



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ADAPTOGENY V ROSTLINĚ SHIZANDRA CHINENSIS

ADAPTOGENS IN THE SHIZANDRA CHINENSIS PLANT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Pospíchalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Josef Kotlík, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1383/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Lucie Pospíchalová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Josef Kotlík, CSc.**

Název diplomové práce:

Adaptogeny v rostlině *Shizandra chinensis*

Zadání diplomové práce:

1. Vytipovat vhodnou extrakční techniku pro izolaci adaptogenu a chlorofilu
2. Na konkrétním vzorku ověřit technologii izolace
3. Na konkrétním vzorku provést kvalitativní stanovení lignanu (Schisandrin A)
4. Provést deduktivní interpretaci zjištěných výsledků
5. Na základě rešeršní analýzy popsat působení těchto adaptogenů na organismus a predikovat jeho možné využití v potravních doplncích
6. Vytipovat vhodné regionální pěstební klimatické zóny a komentovat důvody svého návrhu

Termín odevzdání diplomové práce: 17.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Lucie Pospíchalová
student(ka)

Ing. Josef Kotlík, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá rostlinnými adaptogeny (bioaktivními látkami) rostliny *Schisandra chinensis*. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci rodu *Schisandra*, charakterizaci rostliny, její vlastnosti, výskyt a využití této rostliny. Dále je popsáno působení těchto adaptogenů na organismus a predikce možného využití v potravinových doplňcích. Také byly vytipovány vhodné regionální pěstební klimatické zóny. Experimentální část práce se zabývá extrakcí plodů a listů v rostlině *Schisandra chinensis*. Z extraktů listů byl dále stanoven obsah chlorofylu *a*, chlorofylu *b* pomocí UV – VIS spektrofotometrie, kdy bylo potvrzeno množství chlorofylu v poměru 3:1 pro rostliny v optimálních rostoucích podmínkách. Nakonec byl proměřen obsah adaptogenu schisandrinu A v sušených plodech s různou extrakcí pomocí HPLC. Ve všech plodech byl potvrzen schisandrin v odlišném množství.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with plant adaptogens (bioactive substances) in the plant *Schisandra chinensis*. The theoretical part is focused on characterization of the *Schisandra* genus, characterization of the *Schisandra chinensis* as a plant, its properties, occurrence and growing possibilities in the climate zone. Furthermore, The effects of these adaptogens on the organism and the prediction of possible use in food supplements are described. The experimental part deals with the extraction of fruits and leaves from plant *Schisandra chinensis*. Further, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* in the leaves extract was determined by UV – VIS spectrophotometry, whereby the optimal amount 3:1 of chlorophyll was confirmed for the plants growing in optimal conditions. Finally, the concentration of the adaptogen schisandrin A in the dried fruits was from different kind of extraction measured by HPLC. In all fruits, schisandrin A was confirmed, but the amount is different in each sample.

KLÍČOVÁ SLOVA

Schisandra chinensis, extrakce dle Soxhleeta, chlorofyl, schisandrin A, spektrofotometrie, HPLC

KEY WORDS

Schisandra chinensis, Soxhlet extraction, chlorophyll, schisandrin A, spectrophotometry, HPLC

POSPÍHALOVÁ, Lucie. Adaptogeny v rostlině *Shizandra chinensis*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/112392>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Josef Kotlík.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a veškeré podkladové materiály a literární zdroje, z nichž jsem vycházela, jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen s mým souhlasem, se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

(podpis studenta)

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Josefu Kotlíkovi, CSc. za jeho odborné vedení, za rady a připomínky k této diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za poskytnutí pomoci při laboratorním měření, zpracování a vyhodnocení výsledků vzorků.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě při celém studiu podporovala a nutila mně k lepším výsledkům.

Nejvíce při studiu mi pomohli samotní kolegové, jmenovitě Klaudia Aďa Obláčik Kvaková, Džonny, Koník, Mima, Peťa a ze samého začátku skupina Mission possible.

Mimo školu bych velice ráda poděkovala svým nejbližším, kteří si denně vyslechli všechny mé studijní problémy a vysokoškolské univerzitní nástrahy a snažili se mi jakkoliv během studia pomoci. Ať už během týdne v Brně, tak o víkendu na Vysočině. Děkuji TO-X-NE, speciálně Lucii Chylíkové, Davidu Dřímaloovi a Janě Horákové, za veškerou jejich věčnou trpělivost a pochopení, tak i díky celému SANTUSU JÍVOVÍ za pravidelné víkendové fotbalové odreagování. Dále bych chtěla zmínit jména Bobo, Zdeny Chlouba, Šejny, Pták, Pišta, Beryna, Karyna, Holly, Janoš, Zdeny Liška, Hejtmi a Johny See, kteří se mnou tráví čas a dávají mi své vyčerpávající cenné rady.

