxicita se projevuje nekrotickými hnědými skvrnami na listech, řapících i stoncích. Pro nekrózu je

typické, že nejprve postihuje spodní listy a s postupujícím časem i horní část rostlin. V závislosti na čase se nekrózy rozšiřují a vrcholí úhynem rostliny. Toxicita je spojená s půdami s pH 5,5 nebo nižším. U máty klasnaté (*Mentha spicata*) nadbytek manganu snižuje obsah chlorofylu i karotenoidů (Asati et al. 2016).

3.4.9 Fytoremediace

Pojem fytoremediace představuje způsob použití rostlin k dekontaminaci znečištěného prostředí, konkrétně půdy nebo vody. Tento proces je velmi žádoucí jak z ekonomického hlediska, protože na uskutečnění nejsou potřeba vysoké náklady, tak z hlediska sociálního. Jedná se o veřejně přijatelný proces odstraňování kontaminantů z životního prostředí. V důsledku již výše zmíněných antropogenních činností nebo přírodních činností (eroze) se do půdy a povrchové i podzemní vody uvolňují nebezpečné sloučeniny pro živé organismy. Jedná se o látky povahy anorganické (těžké kovy) i organické (organické chemikálie uvolněné nejen z pesticidů a hnojiv). Akumulace těžkých kovů v půdě je z hlediska dopadu na životní prostředí jeden z hlavních globálních problémů (Madanan et al. 2021).

Fytofiltrace/rhizofiltrace je odstranění kontaminantů konkrétně z vodního prostředí. Rostlina má schopnost bioakumulovat kontaminující látky do své biomasy a odstraní je tak z vodního prostředí. Nejen živé rostliny slouží k absorbování nežádoucích látek, bylo prokázáno, že tímto způsobem funguje i již neživý rostlinný materiál. Živá/ neživá rostlinná biomasa do sebe zdárně absorbuje například chróm. Konkrétně vodní rostliny jsou specialisté na vychytávání a absorpci selenu. Mimo regenerace životního prostředí se fytofiltrace využívá i k opětovnému využití vychytených kovů, které jsou sice toxické, ale cenné. Příkladem může být technologie na odstranění a zpětného využití olova z odpadních vod, ke kterému byla úspěšně využita rostlina *Hemidesmus indicus* L.R.Br. Tato schopnost, odstraňovat z prostředí těžké kovy a znovu je využít byla pozorována v experimentech s vojtěškou (*Medicago sativa*), která úspěšně akumulovala Pb, Cr, Zn, Cu, Ni, a dokonce i zlato (Au) z vody. V laboratorních testech bylo zkoumáno několik druhů rostlin včetně výše zmíněné vojtěšky, nebo sóji. Tyto a další druhy rostlin účinně odstraňovaly dusičnany, hlavní kontaminanty zdrojů pitné vody v zemědělských oblastech.

Fytoextrakce je schopnost rostlin odstraňovat anorganické kontaminanty z půdy. Pro rostliny je přirozenou schopností přijímat anorganické látky z půdy. Některé z těchto látek jsou pro ně základní živinou. Nejčastějším způsobem příjmu je přesun iontů a molekul prvků kořeny přes plazmatickou membránu do cytoplazmy kořenových buněk, a to difúzním transportem nebo mikrobiálně usnadněnou difúzí. Jiným mechanismem je potom změna pH, která ovlivňuje transport kationtů a aniontů prostřednictvím protonové pumpy za spotřeby ATP. Pro většinu rostlin není typické uchovávat vyšší koncentrace anorganických látek v nadzemní biomase. Existují však výjimky, jedná se o takzvané hyperakumulační rostliny. Tyto rostliny tolerují v nadzemní biomase vysoké koncentrace těžkých kovů. Jsou proto vhodnými kandidáty při použití fytoextrakce k dekontaminaci půd. Nicméně nevýhodou těchto druhů/rodů je absence dalších žádoucích vlastností, které by pozitivně zvyšovaly efekt fytoextrakce (adaptabilita, velká nadzemní biomasa, rychlý růst). Jedná se o rody *Brassica* sp., *Thlaspi* sp., *Apocynum* sp. a další (Arthur 2005). Rostliny, které splnili svůj fytoremediační účel

a zamořenou oblast dekontaminovaly lze poté použít například pro účely bioenergie (Pathak & Shak 2021).

3.4.10 Vliv těžkých kovů na člověka

Hlavní nebezpečí pro lidské zdraví představují zejména kovy jako olovo, kadmium, rtuť a arsen. Lidstvo těžké kovy zná a využívá už tisíce let. Například olovo je lidstvu známo již nejméně 5000 let. Stejně tak jsou známé jejich negativní účinky na lidský organismus, ale jejich expozice se na některých oblastech pořád zvyšuje. Dále jsou popsány nežádoucí vlivy některých z nich na lidský organismus, protože se do těla dostávají nejen vodou a vdechnutím, ale také kontaminovanými potravinami, z nichž značná část je rostlinného původu (Järup 2003).

Kadmium se využívá v průmyslu, při výrobě PVC a je součástí slitin. Do životního prostředí se uvolňuje i zemědělskou činností z aplikace fosfátových hnojiv. Při vysokých expozicích olova na lidský organismus může nastat poškození ledvin, poškození kosterního aparátu (kombinace osteomalacie a osteoporózy) a také rakovina ledvin, neboť kadmium je lidský karcinogen (Järup 2003).

Rtuť je využívána v medicíně, například jako amalgamová zubní výplň. V jiných směrech se rtuť nachází v teploměrech a barometrech. Poškozuje plíce i ledviny, při kontaktu způsobuje ekzémy, protože je považována za alergen. Chronická otrava se vyznačuje třasem, poruchami spánku a osobnosti i rozvojem deprese, nicméně tyto příznaky s absencí kontaminace zmizí. Pravděpodobně zvyšuje riziko ischemické choroby srdeční (Järup 2003). Rovněž Martin & Griswold (2009) popisují, že rtuť má při dlouhodobé expozici negativní účinky na mozek, kdy ho může dokonce trvale poškodit, a stejně tak vyvíjející se plod.

Olovo je kov, který se dříve hojně uvolňoval do životního prostředí z olovnatého benzínu, naštěstí dnes již významně méně, neboť byly zavedeny bezolovnaté benzíny. Olovo však zůstává stále velmi nebezpečným prvkem pro živé organismy. U lidí se hromadí v kostech, kde je jeho biologický poločas až 20-30 let. Váže se v krevním řečišti na červené krvinky, zde je však biologický poločas pouze jeden měsíc. Způsobuje bolesti hlavy, břicha a má negativní vliv na nervový systém. Zvláště nebezpečným se stává pro děti, které jsou na více citlivé na hladiny olova. U dětí dochází při vysokých expozicích k poškození mozku (Järup 2003). Olovo se jeví dokonce jako lidský karcinogen a ovlivňuje negativně každý orgán v lidském těle. U žen může v souvislosti s vysokou koncentrací vyvolat potrat. Negativně působí i na mužský reprodukční systém (Martin & Griswold 2009).

Arsen je pro zdraví velmi nebezpečný prvek, způsobuje celou řadu velmi závažných zdravotních potíží. Jedná se o rakovinu plic, ledvin i kůže, onemocnění kardiovaskulárního systému i trávicího traktu. Přispívá k hypertenzi a neurologickým potížím. Do životního prostředí se dostává zejména z výroby energie pomocí fosilních paliv, tavení kovů, ale i při používání pesticidů (Järup 2003).

Více než přímo bioakumulace kovů rostlinami, představuje riziko jejich ulpívání na povrchu nadzemních částí. Vyšší riziko pro lidskou výživu představují listy, takže hlavně listová zelenina, dále kořeny, jak léčivých rostlin, tak kořeny kořenové zeleniny. Zvýšené riziko kovové kontaminace představují i plody, které jsou ve velmi těsné blízkosti s půdou, například jahody (Martin & Griswold 2009).

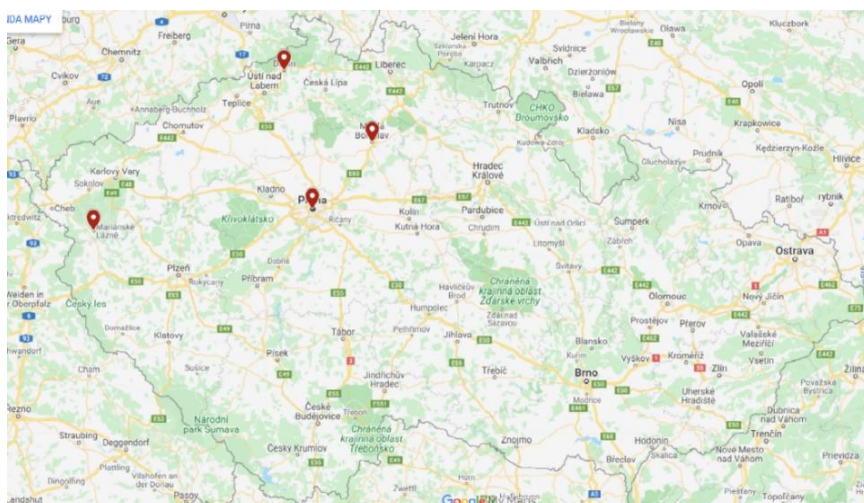
4 Metodika

V této kapitole je uvedeno zpracování rostlinného materiálu, jeho sběr, sušení a následně metody stanovení a postupy. Zohledněno je i počasí v daný čas sběru, které mohlo ovlivňovat výsledné hodnoty. Stanovení a pokusy s rostlinami byla v této bakalářské práci prováděna s ohledem na metodiky uváděné Českým lékopisem 2017 (dále jen ČL 2017). Předmětem výzkumu byly květy bezu černého (*S. nigra*). Celkem byl sběr proveden ve čtyřech odlišných oblastech České republiky. Pro každou oblast byla vybrána čtyři specifická místa, s výjimkou Mariánských Lázní, kde bylo sbíráno pouze na dvou lokalitách z důvodů komplikací souvisejících s epidemiologickou situací v roce 2020. Tři ze čtyř lokalit byly záměrně zvoleny s důrazem na ekologickou zátěž prostředí. Nejčastěji se jednalo o okraje frekventovaných komunikačních cest. Čtvrtý vzorek byl vždy naopak sbírán v oblastech, kde ekologické zatížení nebylo předpokládáno. Tento vzorek je určen ke srovnání a celkovému posouzení dané oblasti. Ve vzorcích byl stanoven obsah celkových polyfenolů (TPC), flavonoidů a těžkých kovů. Doplňkovou analýzou byla kalorimetrie. Nomenklatura botanických názvů druhů byla sjednocena dle Klíče ke květeně ČR (Slavík & Štěpánková 2011).

4.1 Charakteristika sběrných lokalit

Vzorky bezu černého byly sbírány ve čtyřech oblastech České republiky v průběhu června roku 2020 (Obrázek 12). Oblasti s GPS souřadnicemi jednotlivých lokalit byly následující: Praha, Mladá Boleslav, Děčín a Mariánské Lázně (Tabulky 1–4). Místa byla volena s ohledem na odhadované ekologicky zatížené oblasti, zejména pozemní dopravou. Z každé souřadnice jsou tedy tři výsledné vzorky, takže celkově bylo zkoumáno 42 vzorků květu bezu černého. Následující tabulky shrnují výčet oblastí, lokalit a údajů souvisejících se sběrem.

V příloze č. 1 jsou přiblížené mapy oblastí, kde jsou konkrétně vyznačená místa sběru. Dále jsou v příloze č. 2 graficky znázorněny údaje o ohlášených provoznách a emisích pro jednotlivé zmíněné oblasti, které tvoří značný podíl na ekologickém znečištění a zátěži. (ČHMÚ 2020) Příloha č. 3 pak uvádí fotografie z míst sběru, pro bližší charakterizaci okolí.



Obrázek 12. Sběrná místa vyznačená na mapě České republiky

Zdroj: (Google maps)

Tabulka 1. Oblast Praha

Oblast: Praha	GPS souřadnice	Datum sběru (D/M/R)
Lokalita		
Nuselský most	50.061231, 14.430855	9. 6. 2020
Křižovatka ulic Českobrodské a Pod Táborem	50.092375, 14.512875	9. 6. 2020
Spalovna Malešice	50.075088, 14.538136	9. 6. 2020
Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistá)	50.063920, 14.432570	11. 6. 2020

Tabulka 2. Oblast Mladá Boleslav

Oblast: Mladá Boleslav	GPS souřadnice	Datum sběru (D/M/R)
Lokalita		
MH-Přestavky	50.5257017, 15.0022467	7. 6. 2020
MB-most dálnice	50.4047806, 14.9300953	13. 6. 2020
Řepov–prostřední cesta (čistá)	50.4029206, 14.9438925	15. 6. 2020
MB-Olympia	50.4082542, 14.9361678	21. 6. 2020

Tabulka 3. Oblast Děčín

Oblast: Děčín	GPS souřadnice	Datum sběru (D/M/R)
Lokalita		
Benešovská železnice, pod mostem	50.777922, 14.221303	13. 6. 2020
Hlavní nádraží Lidl	50.772963, 14.201780	13. 6. 2020
Krokova, u železnice	50.771816, 14.233024	13. 6. 2020
Les Ludvíkovice (čistá)	50.791149, 14.249569	13. 6. 2020

Tabulka 4. Oblast Mariánské Lázně

Oblast: Mariánské Lázně	GPS souřadnice	Datum sběru (D/M/R)
Lokalita		
Úšovice hlavní silnice	49.9539722, 12.7119722	20. 6. 2020
CHKO, Židovský hřbitov (čistá)	49.9652778, 12.6875000	20. 6. 2020

4.1.1 Hydrometeorologická situace

Dle Českého hydrometeorologického ústavu byly zpětně shrnuty průměrné teploty a srážky pro červen 2020 v následující tabulce. Tabulka 5 odkazuje na tři kraje, tedy Karlovarský kraj, který zastupuje sběrné místo Mariánské Lázně. Ústecký kraj, který shrnuje údaje pro Děčín a nakonec Středočeský kraj společně s Prahou, který charakterizuje hned dvě sběrné lokality: Prahu a okolí Mladé Boleslavi. Pro upřesnění, vzhledem k velikosti Středočeského kraje, Prahu a Mladou Boleslav dělí vzdušnou čarou 50 kilometrů. Dále jsou v tabulce uvedeny i průměrné hodnoty k posouzení měsíce června na celém území České republiky.