Potom bych chtěla ocenit své spolubydlící: Davida Králíčka, Zdenču Krejčovou a Adélu Zahradníčkovou, kteří se mnou zvládli přebývat.

Těmto všem a dalším nezmíněným, kteří se mnou strávili svůj čas a udělali má studentská léta opravdu nezapomenutelně studentská, patří velký dík.

OBSAH

ÚVOD.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. Rod Schizandra.....	9
1.1.1. Biologická klasifikace	9
1.2. Schisandra chinensis	9
1.2.1. Popis rostliny.....	10
1.2.2. Výskyt.....	11
1.2.3. Pěstební podmínky	11
1.2.4. Köppenova klasifikace podnebí.....	12
1.2.5. Klimatické zóny	14
1.2.6. Podmínky v jihomoravském kraji	16
1.2.7. Sběr a úprava	16
1.2.8. Obsahové látky	17
1.3. Adaptogeny	17
1.3.1. Farmakologie	18
1.3.2. Farmakologie Schisandra chinensis	19
1.3.3. Lignany	19
1.3.4. Schisandrin A.....	23
1.3.5. Chlorofyl.....	23
1.4. Potravinové doplňky	24
1.5. Technologie izolace bioaktivních látek.....	24
1.5.1. Extrakce v Soxhletově extraktoru	26
1.6. Instrumentální metody	27
1.6.1. Spektrofotometrie.....	27
1.6.2. Vysokoučinná kapalinové chromatografie (HPLC).....	28
1.6.3. Součásti spektrofotometru.....	28
1.6.4. Hmotnostní spektrometrie (MS).....	28
2 CÍL PRÁCE	29
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Rostlinný materiál a chemikálie	30
3.2 Instrumentace	30
3.2.1 Zařízení pro přípravu a extrakci.....	30
3.2.2 Přístroje	30
3.2.3 Softwarové vybavení.....	31
3.3 Postupy a podmínky měření.....	31
3.3.1 Extrakce	31

3.3.2	Stanovení chlorofylu na UV-VIS spektrofotometru.....	32
3.3.3	Podmínky pro identifikaci chlorofylu na UV-VIS spektrofotometru	33
3.3.4	Podmínky pro identifikaci schisandrinu A na HPLC	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	34
4.1	Identifikace chlorofylu.....	34
4.2	Identifikace shisandrinu A na HPLC	36
5	ZÁVĚR.....	44
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	51
8	PŘÍLOHY.....	52
8.1	Fotografie rostliny Schisandra chinensis	52
8.2	Fotografie v průběhu extrakce	53
8.3	Absorpční spektra vzorků 1 – 9	3

ÚVOD

Schisandra chinensis neboli klanopraška čínská se řadí mezi opadavé liány pocházející z jihovýchodní Asie, především z Číny. Nyní se vyskytuje převážně v Číně, východním Rusku, Japonsku a Koreji. Její přirozené podnebí je mírné až mírně studené s chladnou zimou a teplým létem. Klanopraška vyžaduje středně vlhké a mírně prosvětlené prostředí, s vlhkou půdou bohatou na živiny. Její léčivé bylinné schopnosti jsou ukryty v plodech, listech a semenech. Celkově se jedná o lignany s chemickou strukturou odvozenou od dibenzo[a,c]cyklooktadienu, kdy je nejvíce zastoupen adaptogen schisandrin. Bioaktivní látky rostliny mají kladný účinek na kardiovaskulární systém, centrální nervový systém, zvyšují fyzickou výkonnost a urychlují metabolismus. Mezi další účinky patří detoxikační, antioxidační, antikarcinogenní, antihepatitické a protizánětlivé vlastnosti. V potravinářském průmyslu ji najdeme ve formě sušených plodů, čajů, odvarů, mastí, krémů a také v potravinových doplňcích. K extrakci aktivních látek z rostliny *Schisandra chinensis* se nejčastěji využívá extrakce organickými rozpouštědly, extrakce dle Soxhleta a lze použít i jiné způsoby extrakce. Ke kvalitativnímu i kvantitativnímu vyhodnocení lignanů je nejčastěji použito spojení vysokoúčinné kapalně chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Identifikace a kvantitativní stanovení chlorofylu ze zelených částí rostlin se získá proměřením absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Rod *Schizandra*

Rod *Schizandra* je některými autory řazen do čeledi *Mangoliaceae* (Šácholanovité), jinými do samostatné stejnojmenné čeledi *Schisandraceae*.