Z Tabulky 5 vyplývá, že měsíc červen v roce 2020 byl srážkově nadprůměrný ve všech zmíněných krajích. Celkově v České republice byl úhrn srážek pro měsíc červen překonán téměř dvojnásobně oproti dlouhodobému srážkovému normálu. Teplota vzduchu byla taktéž nepatrně vyšší ve všech sběrných krajích než dlouhodobý teplotní normál. Průměrně byla na území celé České republiky vyšší o 0,6 °C.

Měsíc květen, ve kterém mohla hydrometeorologická situace také ovlivnit výsledné koncentrace, byl následující: z hlediska úhrnu srážek vůči srážkovému normálu z předchozích let byl květen průměrným měsícem s lehkou odchylkou. Procentuální úhrn srážek na území České republiky oproti normálu činil 109 %. Průměrná teplota vzduchu v České republice se od normálu z posledních let snížila o 2,1 °C (ČHMÚ 2020). Květen do tabulky nebyl zahrnut, jedná se pouze o doplňující informaci, hlavním sběrným měsícem byl červen.

Tabulka 5. Přehled srážek a teplot pro červen 2020

	T	N ¹	O	S	N ²	%
Středočeský kraj	17	16,5	0,5	120	70	171
Ústecký kraj	16,7	15,9	0,8	96	66	145
Karlovarský kraj	15,1	14,5	0,6	118	73	162
Česká republika	16,4	15,8	0,6	152	79	192

T = teplota vzduchu [°C]

N¹ = dlouhodobý normál teploty vzduchu 1981-2010 [°C]

O = odchylka od normálu [°C]

S = úhrn srážek [mm]

N² = dlouhodobý srážkový normál 1981-2010 [mm]

% = úhrn srážek v % normálu 1981–2010

4.2 Sběr a skladování materiálu

Květy bezu byly sbírány metodou samosběru za vhodných klimatických podmínek z plně kvetoucích rostlin, které byly předem řádně určeny, jako stejný botanický druh. Květy byly trhány (prvková analýza) či stříhány nůžkami (stanovení flavonoidů) a následně umístěny do vzorkovnic. Vzorky v nádobách byly patřičně označeny datumem a místem sběru. Následně byly konzervovány mrazem až do doby zpracování v laboratoři.

Další část materiálu, která byla určena k sušení se sbírala ve stejný okamžik s rozdílem skladování. Sušení proběhlo ihned po natrhání. Všechny vzorky byly sušeny stejným způsobem na sítích ve stejných podmínkách, tedy při pokojové teplotě mimo přímé sluneční paprsky. Po sušení byly uskladněny v papírových sáčcích na suchém místě až do doby zpracování.

4.3 Zpracování materiálu

Materiál byl zpracován především v závislosti na metodách analýz dle ČL 2017 nebo na základě jiných uvedených zdrojů (Vachová et al. 2017). Dále jsou jednotlivá zpracování rozepsána podle způsobu stanovení.

4.3.1 Stanovení obsahu flavonoidů

Pro stanovení obsahu flavonoidů byl použit sušený vzorek květů bezu černého. Pro přípravu základního roztoku bylo použito 0,6 g květu bezu, které byly homogenizovány v elektrickém mlýnku na prášek procházející sítím o velikosti ok 355 μm . Takto upravená droga byla ve 100ml baňce s kulatým dnem smíchána s 1 ml methenaminu (5 g/l), 2 ml HCl (250 g/l) a 20 ml acetonu. Do takto připraveného základního roztoku byl přidán varný kamínek a směs se vařila pod zpětným chladičem 30 minut (Obrázek 13).

Po uplynutí času varu se obsah baňky zfiltraval přes vatou do odměrné baňky. Ke zbytku směsi v baňce s kulatým dnem se přidal chomáček vaty, přes který se roztok filtroval, a extrahoval se ještě dvakrát 10 minut s přidavkem 20 ml acetonu. Po zchlazení se postup filtrace přes vatou pro každý roztok opakoval. Výsledné filtráty se společně přefiltrovaly do 100ml odměrné baňky, která se doplnila se po rysku acetonem.

20 ml výsledného roztoku se převedlo do dělicí nálevky, ke kterému se přidalo 20 ml destilované vody a následovalo protřepávání nejprve s 15 ml ethyl-acetátu, a pak třikrát stejnou látkou po 10 ml. Oddělené ethyl-acetátové vrstvy se spojily a společně s 50 ml destilované vody znovu dvakrát protřepaly. Poté se ethylacetátový extrakt zfiltraval přes 10 g síranu sodného bezvodého do odměrné baňky na 50 ml. Objem tohoto základního roztoku se doplnil do 50 ml ethyl-acetátem.

Následně se základní roztok o objemu 10 ml smíchával s 1 ml chloridu hlinitého a poté se zředil roztokem kyseliny octové ledové 5% v metanolu na objem 25 ml. Kontrolní vzorek se připravil jako roztok 10 ml základního roztoku zředěného roztokem kyseliny octové ledové 5% v metanolu na 25 ml (Obrázek 14). Po půl hodině se měřila absorbance při 425 nm základního vzorku proti kontrolnímu vzorku (Obrázek 16). Absorbance se měřila pomocí UV/VIS spektrofotometru Evolution 201 (Thermo Scientific). Procentuální obsah flavonoidů se následně vyjádřil jako isokvercitrin (Obrázek 15) podle vzorce:

$$\% \text{ obsah flavonoidů} = \frac{A * 1,25}{m}$$

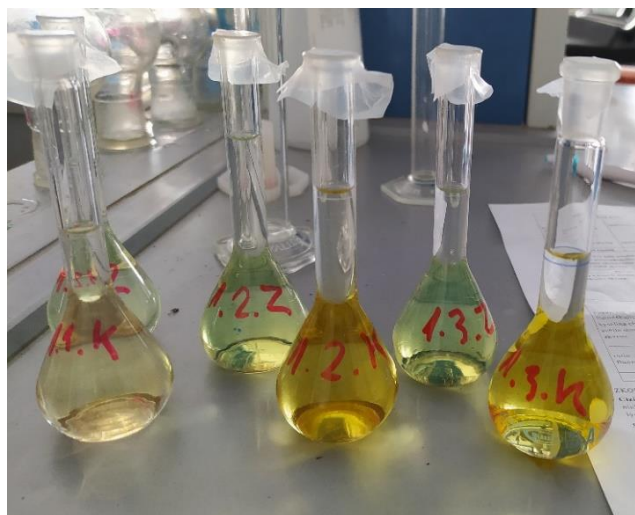
A= absorbance při 425 nm

M = hmotnost práškové drogy v gramech

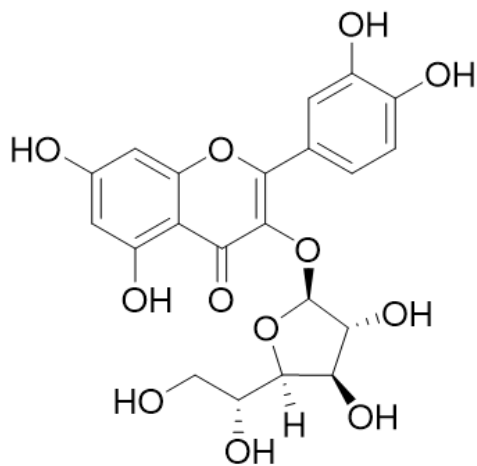


Obrázek 13. Extrakce vzorku v dělicí nálevce

(foto: autorka práce 2021)

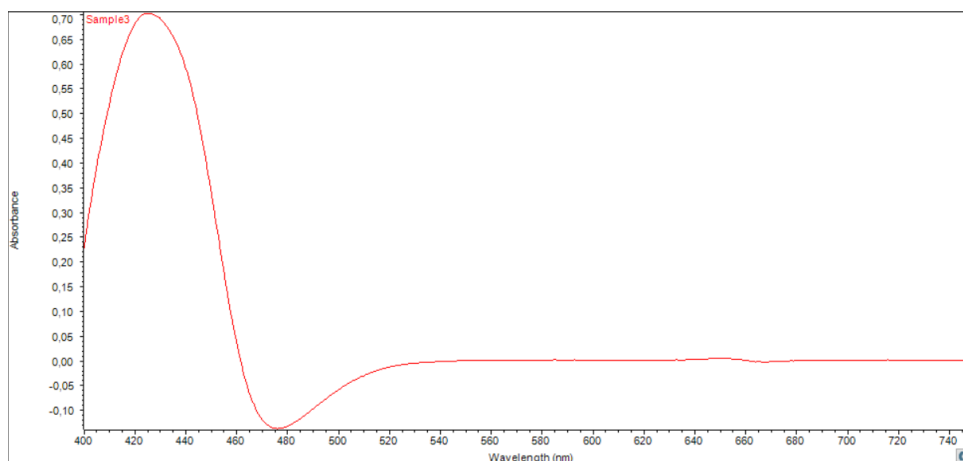


Obrázek 14. Kontrolní roztoky (K) a zkoušené roztoky (Z) připravené k následnému měření roztoku s isokvercitosidem



Obrázek 15. Isokvercitosid

(upraveno dle PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)



Obrázek 16. Křivka absorbance naměřená UV/VIS spektrofotometrem při 425 nm. (foto: autorka práce, 2021)

4.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC)

Stanovení obsahu celkových fenolových látek (TPC) bylo prováděno na základě upravené metodiky dle Marina et al. (2005). Objem 0,25 ml acetonového extraktu se smíchal s 0,75 ml Folin-Ciocalteova činidla. Po uplynutí šesti minut inkubace bylo přidáno 0,8 ml 7% roztoku uhličitanu sodného a roztok se doplnil destilovanou vodou na 2,5 ml. Měření vzorku probíhalo při 760 nm na UV/Vis spektrofotometru a obsah fenolů byl následně vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v mg/g sušiny.

4.3.3 Stanovení obsahu těžkých kovů

Pro stanovení obsahu těžkých kovů byly použity čerstvé květy bezu černého, které byly sbírány do vzorkovnic a uchovány v chladu, aby nedošlo k jejich degradaci před zpracováním. Po rozmražení vzorků bylo do nádob přidáno 100 ml 2M kyseliny dusičné. Takto byl vzorek protřepáván 10 minut. Po protřepání, tedy vymytí těžkých kovů z povrchu rostlinného materiálu do kyseliny, se roztok zfiltroval přes papír do odměrných baněk na 50 ml. Po získání toho extraktu byly vzorkovnice vymyty a vysušeny. Odečtením váhy čistých vzorkovnic od vzorkovnic se vzorky byla získaná navážka sušených květu bezu pro analýzu kovů. Takto připravené roztoky byly před analýzou naředěny desetkrát roztokem ultra čisté vody ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$; MilliQ system, Millipore, SAS, Francie) a následně podrobeny analýze na ICP-MS spektrometru, který zahrnoval následující součásti: autosampler ASX- 500, mikrokonzentrický zmlžovač MicroMist, dvouplášťovou Scottovu mlžnou komoru, oktapólovou kolizní/reakční celu a kvadrupólový filtr. Celkově bylo analyzováno 10 prvků, patřící mezi těžké kovy. Vlastní měření probíhalo v tzv. heliovém módu, který snižuje úroveň spektrálních polyatomických interferencí. Kalibrace přístroje proběhla metodou externí kalibrace s využitím víceprvkových roztoků analytů v rozmezí koncentrací 0,01 – 1000 mg/l (ASTASOL-MIX, Analytika, ČR) v 1,5% (m/v) HNO_3 (Analpure®, Analytika, ČR). Korekce matrice a driftu signálu analytů v čase proběhla metodou interního standardu s využitím víceprvkového roztoku obsahujícího 100 $\mu\text{g/l}$ Sc, Ge, Rh, In a Lu (ASTASOL- MIX, Analytika, ČR), který byl kontinuálně přiváděn do zmlžovače spolu se

vzorky. Výsledky byly následně zpracovány v programu MassHunter (Agilent, USA) a přepočteny z $\mu\text{g/l}$ na $\mu\text{g/kg}$.

4.3.4 Kalorimetrie

Metodou spalné kalorimetrie byl sledován obsah organických látek v rámci sušených květů. Tato metoda je založena na úplném spálení vzorku rostlinného materiálu v 100% kyslíkové atmosféře, při tlaku 30 MPa. Vzorky sušiny rostlinného materiálu se homogenizovaly na rychlomlýnku Pulverisette-14 (Fritsch) na velikost částic 0,1 mm. K měření byl použit suchý spalný adiabatický kalorimetr LAGET MS 10A (Laget, SRN). Na kalorimetru byl měřen tepelný skok na pět desetinných míst ve stupních Celsia. Pro stanovení spalného tepla rostlinného materiálu byly použity normy ČSN EN 14918 a ČSN ISO 1928.

Hodnota spalného tepla se vypočítá z opravného teplotního vzestupu a efektivní tepelné kapacity kalorimetru, se zřetelem na podíly energie při zapálení, spálení zapalovacího prostředku a tepelné účinky z vedlejších reakcí. Hodnota výhřevnosti vzorku se vypočítá z hodnoty spalného tepla, zmenšené o výparné teplo vody, vzniklé z paliva během hoření – po započítání oprav (spalné teplo kyseliny sírové a kyseliny dusičné).

Pro výpočet spalného tepla byl použit následující vztah:

$$Q = \frac{(C \cdot Dt) - c}{mv - mp}$$

Kde: Q = spalné teplo vzorku

C = tepelná kapacita kalorimetru

Dt = celkový vzestup teploty ($^{\circ}\text{C}$)

c = součet oprav (spalné teplo HNO_3 + H_2SO_4)

mv = hmotnost navážky vzorku

mp = hmotnost popelovin

4.3.5 Statistická analýza dat

One-way ANOVA byla použita k testování rozdílů vlivů prostředí na *S. nigra* v jednotlivých měřeních (celkový obsah polyfenolů – TPC, obsah flavonoidů, kalorimetrická stanovení a obsahy jednotlivých těžkých kovů). Průkazné rozdíly mezi průměry na hladině významnosti $\alpha=0,05$ byly dále testovány pomocí Tukey HSD post-hoc metody. Post-hoc testy se provádějí až po zamítnutí nulové hypotézy, kdy je zpravidla $p < 0,05$, a pomáhají nalézt homogenní skupiny v testovaných datech. Všechny výpočty byly provedeny pomocí softwaru STATISTICA 13.5 (Statsoft, Tulsa, USA) (Lepš & Šmilauer 2016).

4.4 Použité chemikálie a pomůcky

Seznam chemikálií:

- aceton
- acetonový extrakt
- ethyl-acetát
- Folin-Ciocalteovo činidlo
- chlorid hlinitý
- kyselina chlorovodíková
- kyselina octová ledová 5%
- kyselina dusičná 2M
NORMATOM® VWR
- methanol
- methenamin (5g/l)
- síran sodný bezvodý
- uhličitan sodný 7%
- voda destilovaná

Seznam použitých přístrojů a pomůcek:

- analytické váhy Ohaus Adventurer
AX324
- baňka s kulatým dnem
- buničina
- dělicí nálevka
- destilační aparatura
- filtrační papír
- gumičky
- ICP - MS hmotnostní spektrometr
- kalorimetr LAGET MS 10A (Laget,
SRN)
- kádinka
- kyvety
- laboratorní lžička
- nálevka
- odměrná baňka
- odměrný válec
- parafilm
- pipeta
- potravinová fólie
- rychlomlýnek Pulverisette-14
FRITCH
- síto 355
- skleněná tyčinka
- UV-Špektrofotometr EVOLUTION
201
- varný kamínek
- vata
- váženka
- vodní lázeň GFL 1041
- zavařovací sklenice s víčkem
- zpětný chladič

5 Výsledky

Metodika v této práci vycházela ze dvou stěžejních analýz, tedy stanovení sekundárních metabolitů a těžkých kovů a jedné doplňující metody v podobě kalorimetrie. Analýzy sekundárních metabolitů zkoumala celkový obsah polyfenolů a druhá obsah flavonoidů. Stanovení flavonoidů vycházelo z ČL 2017 a následně byly porovnány získaná data s hodnotami předepsanými lékopisem. Výsledné obsahy těžkých kovů byly také porovnány s ČL 2017, přestože ten udává hodnoty pro celkový obsah, ale nereflektuje povrchovou kontaminaci sledovanou v této práci. Zhodnoceny byly i hodnoty energie v jednotlivých vzorcích získané pomocí kalorimetrie. Tato kapitola má za cíl zhodnotit výsledné hodnoty vůči jednotlivým lokalitám a posléze i oblastem. Vyhodnotit nejvyšší a nejnižší obsahy a porovnat je vzájemně. Veškeré hodnoty a měření jsou následně převedeny na statistické údaje, na kterých je možné vyhodnotit jejich relevantnost. Veškeré naměřené hodnoty jsou průměrem tří měření \pm směrodatná odchylka/chyba. Data o distribuci byla podrobena jednosměrné analýze ANOVA spolu s Tukey HSD post-hoc testem.

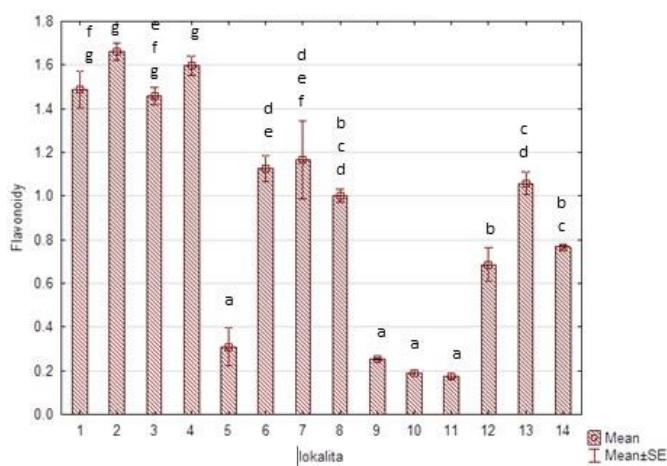
Tabulka 6. Číselné označení vzorků pro následné grafické interpretace výsledků

1	Nuselský most
2	Křižovatka - ul. Českobrodská x Pod Táborem
3	Spalovna Malešice
4	Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistý)
5	MH-Přestavky
6	MB-most dálnice
7	Řepov–prostřední cesta (čistý)
8	MB-Olympia
9	Benešovská železnice, pod mostem
10	Hlavní nádraží Lidl
11	Krokova, u železnice
12	Les Ludvíkovice (čistý)
13	Úšovice hlavní silnice
14	CHKO, Židovský hřbitov (čistý)

5.1 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů

Nejvyšší obsah flavonoidů (Obrázek 17), tedy 1,663 % byl změřen ve vzorku z oblasti Praha, konkrétně *Křižovatka - ul. Českobrodská x Pod Tábořem*. Oblast Praha vykazovala ve všech vzorcích nejvyšší procentuální podíl flavonoidů oproti ostatním oblastem. Dle statistiky se zde ale jednotlivé lokality významně nelišily. Naopak nejnižší hodnotou flavonoidů v květech bezu černého byla 0,176 %, a to v oblasti Děčína, konkrétně v lokalitě *Krokova, u železnice*. Tato lokalita se v obsahu těchto metabolitů statisticky neliší od ostatních zatížených lokalit Děčínska, avšak všechny tyto vzorky obsahovaly významně méně flavonoidů při porovnání s kontrolním místem oblasti, *Les Ludvíkovice (čistý)*. Obecně výsledné hodnoty flavonoidů ze zatížených lokalit pro oblast Děčína vyšly v průměru nejnižší ze všech zkoumaných oblastí, a s výjimkou lokality *Přestavky (Mladá Boleslav)*, byly významně nižší v porovnání se všemi ostatními sledovanými místy. U ostatních vzorků z Mladoboleslavska pak bylo naměřeno výrazně více flavonoidů, ale nebyl žádný rozdíl mezi zbylými kontaminovanými lokalitami a lokalitou čistou – *Řepov–prostřední cesta (čistý)*. V poslední oblasti, kterou byly Mariánské Lázně také nebyl pozorován dle provedené statistiky rozdíl. Nicméně jak ukazuje Obrázek 17, v čisté lokalitě *CHKO Židovský hřbitov*, květy bezu měly flavonoidů více.

Výsledky obsahu flavonoidů byly porovnány s ČL 2017, který stanovuje obsah flavonoidů pro květ bezu černého (*Sambucii flos*). Dle ČL 2017 sušený květ bezu černého by měl obsahovat nejméně 0,8 % flavonoidů, počítaných jako isokvercitrin. Celkem 6 ze 14 vzorků tuto minimální hranici procentuálního obsahu flavonoidů nespĺnilo, a nebyly by tak pro použití vhodné. Nejméně flavonoidů bylo naměřeno ve výše zmíněné lokalitě *Krokova, u železnice*, nicméně všechny lokality z oblasti Děčín vykazovaly hodnoty pod minimální mez. Další lokalita, která nespĺňovala limit ČL 2017 je *CHKO, Židovský hřbitov (čistý)* s hodnotou 0,766 %, která se však lišila od limitu pouze nepatrně. Poslední lokalitou, která má podlimitní obsah flavonoidů je v *MH-Přestavky* s hodnotou 0,397 %. Je jedinou lokalitou z oblasti Mladoboleslavska, která limit flavonoidů nespĺňuje.



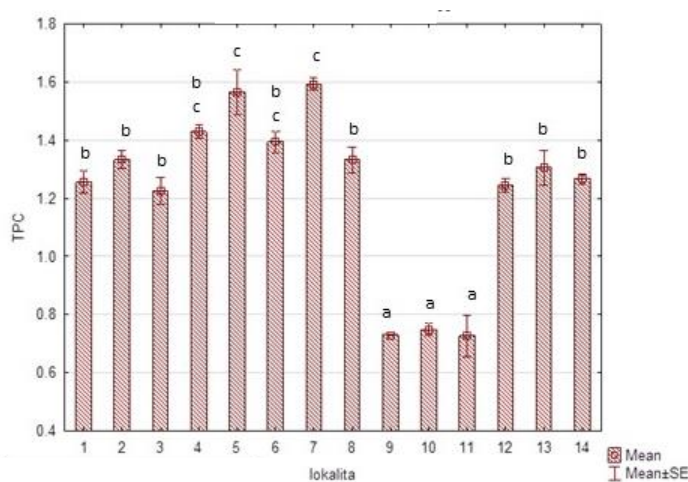
Obrázek 17. Výsledné obsahy flavonoidů v % a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ($F(13,28) = 61,894$; $p < 0,001$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.

5.2 Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolů (TPC)

Množství TPC je vyjádřeno v mg/g (Obrázek 18). Nejnížší hodnoty polyfenolů byly zjištěny opět v lokalitě *Krokova, u železnice* (Děčín), stejně jako u obsahu flavonoidů. TPC zde byl stanoven na 727 mg/g. Dle statistiky se tato lokalita neliší od ostatních ekologicky zatížených lokalit v dané oblasti, ale vyšší hodnoty metabolitů byly znovu potvrzeny v čisté lokalitě *Les Ludvíkovice* (1244 mg/g).

Nejvyšší hodnotu TPC v bezových květech lze najít v lokalitě *Řepov prostřední cesta(čistý)* z oblasti Mladoboleslava, kde byly naměřeny hodnoty 1593 mg/g TPC. Výsledky statistiky z ostatních lokalit zde odpovídaly těm u flavonoidů, ačkoli je také „čistá“. Nejvyšší naměřený TPC však neodpovídá stejné lokalitě, jako nejvyšší obsah flavonoidů (*Křižovatka- ul. Českobrodská x Pod Táborem, Praha*). Statisticky se od sebe tyto dvě lokality taktéž liší. Z hodnot vyplývá, že v lokalitě *Řepov prostřední cesta(čistý)* nebyl z celkového počtu polyfenolů nejvyšší podíl flavonoidů, ale jednalo se o jiné polyfenolové látky.

Nejnižší průměrné hodnoty polyfenolových látek připadají na oblast Děčínska, s výjimkou zvoleného kontrolního místa. Vysoké koncentrace TPC vykazovala i lokalita *Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistý)* z oblasti Praha (1565 mg/g). Statistická data ukazují, že toto kontrolní místo se nelišilo naměřenými hodnotami od lokality *Řepov prostřední cesta(čistý)*. Rozdíl nebyl patrný ani u dalších míst z Prahy, přesto tam byl pozorován nárůst oproti kontaminovaným lokalitám. Ani v oblasti Mariánských Lázní nebyla zaznamenána znatelná změna v závislosti na místě sběru.



Obrázek 18. Výsledné obsahy celkového počtu polyfenolů v mg/g a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ($F(13,28) = 46,329$; $p < 0,001$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.