Schisandraceae neboli klanopraškovité je čeleď nižších dvouděložných rostlin, patřící do řádu *Austrobaileyales*. Jsou to kvetoucí rostliny zahrnující tři rody dřevin s celkem 85 známými druhy [1; 2; 3]. Mnohé druhy klanoprašky, badyáníku i kadsury jsou využívány v medicíně. Nejznámější klanopraška čínská se pěstuje v Česku jako okrasná rostlina.

Zástupci čeledi klanopraškovité jsou jednodomé nebo dvoudomé, opadavé, aromatické keře, stromy nebo dřevnaté liány. Listy jsou jednoduché, střídavé, řapíkaté bez palistů. Květy jsou jednotlivé nebo v řídkých úžlabních květenstvích, jsou pravidelné jednopohlavné nebo oboupohlavné. Plodem je souplodí jednosemenných měchýřků (badyáník) nebo souplodí dvousemenných bobulí, přirostlých na kulovitém (kadsura) nebo protáhlém (klanopraška) květním lůžku [2; 3; 4].

1.1.1. Biologická klasifikace [5]

Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Podříše	<i>Tracheobionta</i>	cévnaté rostliny
Nadoddělení	<i>Spermatophyta</i>	semenné rostliny
Oddělení	<i>Angiospermae</i>	krytosemenné
Řád	<i>Austrobaileyales</i>	
Čeleď	<i>Schisandraceae</i>	klanopraškovité, magnolkovité jinak badyáníkové

Čeleď *Schisandraceae* zahrnuje dva rody: *Schizandra* (TURCZ.) BAILL. a *Kadsura* KAEMPF. EX JUSS. Tradičně byly na základě morfologických analýz řazeny do řádu *Illiciales* spolu s čeledí *Illiciaceae*. V roce 2003 byly tyto dvě čeledě spolu s čeleděmi *Trimeniaceae* a *Austrobaileyaceae* zařazeny do řádu *Austrobaileyales* a toto zařazení je stále platné.

(The Angiosperm Phylogeny Group III;2009) [1]

1.2. *Schizandra chinensis*

Jméno „*Schizandra*“ je odvozeno od dvou slov řeckého původu: „*schizein*“, což znamená dělit, rozetnout, rozrazit a „*andros*“ – muž. Jméno bylo zvoleno podle separace prašničkových buněk z tyčinek druhu *Schizandra coccinea* [6].

Schizandra chinensis nebo-li klanopraška čínská je opadavá liána šplhající do koruny listnatých stromů. Začleňuje do rodu *Schizandra*, čeleď *Schisandraceae* [2; 3; 7]. Klanopraška čínská má v češtině mnoho synonym - *Schizandra* japonská, Čínská magnolie, Citronové dřevo, čínský citronovník, *Kadsura chinensis*, čínsky se nazývá Wu-wei-zi. V ruskojazyčné literatuře ji najdeme pod jménem *Limonnik kitajskij*, v německé *Chinesischer Limonnenbaum* a v japonské *Gomishi* nebo *Matsbouza*.

Už v tradiční čínské medicíně byla klanopraška nazývána rostlinou pěti chutí – kyselá, hořká, slaná, sladká a trpká (palčivá). Chuť plodu klanoprašky údajně odpovídá základním orgánům. Kyselá chuť játrům, hořká chuť srdci, sladká slezině, palčivá plicím a slaná chuť ledvinám. Rovněž těchto pět chutí odpovídá pěti základním elementům: trpká – dřevo, hořký – oheň, sladká – země, ostrý – kov, slaná – voda. Z tohoto důvodu je v čínském lékopise

vedena schisandra jako všelék a je zobrazována jako symbol dlouhověkosti [2; 3]. Získala si své názvy omicha v Koreji, gomishi v Japonsku, wu-wei-zi, ji-chu nebo hoy-tsi v Číně a limonnik, podle citronové vůně rozmáčknutých květů, v Rusku. V USA a Kanadě se nejčastěji používá jméno schisandra, popř. magnolia vine. V pravopisu se můžeme setkat s označením *Schisandra* i *Schizandra*, používané jsou obě varianty [6].