5.3 Výsledky stanovení obsahu těžkých kovů

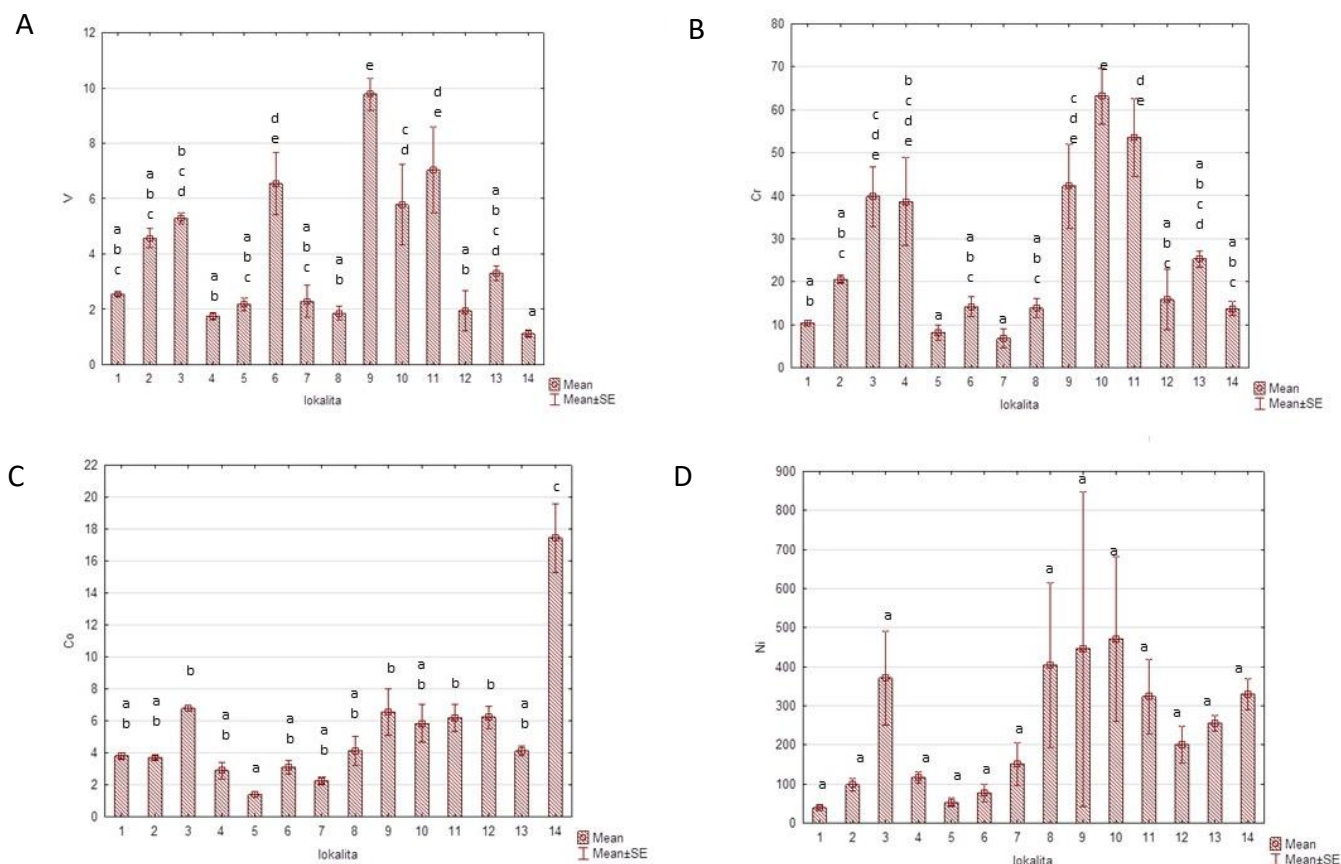
Cílem této analýzy bylo zjistit množství 10 vybraných těžkých kovů ve vzorku pomocí ICP-MS metody. Uvedené výsledné hodnoty jsou průměrem tří měření. Výsledné hodnoty pro jednotlivé kovy jsou zpracovány graficky (Obrázek 19, 20, 21).

Nejvyšší hladiny olova (Obrázek 20B) byly odhaleny v lokalitě *Spalovna Malešice* v okrese Praha. Zde bylo naměřeno až 79,474 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tato hodnota je více než 4x větší množství, které odpovídá nejnižší hodnotě ve stejné oblasti, tedy Praze. Statisticky se *Spalovna Malešice* liší od všech měřených lokalit s výjimkou *Benešovská železnice, pod mostem*, kde bylo naměřeno také vyšší množství olova (59,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Nejvyšší množství kobaltu (Obrázek 19C) ve vzorku bylo zjištěno v lokalitě *CHKO, Židovský hřbitov (čistý)*, který spadá pod sběrnou oblast Mariánských Lázní. Je pozoruhodné, že ačkoli se jedná o takzvaně „čistou“ lokalitu, množství kobaltu zde bylo téměř čtyřikrát vyšší než v druhé zkoumané lokalitě Mariánských lázní, která je ekologicky zatížená. Tato hodnota 15,437 $\mu\text{g}/\text{kg}$ výrazně převyšuje zbylé měřené lokality a statisticky se liší od všech ostatních vzorků.

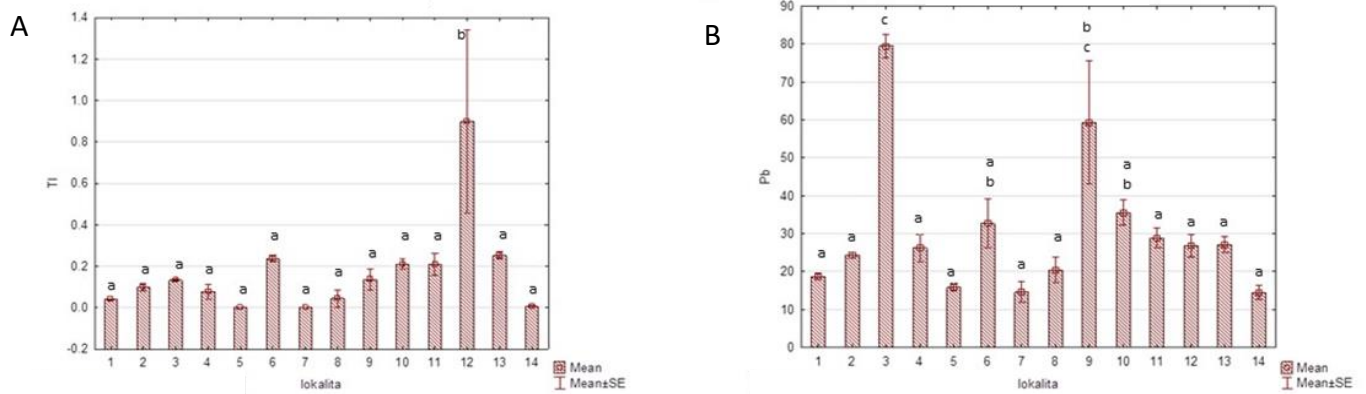
Nejvíce vanadu (Obrázek 19A) (9,773 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bylo naměřeno v lokalitě *Benešovská železnice, pod mostem*, která spadá pod Děčín. Oproti čistému vzorku ze stejné oblasti, tedy *Les Ludvíkovice (čistý)*, se jednalo o pětinasobné množství vanadu. Tato lokalita se neliší při porovnání se všemi měřenými lokalitami, pouze od *Krokova, u železnice*, která je ve stejné oblasti a také od lokality *MB-most dálnice*, která náleží Mladoboleslavsku. Obě lokality vykazovaly vyšší množství vanadu než zbytek měřených míst. V lokalitě *MB-Olympia* byly naměřené nejvyšší hodnoty pro prvek měď (Obrázek 21A). Měď zde byla v množství 1658,762 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Arsenu (Obrázek 21C) bylo zjištěno nejvíce 5,606 $\mu\text{g}/\text{kg}$ v lokalitě *Benešovská železnice, pod mostem*. Hodnoty pro měď i arsen se statisticky neliší od ostatních lokalit v oblasti Děčín. Chrom (Obrázek 19B) vykazoval nejvyšší hodnoty v lokalitě *Hlavní nádraží Lidl* s hodnotou 63,173 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a statisticky se neliší od ostatních znečištěných lokalit Děčínska, avšak liší se od čisté lokality ze stejné oblasti. Ve stejné lokalitě bylo i nejvíce niklu (Obrázek 19D) – 470,738 $\mu\text{g}/\text{kg}$. V případě niklu nebyl ale pozorován žádný průkazný statistický rozdíl mezi všemi sledovanými oblastmi. Velmi zajímavé hodnoty vykazuje lokalita *Les Ludvíkovice (čistý)*, která ačkoli měla sloužit spíše k porovnání zatížených lokalit, vykazuje hned tři prvky s nejvyšší hodnotou v tomto pozorování. Jedná se o zinek (Obrázek 21B) v koncentraci 4,991 mg/kg , kadmium (Obrázek 21D), které je zde významně vyšší než ve všech pozorovaných lokalitách. Průměr koncentrací kadmia 13 ostatních lokalit činí 1,255 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Lokalita *Les Ludvíkovice (čistý)* převyšuje svojí koncentrací 3,523 $\mu\text{g}/\text{kg}$ průměrnou hodnotu více jak 2,5 \times . Zinek se v této lokalitě svou hodnotou neliší od všech lokalit v oblasti Děčín a Mariánské Lázně, avšak kadmium se neliší pouze od lokalit: *Spalovna Malešice* a *Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistý)*. Thalium (Obrázek 20A) se zde nachází v koncentraci 0,898 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a liší se prokazatelně od všech ostatních vzorků.

Obecně nejnižší hodnoty těžkých kovů vycházely pro oblast Mladoboleslavska a nejvyšší pro Děčín v Ústeckém kraji. Překvapivé hodnoty vyšly pro lokalitu *Les Ludvíkovice (čistý)*, u které nebyly vysoké hodnoty těžkých kovů očekávány a pro lokalitu *CHKO, Židovský hřbitov (čistý)*, kde vyšly velmi vysoké hodnoty kobaltu v porovnání s ostatními lokalitami. Opět se jednalo o „čistou“ lokalitu s neočekávanou nejvyšší hodnotou. Na základně výsledků

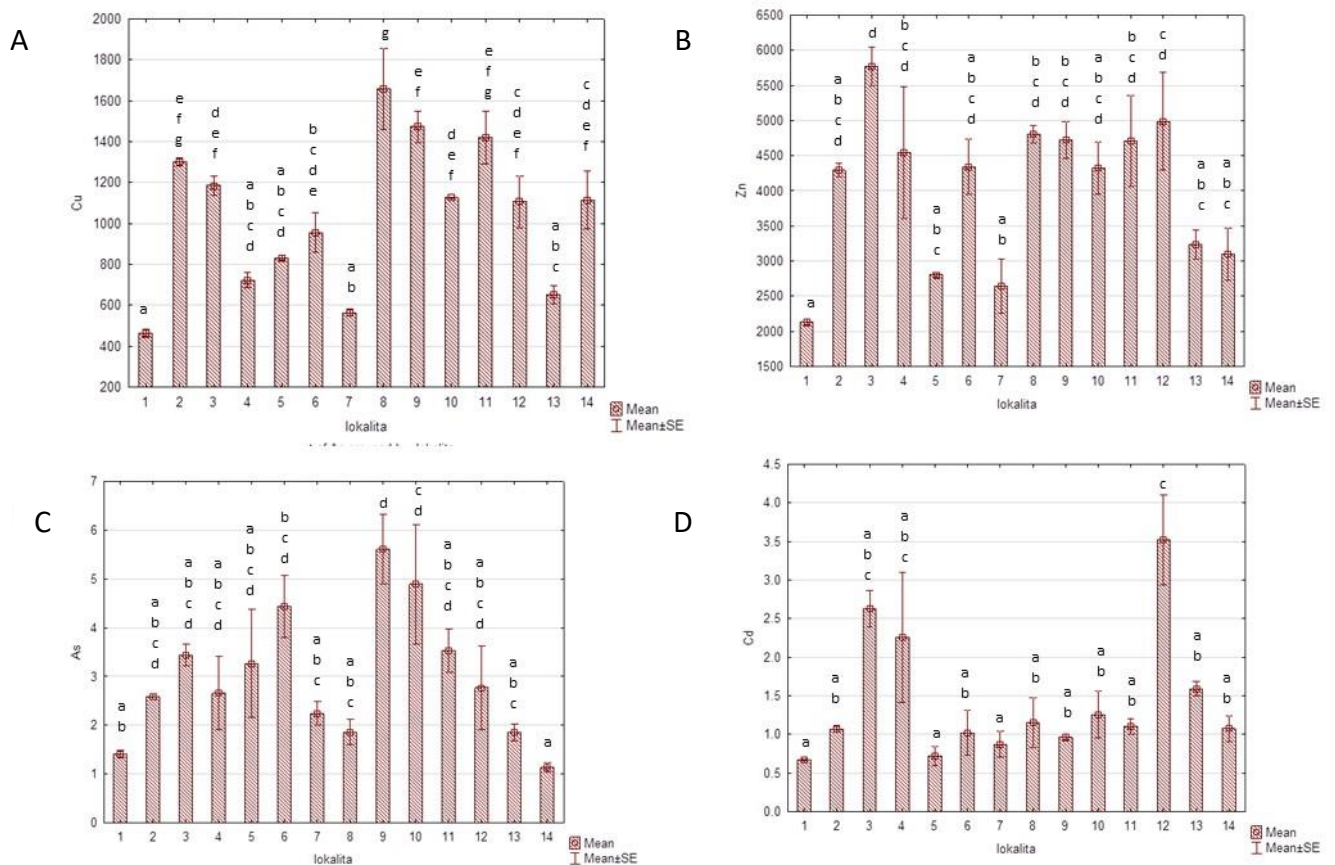
se ukazuje, že rostliny rostoucí na zdánlivě těžkými kovy nezasaženém místě mohou představovat potenciální riziko.



Obrázek 19. Výsledné obsahy těžkých kovů v µg/kg a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA pro A (vanad $F(13,28) = 12,4748$; $p < 0,001$), B (chrom $F(13,28) = 10,2229$; $p < 0,001$), C (kobalt $F(13,28) = 19,2843$; $p < 0,001$) a D (nikl $F(13,28) = 1,149$; $p = 0,363$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny



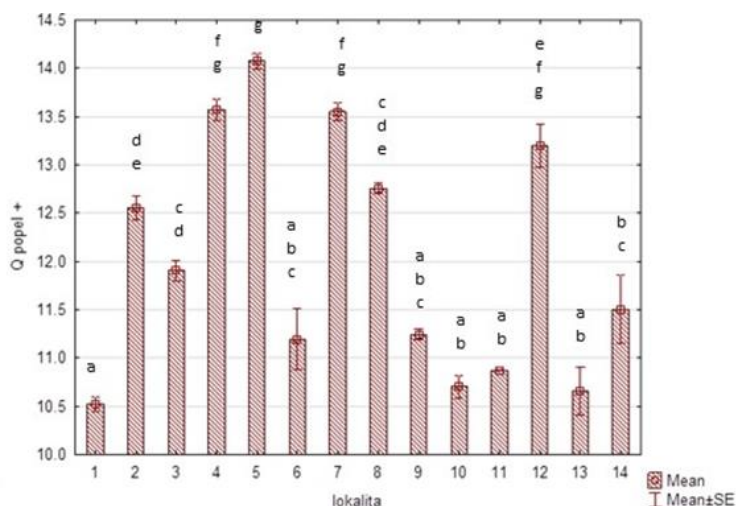
Obrázek 20. Výsledné obsahy těžkých kovů v $\mu\text{g}/\text{kg}$ a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA pro A (thallium $F(13,28) = 3,534$; $p = 0,0025$), B (olovo $F(13,28) = 12,1681$; $p < 0,001$) provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny



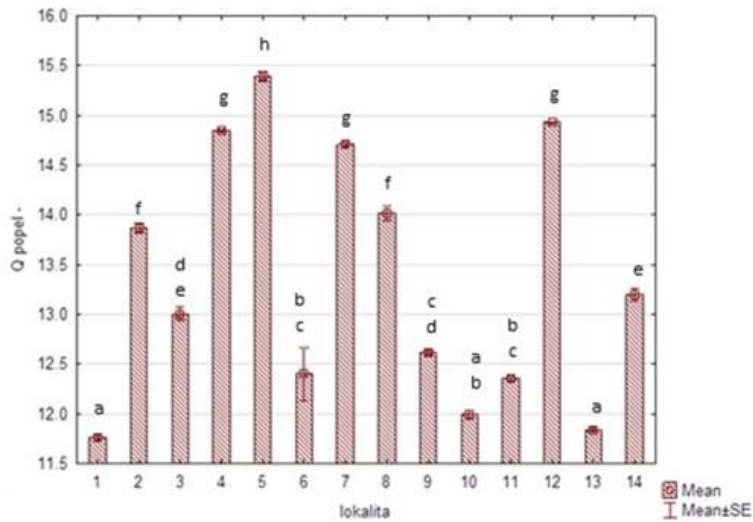
Obrázek 21. Výsledné obsahy těžkých kovů v $\mu\text{g}/\text{kg}$ a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA pro A (měď $F(13,28) = 16,0895$; $p < 0,001$), B (zinek $F(13,28) = 6,003$; $p < 0,001$), C (arsen $F(13,28) = 4,4973$; $p < 0,001$) a D (kadmium $F(13,28) = 6,3411$ $p < 0,001$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.

Výsledky kalorimetrie

Na základně výsledků kalorimetrie (Obrázek 22) posuzujeme zejména obsah vytvořených organických látek. Nejvyšší hodnoty odpovídají lokalitě *MH-Přestavlky*, kde bylo naměřeno spalné teplo s popelem 14,08 kJ/g. Tato lokalita se dle statistiky neliší pouze od vzorků číslo 4 - *Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistý)*, 7 - *Řepov prostřední cesta (čistý)* a 12 - *Les Ludvíkovice (čistý)*. Všechny shodné lokality odpovídají předpokládaným čistým sběrným místům, která slouží jako porovnání s ekologicky zatíženými lokalitami. Čtvrtou čistou lokalitou je *CHKO, Židovský hřbitov (čistý)*, ta se statisticky liší od všech výše uvedených čistých míst. Spalné teplo bez popelovin vyšlo následovně: 15,39 kJ/g. Dle statistického testu se lokalita *MH-Přestavlky* s touto hodnotou spalného tepla liší od všech lokalit. Statisticky neprůkazné rozdíly pak byly zjištěny mezi výše zmíněnými kontrolními lokalitami (4, 7, 12). Naopak nejnižší hodnoty pocházely ze vzorku odpovídajícímu lokalitě *Nuselský most*. Spalné teplo s popelem zde vykazovalo hodnotu 14,08 kJ/g a bez popelovin 15,39 kJ/g. *Nuselský most* se statisticky neliší od lokalit číslo 6, 9, 10, 11 a 13, tedy lokalit vybraných jako kontaminované.



Obrázek 22. Výsledné obsahy spalného tepla s popelem v kJ/g a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ($F(13,28) = 51,2444$; $p < 0,001$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.



Obrázek 23. Výsledné obsahy spalného tepla bez popelovin v kJ/g a dále v grafu zobrazeny výsledky jednocestné ANOVA ($F(13,28) = 239,064$; $p < 0,001$) po provedeném post hoc Tukeyho testu. Stejná písmena označují homogenní skupiny.

6 Diskuze

Tato bakalářská práce má za cíl porovnat nejen obsahy celkových polyfenolů, flavonoidů a těžkých kovů v květech bezu černého, který byl záměrně sbírán v ekologicky narušených oblastech, ale i zhodnotit jednotlivá stanovení v závislosti na sobě. Hodnoty výsledků jsou porovnány s ČL 2017 a jinými dostupnými zdroji a podrobeny statistice.

S ohledem na variabilitu podmínek růstu, lokalit a času sběru jednotlivých vzorků je potřeba počítat s možnými odchylkami, které se ve výsledcích mohou objevovat. Obsah bioaktivních látek v rostlinách, tedy i flavonoidů je závislý na řadě faktorů, kterými jsou geografické podmínky (nadmořská výška, typ reliéfu, zeměpisná šířka), či klimatické faktory, zejména teplota, srážky a s nimi související vlhkost (Hayat et al. 2020). Dle údajů z Tabulky 5 lze vyčíst, že nejvyšší úhrn srážek i nejvyšší teplota byla naměřena ve Středočeském kraji, tedy odpovídající oblasti Praha a Mladoboleslavsko, kde bylo také, až na výjimku, naměřeno nadlimitní množství obsahu flavonoidů oproti Děčínsku, kde byly teploty a srážky naopak nejnižší.

Rozdíly v obsahu flavonoidů v závislosti na místě sběru pak mohly být pravděpodobně způsobeny právě teplotou vzduchu i rozdílnými úhrny srážek. V ovoci a zelenině byla potvrzena souvislost mezi obsahem antioxidantních sloučenin a vnějším prostředím, které ovlivňuje růst. V teplých a suchých oblastech bylo dle studií naměřeno v rostlinném materiálu více polyfenolových látek než v chladném a vlhkém prostředí. V závislosti na teplotě lze konstatovat, že i v tomto experimentu byl pozorován vyšší obsah polyfenolů s rostoucí teplotou vzduchu. Fenolové sloučeniny v květech jsou ovlivněny také genotypem a podmínkách extrakce vzorků. Při vyšších teplotách extrakce byl pozorován nižší obsah fenolových sloučenin (Tolic 2017).

Dle studie (Młynarczyk 2020) byl naměřen TPC 194 mg/g v sušených květech bezu černého. Naměřené hodnoty TPC v této práci jsou ovšem mnohonásobně vyšší. Výsledky tohoto experimentu vykazují nejvyšší hodnoty TPC (Obrázek 18) až 1593 mg/g sušeného vzorku, což je v porovnání s hodnotou uvedené studie osmkrát více. I nejnižší obsah TPC (727 mg/g) přesahuje výrazně hodnoty z této studie. Přímo isokvercitrósidu, na který byl stanovován obsah flavonoidů v této bakalářské práci, bylo dle výsledků Młynarczyk (2020) 0,4- 1,9 mg/g v jimi sušené droze, což odpovídá 0,04-0,19 % (w/w). Průměrné výsledné hodnoty v této práci odpovídající obsahu isokvercitrósidu (Obrázek 17), vyšly výrazně vyšší, pouze dvě nejnižší hodnoty odpovídaly obsahům naměřeným ve výše zmíněné studii. Byly to lokality *Krokova, u železnice* a *Hlavní nádraží Lidl*, které obě spadají do oblasti Děčínska.

V experimentu z roku 2019, který proběhl u bezinek divoce rostoucích keřů sbíraných ve Španělsku, byl zjištěn TPC v rozsahu 2524-3157 mg/g. Při porovnání s touto prací je nutné brát v potaz skutečnost, že se jednalo o plody, nikoli květy (Domínguez et al. 2020). Nicméně květy mohou obsahovat polyfenolových látek výrazně více ve srovnání s listy a plody (Młynarczyk 2020). Lze tedy předpokládat, že koncentrace v květech stejné rostliny by mohly dosahovat i ještě vyšších hodnot, nicméně při porovnání naměřených koncentrací se studií Domínguez et al. (2020), byly naměřené hodnoty nižší. Při srovnání rozpětí koncentrací TPC v této práci (727- 593 mg/g) nedosahovaly hodnoty ani nejnižší hranice obsahu polyfenolů naměřených ve Španělsku.

Obsah flavonoidů ve studii Kolodziej et al. (2012) byl měřen na základě vzdálenosti dopravní komunikace od stanoviště bezového keře. Stanovení proběhlo lehce odlišnou metodou od stanovení v tomto experimentu. Kolodziej et al. (2012) stanovovali obsah flavonoidů z povrchu květů spalnou metodou, která se lehce liší od oplachové metody, jež byla použita v tomto experimentu. Bylo naměřeno rozpětí flavonoidů od 1,56 %, které bylo naměřeno v čistém nezatíženém prostředí až 0,55 %, které bylo naopak naměřeno ve vzorku materiálu z keře v těsné blízkosti silnice. Při porovnání s našimi výsledky se jedná o velmi podobné rozpětí obsahů, nicméně s výrazně nižší spodní hranicí. Obsah flavonoidů odpovídal rozsahu od 0,176 % až 1,66 %. Horní hranice však neodpovídala čisté lokalitě, nýbrž lokalitě *Křižovatka - ul. Českobrodská x Pod Táborem* z oblasti Praha, která je sbírána z ekologicky zatíženého prostředí. Nejnižší hranice v lokalitě *Krokova, u železnice* ale bylo také místo s možnou kontaminací.

Těžké kovy přítomné ve sbíraných květech bezu lze v této práci posuzovat na základně několika hledisek. Do rostlinné biomasy se těžké kovy dostávají nejen z půdního prostředí, ale i z ovzduší. V případě vzorků této práce se mohlo jednat o kovy, které pouze ulpívaly na povrchu květů, tím pádem nebyly zabudovány v rostlinné biomase, zdravotní riziko pro případného konzumenta květů či potravinářských výrobků z těchto květů, stále zůstává. (Gajbhiye et al.) Český hydrometeorologický ústav vydal za rok 2019 zprávu o hladinách některých prvků v ovzduší České republiky, ačkoliv se nejedná přímo o rok sběru (červen 2020), je tato zpráva nejaktuálnějším zhodnocením ovzduší nad Českou republikou. Žádný ze zkoumaných prvků, tedy Ni, Cd, Pb a As svůj roční limit imisí v roce 2019 nepřekonal. Roční průměr arsenu oproti roku 2018 poklesl, avšak jednou z oblastí nejvíce zatíženou arsenem je sběrné místo Praha. U kadmia i olova byl zaznamenán roční nárůst. Průměrné koncentrace kadmia se zvýšily o 20 % a olova o 9 % (oproti roku 2018). Příloha 2. odkazuje na zdroje znečišťování jednotlivých sběrných okresů. Jedná se o grafické znázornění ohlášených provozoven a emisí, které jsou zdroji znečištění ovzduší. Z těchto zdrojů vyplývá, že nejvíce zasaženou oblastí je Praha, kde je nahlášeno 451 těchto zdrojů. V okreseu Cheb, do kterého spadají Mariánské Lázně je hlášeno 91 takových zdrojů. Pro okres Mladá Boleslav je hlášeno 109 provozoven či emisí a pro okres Děčín 103 (ČHMÚ 2019).