O Schisandře se poprvé zmiňuje čínský spis Shen Nong Ben Cao Jing, který byl sepsán před 4000 lety. Objevuje se také v lékopisu vydaném v roce 1596, který sestavil Li Š'-chen. V západní botanice ale měla tato čínská rostlina nejprve jméno *Kadsura chinensis*, a to v publikaci ruského botanika N. S. Turczaninova z roku 1832. Rod *Kadsura* byl roku 1856 přejmenován ruským botanikem Ruprechtem na počest svého kolegy Maximovicze na *Maximowiczia* a rostlinu nazval *Maximowiczia chinensis*. Roku 1866 byla rostlina zařazena francouzským botanikem H.E. Baillonem do rodu *Schisandra* a od té doby nese název *Schisandra chinensis* (TURCZ.) BAILL [5].

V Číně je po mnoho staletí známá pro své blahodárné účinky a od pradávna se používá jako léčivka. Působí blahodárně na lidský organismus [6]. *Schisandra* nepatří mezi léčivé rostliny, ale je zařazována mezi rostliny s povzbuzujícími a tonizujícími účinky, tzv. adaptogeny [5].

1.2.1. Popis rostliny

Jednodomá, opadavá, pravotočivá, popínavá a liánovitá rostlina s ovíjivými lodyhami dosahujícími délky 8-15 m [7]. Průměr liány je v rozmezí 1,2-1,5 cm [8]. Mladé výhonky mají hladkou a nažloutlou kůru, u starších výhonků je kůra svraštělá a tmavohnědá se specifickou vůní. V nepříznivých podmínkách nabývá křovitého tvaru a neovíjí se. Výhony jsou větvené a skládají se ze tří druhů (vegetativní – až 1,6 m dlouhé, vegetativně-generativní – 0,5 m a na bázi tvoří květy a plody, generativní – 10-50 mm dlouhé, plodonosné) [7; 9].

Pupeny jsou podélné vejčité, zašpičatělé, odkloněné od výhonu a dlouhé 3-5 mm. Jsou po třech v uzlině. Listy jsou světlezelené, jednoduché, lesklé, střídavé, na konci zašpičatělé se zubatým okrajem s červenohnědým řapíkem a klínovitou bazí. Jsou 5-10 cm dlouhé a 2-4 cm široké. V létě jsou temně zelené, na podzim se zbarví do citrónově žluta. Průduchy se nacházejí na spodní straně listů [2].

Biologie kvetení je složitá. Doba květenství je od dubna do května (8-14 týdnů). Květy jsou bílé až nažloutlé barvy (15 mm), vyrůstají v úžlabí listů na několik centimetrů dlouhých růžových stopkách. Mají silnou citronovou vůni [2]. Schisandra je jednodomou i dvoudomou rostlinou, tvorba typu květů je různá a závisí na teplotním režimu, výživě, vlhkosti a stáří rostliny [2; 7]. První květy jsou jen samčí, výjimečně oboupohlavné, a jsou hmyzosubné, samičí se objevují až v letech následujících. Na keři jsou rozmístěny tak, že samčí se nacházejí ve spodní části a samičí v horní části keře. Koruna květu dosahuje mnohdy až 15 mm a je složena z 6-9 voskovitých okvětních lístků. Samčí květy vyrůstají v úžlabí listů po 2-7 na dlouhých růžových stopkách, kde tyčinky jsou bílé. Samičí květy mají na krátkém válcovitém květním lůžku velký počet dvouvaječných pestíků s nazelenalými bliznami [4].

Opyluje se hmyzem. Při dozrávání se lůžko 20-50 zvětší a tak se vytvoří z jediného květu souplodí o 2-22 bobulích, které je dlouhé 6-8 cm a vzhledem připomíná hrozen rybízu jasně červených plodů. Plody jsou kulovitého tvaru o průměru 5-7 cm, často deformované, zvrásnělé a barvou červené až tmavě červené [10]. Dozrávají od poloviny srpna do října a doba sklizně je po prvních mrazech. Dužina je aromatická se sladkokyselou chutí. Plody obsahují 1 až 2 semena ledvinového tvaru, nažloutlé až tmavě hnědé barvy a jsou velká 3,5-4,5 cm. Semena mají zřetelný šev na horní straně a jsou slabě specifického zápachu. Po rozdrčení jsou štiplavá až pálivá, hořkokyselá chuti [8]. (Fotky jednotlivých částí rostliny viz příloha dole).

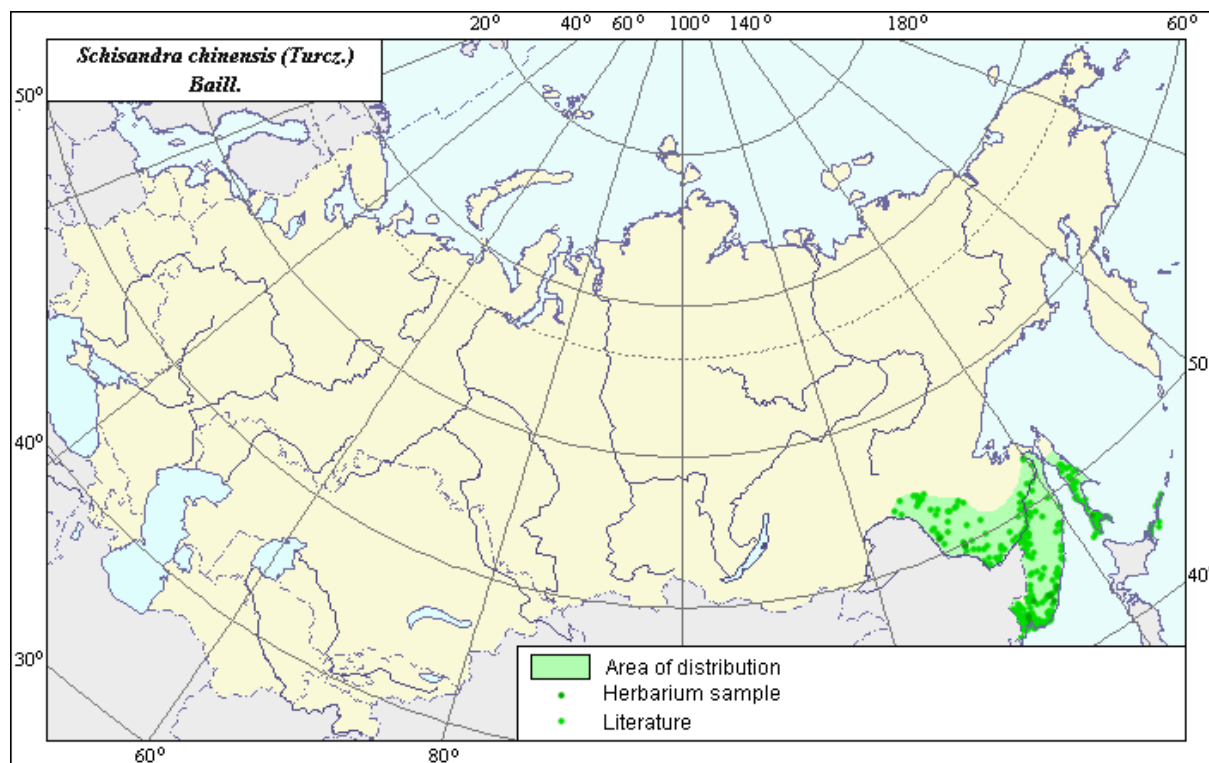
1.2.2. Výskyt

Původní oblasti výskytu rostliny se nejčastěji uvádějí severovýchodní část Číny, do které patří i Mandžusko, a jihovýchodní část Ruska.

Většina z cca 25 druhů rodu *Schisandra* je rozšířena v subtropické části Asie, dva druhy mají domovinu na Jávě a jeden na jihovýchodě USA, včetně jednoho druhu endemického na Tchaj - wanu [11].

Jeden druh, *Schisandra coccinea*, se vyskytuje jako vzácná popínavá rostlina v jihovýchodní části USA na Floridě, v Louisianě, Georgii, Arkansasu, Tennessee, a Severní Karolíně.

Ostatní druhy schisandry rostou především v severní Číně, Japonsku a Himalájích [6]. *Schisandra chinensis* roste divoce nejvíce v oblasti Dálného východu, na jih od 51° stupně severní šířky - Ruska (v regionech Primorsku, Amursku, Khabarovsku a Chabarovsku, na Kurilských ostrovech, v jižním Sachalinu) a také v severovýchodní Číně (oblasti Jilin, Lianonig, Heilongliang, Hebei, Shanxi, Ningxia, Shandong) [6; 8; 12; 11; 13]. Jen plocha jejich přirozených porostů se odhaduje na Dálném východě na 6400 km². Zde liána roste obvykle v lokalitě smíšených lesů, zejména na jejich okrajích v nadmořské výšce 200–500 metrů nad mořem, v severozápadní v Číně i 1300 m nad mořem [8]. Z východního Ruska byla *Schisandra* přivezena do evropských botanických zahrad až okolo roku 1850 a v nynější době ji často vidíme jako okrasnou pnoucí rostlinu.