Na základně těchto skutečností lze předpokládat nejvyšší koncentrace těžkých kovů v Praze, kde je nejvíce emisních znečišťovatelů a nejméně v Mariánských Lázních, kde je emisních producentů naopak nejméně. Avšak vzhledem k situaci, která se na jaře roku 2020 uskutečnila, tedy omezení průmyslu a dopravy následkem koronaviru, se dle studie (EEA 2020) v evropských městech snížila koncentrace jemných částic v ovzduší, což mohlo do jisté míry výsledky ovlivnit. Vzorky lze posuzovat i konkrétně na základě blízkosti a velikosti jednotlivých znečišťovatelů prostředí. Mladoboleslavsko je známé svým velmi rozsáhlým komplexem automobilového závodu Škoda a přidruženou silnou automobilovou dopravou ve městě a jeho okolí. V Praze lze najít celou škálu faktorů ovlivňující životní prostředí, od frekventované dopravy až po místa, jako největší spalovna v České republice v Malešicích, na kterou byl kladen důraz při výběru sběrné lokality. Děčínsko, které také často trápí zhoršená smogová situace stejně jako Prahu, náleží do Ústeckého kraje, který je silně průmyslovou a těžební oblastí. Za zmínku stojí i významný železniční uzel, provoz starých topenišť a velmi nízká nadmořská výška, které také mohou ovlivňovat vzniklé rozdíly mezi zmíněnými oblastmi. (Google maps 2021; ČT24 2014. Mariánské Lázně jsou známé jako lázeňské město

v blízkosti CHKO Slavkovského lesa, zde se tedy neočekávaly výrazné koncentrace těžkých kovů.

Bylo hodnoceno i počasí za měsíc červen (Tabulka 5), ve kterém sběr květů proběhl. K hodnocení byl připojen i měsíc květen, který mohl svou hydrometeorologickou situací také ovlivnit výsledné koncentrace. Květen 2020 byl průměrným měsícem s lehkou odchylkou v porovnání s normálem teplot i srážek v minulých letech. Červen 2020 byl svým srážkovým úhrnem ve všech sběrných krajích nadprůměrný. Celkově na území České republiky byl měsíční úhrn srážek za červen překonán oproti dlouhodobému teplotnímu normálu téměř dvojnásobně. Déšť, zejména pak kyselý, je spjatý s biologickou dostupností těžkých kovů v půdě, protože může ovlivňovat vstřebání kovů rostlinami. Studie prokázaly, že je u rostlin zvýšená akumulace těžkých kovů z půdy v závislosti na pH deště působícího na rostlinu a její okolí. S klesajícím pH roste schopnost rostlin akumulovat z půdy Cu, Cd, Pb a Zn. Olovo se účinkem kyselého deště pouze mění na dostupnější formu (Kim 2010). Podmínky, jako stresové růstové prostředí, zvyšují pravděpodobnost bioakumulace těžkých kovů. Stresem pro rostliny může být i sucho nebo nedostatek ostatních minerálních látek, kdy nedostatek zinku může ovlivnit pravděpodobnost bioakumulace kovů (Martin & Griswold 2009).

I půdní prostředí má zásadní vliv na elementární složení rostlinného těla. Květy na rozdíl od plodů či listů jsou poměrně vzdálené části rostliny v souvislosti s jejím kontaktem s půdou. Kvůli zachování procesů reprodukce je do květů omezený transport i hromadění případných toxinů, které by právě mohly negativně ovlivnit tvorbu pohlavních buněk. Studie poukazují na fakt, že bez černý není vybaven bioakumulačním mechanismem těžkých kovů v květech. *S. nigra*, i v závislosti na jeho toleranci k široké škále stanovišť, lze tedy pěstovat i na místech s horšími půdními parametry, aniž by byla zásadně ovlivněna jeho prospěšnost při následné konzumaci (Topolska 2020).

Z hlediska rizika pro konzumenty lze výsledné koncentrace porovnávat s limity, které stanovují maximální přípustné koncentrace těžkých kovů. Nařízení Komise (EU) č. 1881/2006 stanovuje maximální přípustné limity pro některé druhy potravin. Sbírané květy bezu lze zařadit do kategorie, pojednávající mimo jiné i o listové zelenině a čerstvých bylinách. Z hlediska plodů bezu a častého využití bezových květů k tvorbě sirupů, jsou v této práci uvedeny i limity olova pro bobuloviny a drobné ovoce i ovocné šťávy. Zejména ke komplexnímu hodnocení potenciálního rizika pro konzumenty nadzemních částí vybraných zkoumaných rostlin. Maximální přípustný limit olova v listové zelenině a čerstvých bylinách činí dle výše zmíněného nařízení 0,3 mg/kg (300 µg/kg). V drobném ovoci a bobulovinách se jedná o hodnoty 0,2 mg/kg (200 µg/kg) a v ovocných šťávách/nektarech je limit pouze 0,05 mg/kg (50 µg/kg) čerstvé hmotnosti. Limit pro olovo nebyl pro nejpřesnější kategorii, tedy čerstvých bylin, překonán. Jediný potenciální přesah limitu byl zaznamenán v kategorii ovocné šťávy a nektary, který byl překročen ve vzorku 3 – *Spalovna Malešice* o téměř 30 µg a ve vzorku 9 - *Benešovská železnice*, pod mostem o necelých 10 µg (Obrázek 20B). Výroba ovocné šťávy z rostlin sbíraných v těchto lokalitách by byla tedy riziková a nemusela odpovídat uvedenému Evropskému nařízení. Nicméně tento výsledek není příliš relevantní vzhledem k povaze vzorku, tedy bezových květů, nikoli plodů. Maximální limit kadmia je v čerstvých bylinách stanoven na 0,2 mg/kg (200 µg/kg). Tento limit nebyl v žádné lokalitě překročen (1881/2006/ES) (Obrázek 21D).

ČL 2017 uvádí parametry pro sušené rostlinné drogy a v nich mimo jiné i limity pro těžké kovy. Zabývá se pouze kadmíem, olovem a rtuť. Posouzení obsahu rtuťi bylo z práce vynecháno vzhledem k odlišnému stanovení obsahu. Lékopis stanovuje pro kadmium limit maximálně 1 µg/g. Vzhledem k povaze uvedených výsledků (Obrázek 19, 20, 21) byla tato hodnota převedena na 1000 µg/kg. Limitní koncentrace olova jsou maximálně 5 µg/g, tedy 5000 µg/kg. Ani jeden z výše uvedených limitů nebyl ve vzorcích překročen, nicméně je počítat s odlišným způsobem přípravy vzorku a metodiku stanovení. S ohledem na provedené studie byla podobná analýza květů bezu černého ze zatížených oblastí proběhla v jihovýchodním Polsku v roce 2009. Jednotlivé hodnoty byly převedeny na totožné koncentrace a porovnány. Měď v polském experimentu vykazovala rozpětí hodnot od 5,28–16,10 mg/kg (5280–16100 µg/kg), které jsou mnohonásobně vyšší než nejvyšší koncentrace naměřená v tomto experimentu (Obrázek 21A), tedy 1658,8 µg/kg. Hodnoty zinku se pohybovaly mezi 23,92–39,29 mg/kg (2392–3929 µg/kg). Výsledná nejvyšší koncentrace zinku (Obrázek 21B) v této práci byla vyšší téměř o 1000 µg, pozoruhodný je fakt, že se jednalo o „čistou“ lokalitu *Les Ludvíkovice (čistý)*, která svou koncentrací zinku převyšuje i nejvyšší koncentraci ekologicky zatíženého místa v polském experimentu. Rozpětí pro zinek ve čtyřech sledovaných oblastech v ČR činí 2127,7–4991,5 µg/kg.

Při porovnání koncentrací chromu bylo zjištěno, že pro analýzu bakalářské práce vyšly mnohonásobně nižší koncentrace (Obrázek 19B) oproti polskému měření. Koncentrace činily pro ČR 6,75 – 63,2 µg/kg proti Polsku s 0,63–2,31 mg/kg (630–2310 µg/kg). Koncentrace pro nikl (Obrázek 19D) za Polsko byla v rozmezí 0,252 –1,531 mg/kg (252–1531 µg/kg) a ČR 38,8 – 470,7 µg/kg. Z porovnání je patrné, že se koncentrace prolínají, avšak polská studie naměřila vyšší koncentrace niklu. Pro kadmium platí rozsah zjištěných hodnot 0,002 –0,040 mg/kg (2–40 µg/kg) za Polsko a 0,668 –3,523 µg/kg pro ČR.

Posledním shodným prvkem v tomto porovnání je olovo. V Polsku se objevilo celkem pět vzorků květů bezu černého, které vykazovaly nulové hodnoty pro olovo. Při měření českých vzorků byly zjištěny hodnoty v následujícím rozpětí: 12,821 –79,47 µg/kg a v každém vzorku se olovo nacházelo. Rozpětí nejvyšší hodnoty a nejmenší nenulové hodnoty u sledovaných lokalit pro polský experiment je 0,004 –0,369 mg/kg (4–369 µg/kg). Toto srovnání jistě ovlivňuje mnoho faktorů počínaje sběrem až po časovou osu, kdy data sběru dělí 11 let, avšak na základě výše zmíněných faktů lze usuzovat že koncentrace zinku a olova je v závislosti na vzdálenosti rostliny od zdroje znečištění, v tomto případě od zdroje komunikace. (Kolodziej et al.2012).

Podobným měřením se zabýval také experiment u květů bezu černého sbíraných v květnu 2018 v Krakově, v jižním Polsku. Tato analýza zkoumala obsah těžkých kovů v rostlinách v těsné blízkosti znečištění – pozemní komunikace a několik vzorků mimo tuto ekologickou zátěž. Výsledky byly porovnány s výsledky experimentu této práce. Mezi měřené prvky shodné v těchto velmi podobných měření patří chrom, měď a zinek, jejich koncentrace vyšly, po převedení na stejnou jednotku pro lepší porovnání, následovně Cr: 300–1900 µg/kg, Cu: 11600–17400 µg/kg, Zn: 6000–48700 µg/kg. Spodní hranice koncentrací zinku z Krakova je o více než 1000 µg vyšší než nejvyšší naměřená koncentrace v tomto experimentu, mnohonásobně vyšší je i koncentrace mědi. Nejvyšší koncentrace z České republiky (1658,8 µg/kg) je téměř sedminásobkem nejnižší koncentrace z Polska

(11600 µg/kg). Chróm opět vycházel nižší v České republice (6,75 –63,2 µg/kg) při porovnání s Krakovem (300–1900 µg/kg) (Topolska 2020).

Metoda spalné kalorimetrie poskytla hodnoty spalného tepla s popelem (Obrázek 22) a bez popela (Obrázek 23). Tato destruktivní metoda je vhodná, mimo měření využití energie v metabolismu, i k posuzování vlivu faktorů prostředí na obsahové látky rostlin. Bylo zjištěno, že vzorky rostlin rostoucích v prostředí, které vykazuje známky antropogenního znečištění nebo v přímé blízkost dálnic, mají po spálení vyšší hodnotu spalného tepla s popelem oproti vzorkům z míst bez znečištění (Hnilička et al 2020). Tento jev u sušených květů bezu nebyl naměřenými hodnotami potvrzen, naopak v místech znečištění vyšly nižší hodnoty spalného tepla s popelem než v čistých lokalitách. To je v souladu s teorií o negativním vlivu abiotických stresových faktorů, mezi které těžké kovy patří, na energetickou hmotu v rostlině (Hnilička et al. 2015). Tento fakt odpovídá i hodnotám zjištěným v této bakalářské práci, kde v lokalitách 10 a 11, ve kterých průměrně vyšly nejvyšší obsahy těžkých kovů a zároveň jedny z nejnižších obsahů TPC i flavonoidů, byly naměřeny velmi nízké hodnoty oproti ostatním vzorkům. Průměrný obsah spalného tepla v listnatých keřích dle Hnilička (2020) odpovídá 20,56 kJ/g. V této bakalářské práci byly analyzovány květy, které by jako generativní orgány, měly vykazovat vyšší energetickou hodnotu než vegetativní orgány v důsledku přesouvání energeticky bohaté hmoty do vegetativních orgánů, kde se z ní tvoří záložní hmota (Hnilička et al. 2015). Nejvyšší hodnota spalného tepla s popelem nicméně odpovídala keři rostoucímu v zatížené lokalitě *MH- Přestavky*, kde byla zjištěna hodnota 15,4 kJ/g, ale nebyla statisticky odlišná od čisté lokality (*Řepov*).