Obrázek 1: Oblast výskytu *Schisandra chinensis* v Číně k datu 20.12.2015 [14]

1.2.3. Pěstební podmínky

Schisandra chinensis roste ve smíšených a listnatých lesích, preferuje středně vlhké, středně prosvětlené prostředí spolu s mokrou půdou bohatou na humus, zejména mladé rostliny trpí při nedostatku vláhy. Není odolná vůči suchému prostředí a ani vysokému stupni vlhkosti. Jedná se o liánovitou rostlinu patřící mezi světlomilné rostliny, ale v mladém věku preferuje růst ve stínu. V dospělosti by při velkém zastínění nepřinášela žádné plody. V přírodě se

vyznačuje vysokou odolností vůči chladu. Velice se jí daří ve výškách 250 metrů nad mořem a v okolí řek a potoků, kde jsou lehké naplavené spíše kyselé půdy. Neroste na písčitých a rozbahněných pozemcích. Průměrný výnos plodů na rostlinu se pohybuje okolo 2 kg, ovšem výnos může sahat až k 4 kilogramům [6; 7].

Rozmnožování je možné vegetativní i generativní. Mezi vegetativní způsoby je uváděno řízkování v červnu až červenci zelenými řízků z polovyzrálých mezičlánků se třemi listy a vlnovité hřížení letorostů, za předpokladu, že mateřské rostliny jsou pěstovány v lehké, humózní půdě. Walter zmiňuje i množení pomocí odkopků s kořeny. Generativní rozmnožování také může být prováděno po stratifikaci semen. Její podstatou je uložení semen 2 měsíce před výsevem ve vlhkém hrubozrnném písku při teplotě asi 15 °C.

Mladé semenáče s jemným kořenovým systémem ale velmi špatně rostou (roční přírůstek je asi 8 cm). Je vhodné je přistiňovat, abychom zabránili přehřátí kořenů. Druhým nebo třetím rokem je třeba vybudovat k rostlině vhodnou oporu. Sklízí se v době, kdy jsou bobule plně vybarvené, ale ne přezrálé [15].

Klanopraška kvete asi po čtvrtém roce a při prvních kvetení se zpravidla objevují pouze samčí květy. Během následujících let se objeví i samičí a zřídka kdy pak květy oboupohlavní. Výskyt květů je nespolehlivý a hraje zde roli několik faktorů, jako je teplota, vlhkost či výživa půdy.

Cyklus rostliny začíná v období měsíců březen a duben, kdy po zimním spánku dochází k vyrašení listů a květů. Po odkvětu se z každého květu vytváří souplodí, která připomíná hrozen rybízu. Plody dozrávají během měsíce srpna až října. Po sklizni rostlina opadá [6; 7].