Mimo bez černý bylo již v minulosti zkoumáno, jaký vliv mají zvýšené hladiny některých těžkých kovů na polyfenolové látky v rostlinách či přímo jejich antioxidační aktivitu. Locika setá (*Lactuca sativa*) byla v experimentu vystavena vyšším koncentracím hliníku, na které reagovala zvýšenou tvorbou polyfenolových látek se záměrem rostliny snížit stres vyvolaný působením hliníku (Chen et al. 2020). Na brukvi sítinovité (*Brassica juncea* L.) byla testována zvýšená hladina kadmia, jednoho z nejtoxičtějších prvků pro životní prostředí. Bylo zjištěno, že stejně jako v předchozí studii rostlina reagovala na stres zvýšenou biosyntézou polyfenolů. Se zvyšující se toxicitou dávek Cd se zvyšoval i TPC (Kapoor et al. 2014). Vliv kadmia i olova v půdě na plody jahodníku (*Fragaria vesca*) měl také ve většině případů ze zkoumaných kultivarů pozitivní korelaci s celkovým obsahem polyfenolů (Trebichalský et al. 2015). Zmíněné studie odporují výsledkům vyplývající z této práce, avšak v nich se jednalo vždy pouze o jeden nebo dva druhy těžkých kovů. Získané výsledky jsou nicméně ve shodě s prací Kolodzej et al. (2012), kteří také pozorovali snížené množství flavonoidů v květech černého bezu v místech s vysokou kontaminací těžkými kovy. Vzdálenost a zvyšující se provoz měly zásadní vliv na složení rostlinného materiálu ve srovnání se vzorky, které pocházely z kontrolních lokalit. Bližší lokality oproti vzdálenějším vykazovaly nižší obsahy flavonoidů v květech, stejně jako u tohoto experimentu. Podle této studie intenzita provozu ovlivnila konkrétně obsah Cr, Fe, Cd a Cu, jejichž obsah se i mírou intenzity zvyšoval. (Kolodzej et al. 2012)

Výsledné koncentrace prvků a sekundárních metabolitů byly porovnány vzájemně. Oblast Děčín s nejvyššími průměrnými obsahy těžkých kovů vykazovala v měření nejnižší obsah flavonoidů. Ve všech statistických hodnoceních pro zatížené lokality Děčínska (9, 10, 11) byla prokázána nízká koncentrace sledovaných skupin metabolitů oproti vybranému

nekontaminovanému místu sběru. Mladoboleslavsko a Praha, které měly až na výjimku nižší koncentrace těžkých kovů vykazovaly vyšší procentuální obsahy flavonoidů. Mariánské Lázně, vzhledem k polovičnímu množství lokalit, byly posouzeny individuálně, avšak výsledky odpovídají taktéž nepřímé úměře. V místě (Úšovice) s nižším obsahem některých těžkých kovů vyšel neprůkazně zvýšený obsah flavonoidů a v druhé lokalitě (CHKO Židovský les), která byla považována jinak za nekontaminovanou, ale vykazovala vysoké množství kobaltu, vyšel obsah flavonoidů lehce podlimitní. Z této skutečnosti lze usuzovat, že obsah flavonoidů a obsah těžkých kovů v rostlinné biomase květů bezu černého jsou nepřímo úměrné. Mezi obsahem flavonoidů a obsahem těžkých kovů tedy existuje na základně výsledků této práce určitá korelace. Podobné výsledky byly pozorovány i v případě TPC.

7 Závěr

Tématem této práce bylo spojení environmentálního znečištění a obsahu bioaktivních látek v léčivých rostlinách. Jako zástupce léčivých rostlin byl vybrán bez černý, zejména díky jeho obsahu flavonoidů, nenáročnosti na sběr, a dostatku vhodných stanovišť pro tento experiment vzhledem k jeho rozšíření v České republice. Popularita léčivých rostlin roste a jejich využití jak v potravinářství, tak ve fytoterapii se stává trendem. Na opačné straně se rozrůstá i průmyslový sektor a v závislosti s ním i znečištění půdy, vody a ovzduší. S tím jsou spojené i zvýšené koncentrace těžkých kovů v životním prostředí. Výsledkem práce je stanovení obsahu celkových polyfenolů, flavonoidů, spalného tepla a obsahu těžkých kovů a následného porovnání vzájemného vztahu. Metody ve většině stanovení vycházely z ČL 2017. Výsledné hodnoty byly porovnány s ČL 2017 a dalšími dostupnými zdroji odpovídajícími tématu.

Vzorky květu bezu černého byly zkoumány ze čtyř různých oblastí v České republice. Oblast Mladoboleslavsko je známá rozlehlým automobilovým průmyslem. Děčín v Ústeckém kraji disponuje zhoršenou smogovou situací, která je důsledkem starých topenišť i nedalekým těžebním a hutnickým průmyslem na Ústecku. Mariánské Lázně jsou známým lázeňským městem a poslední z oblastí je hlavní město Praha. Nejvyšší obsahy těžkých kovů byly zaznamenány v oblasti Děčín, zároveň zde byly naměřeny nejnižší hodnoty procentuálního obsahu flavonoidů. Nejvyšší obsahy flavonoidů pak odpovídaly Praze a Mladoboleslavsku, kde byly zároveň naměřeny i nižší obsahy těžkých kovů. Všechny vzorky v porovnání s ČL 2017 odpovídají limitům v něm uvedených těžkých kovů a lze je z tohoto hlediska považovat za bezpečné k případné konzumaci. Limity dané ČL 2017 pro obsah flavonoidů byly u šesti vzorků podlimitní. U těchto vzorků by tedy při jejich sběru nebyla zaručena dostatečná kvalita, a tím i možný terapeutický účinek. Místo sběru tedy ovlivňuje obsahové látky ve výsledné droze, avšak ani ekologické zatížení v takové míře, v jaké bylo přítomno v blízkosti sbíraných rostlin této bakalářské práce, nemusí být pro případného konzumenta rizikem.

Z výsledků této bakalářské práce tedy vyplývá, že u většiny vzorků zvýšená přítomnost těžkých kovů v rostlinné biomase snížila obsah bioaktivních flavonoidů, polyfenolových látek a dalších asimilátů v sušených květech bezu černého. Hypotéza, že místo sběru může mít vliv na obsahové látky, tak byla potvrzena.

8 Literární zdroje

- Ali S, Coombes RCH. 2000. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **5**:271-281.
- Alloway BJ (ed.). 2012. *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. Springer Science & Business Media.
- Arthur EL, Rice PJ, Rice PJ, Anderson TA, Baladi SM, Henderson KL, Coats JR. 2005. Phytoremediation—an overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**:109-122.
- Asati A, Pichhode M, Nikhil K. 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management* **5**:56-66.
- Brodowska KM. 2017. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research* **7**:108-123.
- Burda S, Oleszek W, Lee CY. 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**:945-948.
- Český lékopis 2017. 2017. Grada Publishing, Praha.
- ČSN EN 14918. 2010. Tuhá biopaliva-Stanovení spalného tepla a výhřevnosti. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 1928. 1999. Tuhá paliva. Stanovení spalného tepla kalorimetrickou metodou v tlakové nádobě a výpočet výhřevnosti. Český normalizační institut, Praha.
- David AVA, Arulmoli R, Parasuraman S. 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews* **10**:84.
- Domínguez R, Zhang L, Rocchetti G, Lucini L, Pateiro M, Munekata P, Lorenzo JM. 2020. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food Chemistry*, 330. (127266) DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127266.
- European commition. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **364.1**: 5-24.
- Gajbhiye T, Pandey SK, Kim KH, Szulejko JE, Prasad S. 2016. Airborne foliar transfer of PM bound heavy metals in *Cassia siamea*: a less common route of heavy metal accumulation. *Science of the Total Environment* **573**:123-130.
- Ganeshpurkar A, Saluja AK. 2017. The pharmacological potential of rutin, *Saudi Pharmaceut* **25**:149-164.
- Gorog S. 2018. *Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis*. CRC press.
- Handique JG, Baruah JB. 2002. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers*. Elsevier **52**:163-188.

- Hayat J, Akodad M, Moumen A, Baghour M, Skalli A, Ezrari S, & Belmalha S. 2020. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon*, (e05609) DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05609.
- Hnilička F, Hniličková H, Kudrna J, Kraus K, Kukla J, Kuklová M. 2020. Combustion calorimetry and its application in the assessment of ecosystems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **142**:771-781.
- Hnilička F, Hniličková H, Hejnák V. 2015. Use of combustion methods for calorimetry in the applied physiology of plants. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **120**:411-417.
- Chen Y, Huang L, Liang X, Dai P, Zhang Y, Li B, Sun C. 2020. Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. *Environmental Pollution*, 261 (114230) DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114230.
- Cheng S. 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, **10**: 256-264.
- Janick J. (Ed.). 2003. Horticultural reviews (Vol. 30). John Wiley & Sons.
- Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* **68**:167-182.
- Kapoor D, Kaur S, & Bhardwaj R. 2014. Physiological and biochemical changes in *Brassica juncea* plants under Cd-induced stress. *BioMed research international* (726070) DOI: 10.1155/2014/726070.
- Kim AY, Kim J Y, Ko M S, Kim KW. 2010. Acid rain impact on phytoavailability of heavy metals in soils. *Geosystem Engineering* **13**:133-138.
- Kobayashi M, Shimizu S. 1999. Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry* **261**:1-9.
- Kolodziej B, Maksymiec N, Drozdal K, & Antonkiewicz J. 2012. Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Journal of Elementology* **17**.
- Lattanzio V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction 50. *Nat. Prod*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1543-1580.
- Lepš, J, Šmilauer P. 2016. Biostatistika. Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Madanan MT, Shah I K, Varghese GK, Kaushal RK. 2021. Application of Aztec marigold (*Tagetes erecta* L.) for phytoremediation of heavy metal polluted lateritic soil. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* **3**:17-22.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* **79**:727-747.
- Mandelová L. 2006. Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci [DSc. Thesis]. Masarykova univerzita, Brno.
- Maksymiec W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**:177.

- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the university of chemical technology and metallurgy* **40**: 255-260.
- Martin S, Griswold W. 2009. Human health effects of heavy metals. *Environmental Science and Technology briefs for citizens* **15**:1-6.
- Mihaljevič M, Strnad L, Šebek O. 2004. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* **98**:123-130.
- Młynarczyk K, Walkowiak-Tomczak D, Staniek H, Kidoń M, Łysiak GP. 2020. The Content of Selected Minerals, Bioactive Compounds, and the Antioxidant Properties of the Flowers and Fruit of Selected Cultivars and Wildly Growing Plants of *Sambucus nigra* L. *Molecules* **25**:876.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters* **8**:199-216.
- Osmani M, Bani A, & Hoxha B. 2015. Heavy Metals and Ni Phytoextraction in the Metallurgical Area Soils in Elbasan. *Albanian Journal of Agricultural Sciences* **14**:414.
- Pathak L, Shah K. 2021. Phytoremediation of abandoned mining areas for land restoration: Approaches and technology. In *Phytoremediation of Abandoned Mining and Oil Drilling Sites*. Elsevier.
- Piršelová B, Galuščáková L, Lengyelová L. 2018. Hormetická odpověď rostlín na ióny kovů a polokovů. *Chemické listy* **112**:317-323.
- Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, Gardea-Torresdey J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**:1665-1677.
- Raskin IKN, Dushenkov S, and Salt D. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* **5**:285-290 DOI: 10.1016/0958-1669(94)90030-2.
- Richter R, Hlušek J. 1994: *Výživa a hnojení rostlin (I. obecná část)*. VŠZ, Brno
- Slavík B, Štěpánková J. 2011. ed. *Květena České republiky*. Academia, Praha.
- Thomas R. 2013. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Third Edition: Practical Spectroscopy*. CRC Press.
- Tolic MT, Krbavcic IP, Vujevic P, Milinovic B, Jurcevic IL, Vahcic N. 2017. Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **67**:1.
- Topolska J, Kostecka-Gugała A, Ostachowicz B, Latowski D. 2020. Selected metal content and antioxidant capacity of *Sambucus nigra* flowers from the urban areas versus soil parameters and traffic intensity. *Environmental Science and Pollution Research* **27**: 668-677.

- Trebichalský P, Molnárová J, Bajčan D, Timoracká M, Musilová J, Harangozo Ľ. 2015. Total polyphenols content in fruits of selected cultivars of strawberries in relation to concentrations of cadmium and lead in soil. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* **9**:480-486.
- Trock BJ, Hilakivi - Clarke L, Clarke R. 2006. Meta-Analysis of Soy Intake and Breast Cancer Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **98**:459-471.
- Vachová P, Vach M, Najnarová E. 2017. Using expansive grasses for monitoring heavy metal pollution in the vicinity of roads. *Environmental Pollution* **229**:94-101.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, **5**: 218-223.
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition* **59**:113-122.
- Zendulka O. 2008. Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění [DSc. Thesis]. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno).

9 Elektronické zdroje

- Česká televize.2014. ČT24: Děčín a Tábor se zařadily k nejvíce znečištěným městům. Česká televize. Available www.ct24.cz (accessed April 2021).
- EEA.2020. European environment agency: Air quality and COVID-19.Available: www.eea.europa.eu/signals/themes/air/air-quality-and-covid19/air-quality-and-covid19 (accessed April 2021).
- Google.2021. Available www.google.com/maps (accessed April 2021).
- Google My Maps. 2021. Available from www.google.com/maps/about/mymaps/ (accessed March 2021).
- ChemDraw. 2021.PerkinElmer Informatics. Available from www.cambridgesoft.com; version 19.0.0.22. (accessed March 2021).
- Kaňa A, Mestek O. VŠCHT.Atomová absorpční spektrometrie. Available from <http://old.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf> (accessed February 2021).
- Mestek O. 2010. VŠCHT. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Available from http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf (accessed March 2021).
- Portál ČHMÚ. 2021. ČHMÚ.Available from www.chmi.cz/ (accessed March 2021).