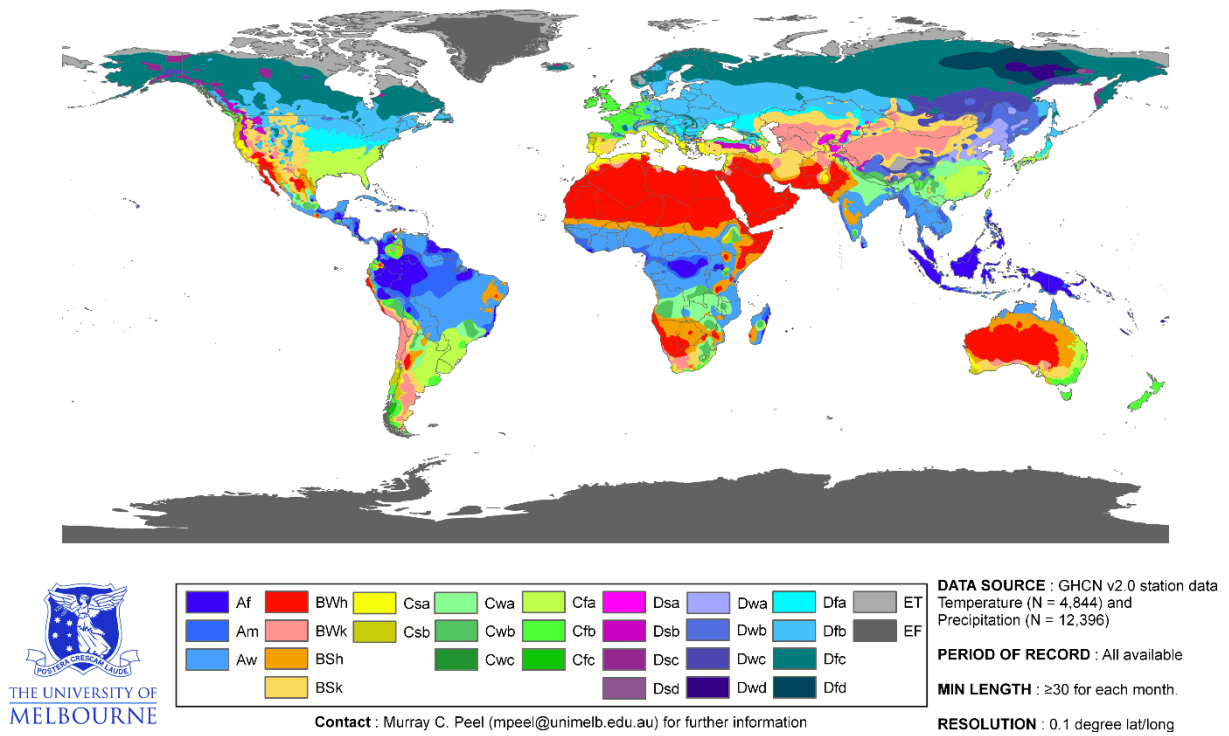
1.2.4. Köppenova klasifikace podnebí

Podle Köppenovy klasifikace podnebí, která je utvořena podle teplot vzduchu a atmosférických srážek ve vztahu s vegetací, se podnebí dělí na 5 hlavních klimatických pásem s 12 základními klimatickými typy [8]. Východní část Ruska a severovýchodní Čína a Korea spadají do typů Dwa a Dwb, které odpovídají mírně studenému klimatu se suchou zimou a teplým létem. Navíc východní část Ruska spadá i do oblasti Dfb, která odpovídá mírně studenému klimatu s rovnoměrnými srážkami během roku. Japonsko je klasifikováno typem Dwa pro sever země, Cfb pro většinu území, zejména jižní část Japonka, což odpovídá mírně teplému klimatu s rovnoměrným rozložením srážek během roku. Zbytek území odpovídá typu Dfb.

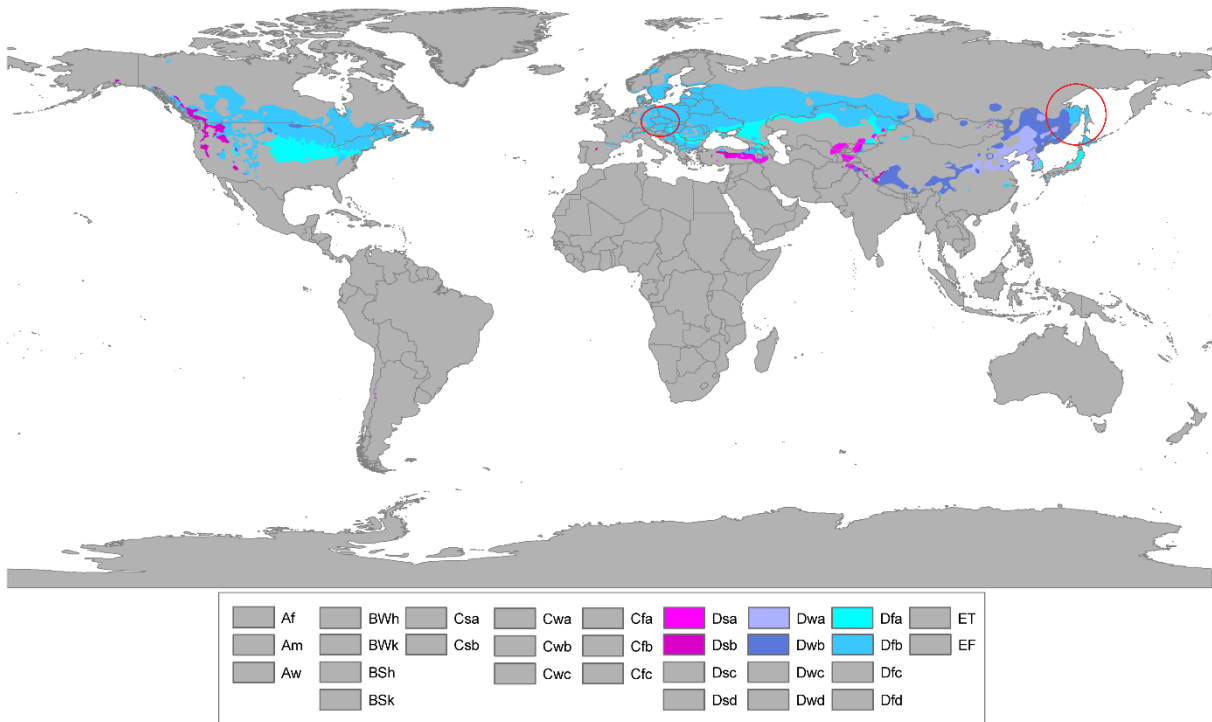
Česká republika spadá podle Köppenovi klasifikace do oblasti typu Dfb. Jedná se o vlhké, mírně teplé kontinentální podnebí se suchou zimou. V této oblasti nejsou srážky rovnoměrně rozložené po celý rok, hlavně kvůli chladnějším zimám, kdy srážek padá méně. V létě jednou za čas po delším suchu dorazí bouřka s velmi silným deštěm nebo dlouhodobější dešť. Nejvyšší teploty se obvykle pohybují okolo 30°C a nejsilnější mrazy jsou v závislosti na kontinentálnosti a zeměpisné poloze od -10°C do -35°C [16].