10 Přehled tabulek a obrázků

Tabulky:

Tabulka 1. Oblast Praha

Tabulka 2. Oblast Mladá Boleslav

Tabulka 3. Oblast Děčín

Tabulka 4. Oblast Mariánské Lázně

Tabulka 5. Přehled srážek a teplot pro červen 2020

Tabulka 6. Číselné označení vzorků pro následné grafické interpretace výsledků

Obrázky:

Obrázek 1. Bez černý

Obrázek 2. Vzorce vybraných fenolových kyselin

Obrázek 3. Antocyanin

Obrázek 4. Antoxantin

Obrázek 5. Kvercetin

Obrázek 6. Rutin

Obrázek 7. Vzorce vybraných flavonů

Obrázek 8. Vzorce uvedených flavan-3-olů

Obrázek 9. Hesperidin

Obrázek 10. Vzorce uvedených isoflavonoidů

Obrázek 11. UV/VIS spektrofotometr

Obrázek 12. Sběrná místa vyznačená na mapě České republiky

Obrázek 13. Extrakce vzorku v dělicí nálevce

Obrázek 14. Kontrolní roztoky (K) a zkoušené roztoky (Z) připravené k následnému měření roztoku s isokvercitrósidem

Obrázek 15. Isokvercitrósid

Obrázek 16. Křivka měření absorbance UV/VIS spektrofotometrem

Obrázek 17. Výsledné obsahy flavonoidů v %

Obrázek 18. Výsledné obsahy celkového počtu polyfenolů v mg/g

Obrázek 19. Výsledné obsahy těžkých kovů v $\mu\text{g}/\text{kg}$ (V, Cr, Co, Ni)

Obrázek 20. Výsledné obsahy těžkých kovů v $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tl, Pb)

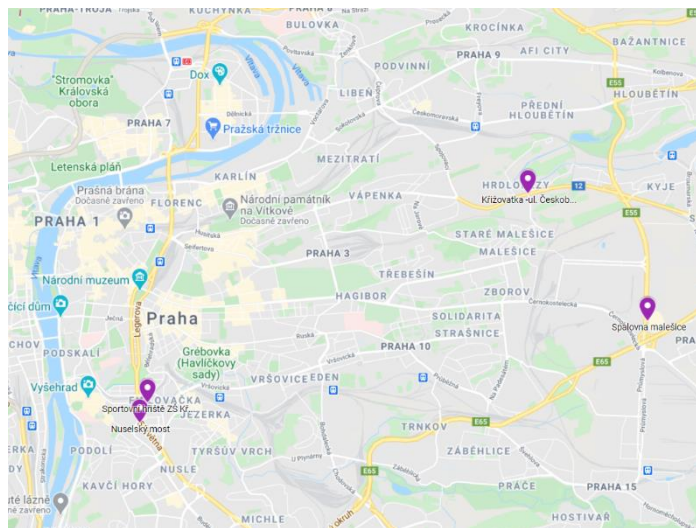
Obrázek 21. Výsledné obsahy těžkých kovů v $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Zn, Cu, As, Cd)

Obrázek 22. Výsledné obsahy spalného tepla s popelem v kJ/g

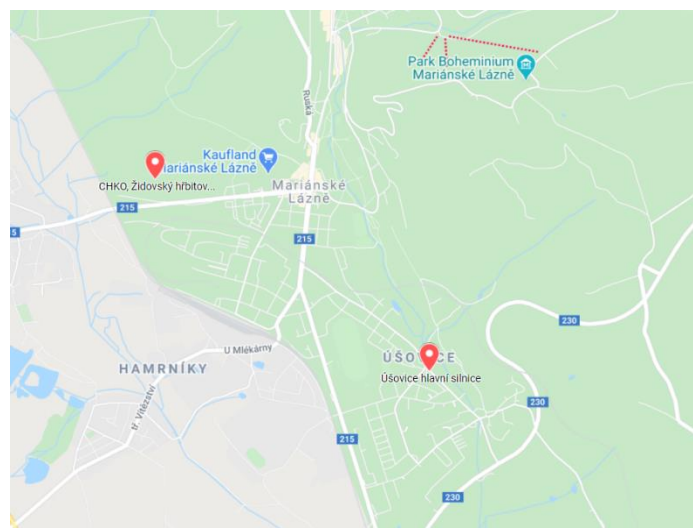
Obrázek 23. Výsledné obsahy spalného tepla bez popelovin v kJ/g

11 Samostatné přílohy

Příloha 1. – Mapy jednotlivých oblastí s vyznačenými sběrnými lokalitami



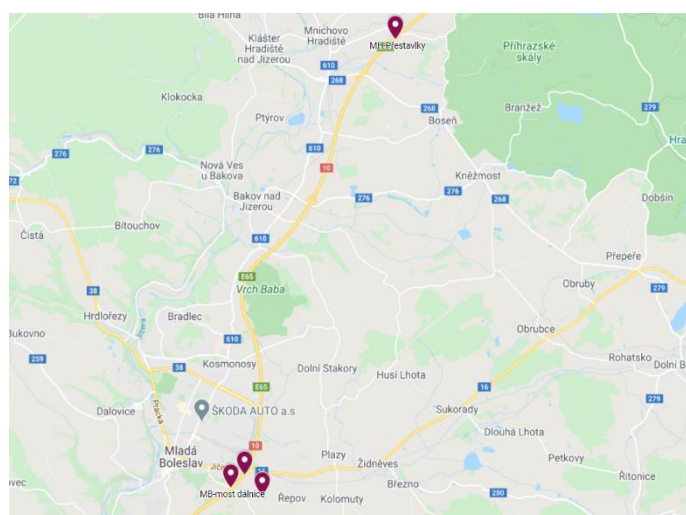
Praha



Mariánské Lázně



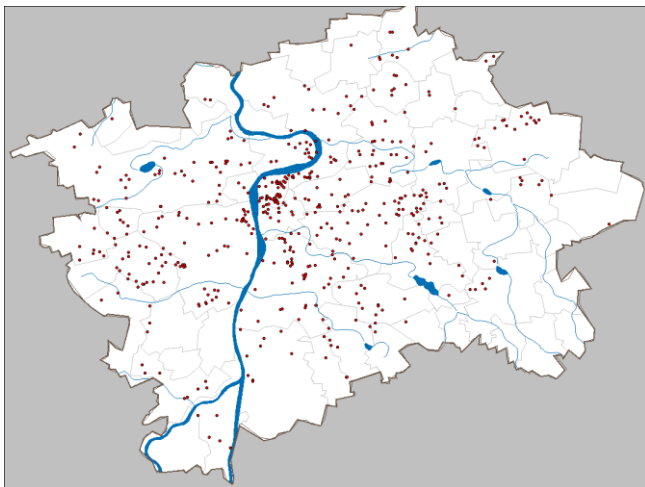
Děčín



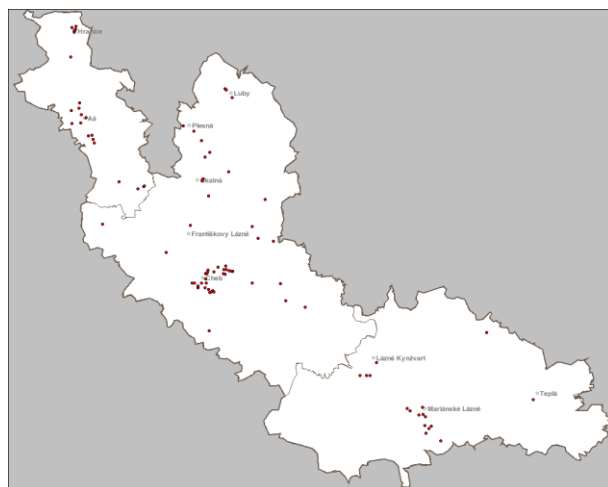
Mladá Boleslav

Upraveno: (Google My Maps, dostupné z: <https://www.google.com/maps/about/mymaps/>)

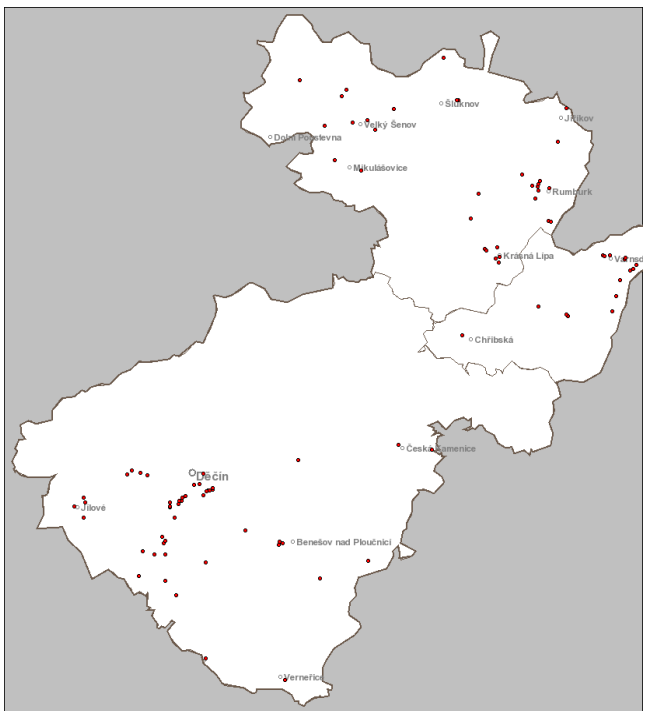
Příloha 2. - Údaje o provoznách a emisích ohlášených v souhrnné provozní evidenci za aktuální rok pro jednotlivé okresy sběru (06.03.2021 11:51 SEČ)



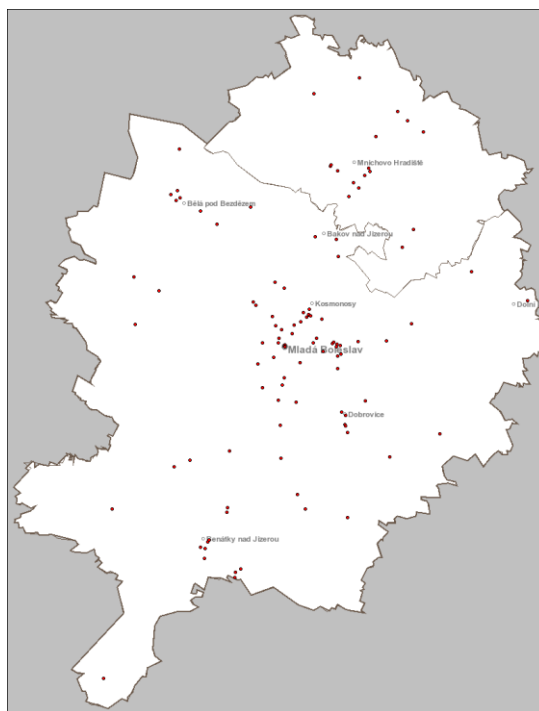
Praha



Mariánské Lázně



Děčín



Mladá Boleslav

Zdroj: (ČHMÚ, dostupné z: <https://www.chmi.cz/>)

Příloha 3. - Fotografie pořízené při samosběru vzorků některých lokalit.



Olympia MB



Řepov prostřední cesta (čistý)



MB most dálnice



MH – Přestavlky

(Foto: autorka práce 2020)



Spalovna Malešice



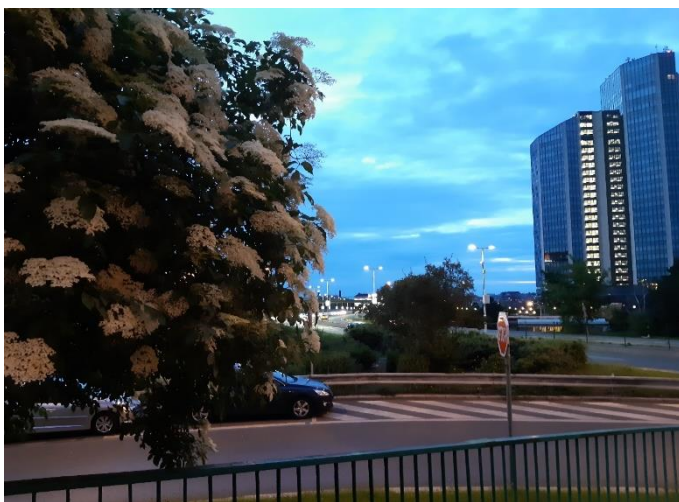
CHKO, Židovský hřbitov (čistý)



Křižovatka - ul. Českobrodská x Pod Táborem



Úšovice hlavní silnice



Nuselský most

(Foto: Pavla Adamíková a David Faigl 2020)



Sportovní hřiště ZŠ Křesomyslova (čistý)