Při srovnání podnebí míst přirozeného výskytu rostliny *Schisandra chinensis* a podnebí v České republice podle Köppenovi klasifikace podnebí lze usuzovat, že je možné rostlinu pěstovat i v podnebních podmínkách České republiky, protože podmínky jsou velmi podobné. Lze tedy přepokládat, že na stinném místě s dostatečnou závlahou by rostlina prosperovala a díky vyšším teplotám oproti západnímu Rusku a Číně by tak měly plody dostatečnou teplotu pro dozrávání.

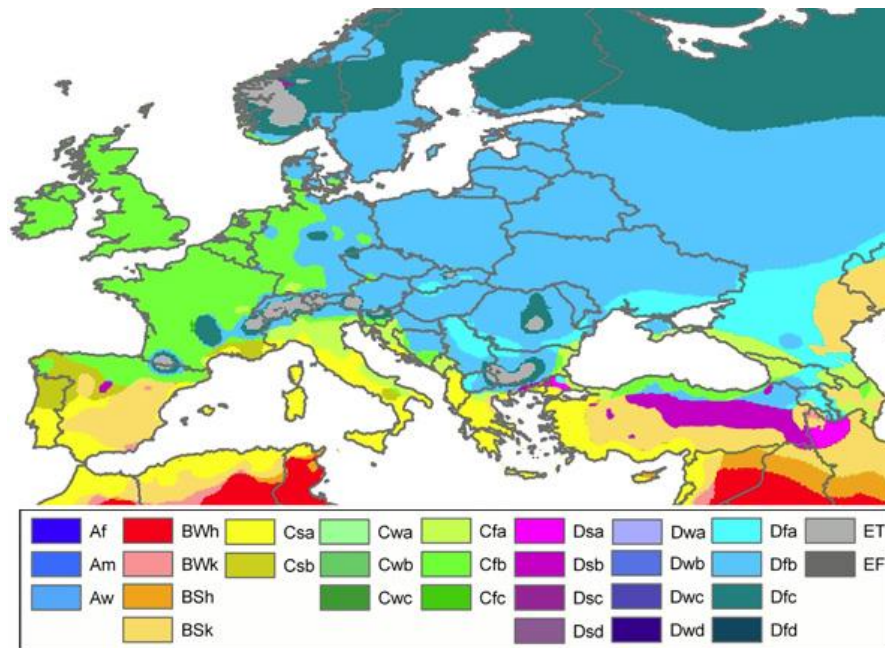
World map of Köppen-Geiger climate classification



Obrázek 2: Mapa Köppen-Geigerovy klasifikace podnebí ve světě [17]



Obrázek 3: Mapa Köppen-Geigerovy klasifikace podnebí ve světě – vlhké kontinentální podnebí [18]



Obrázek 4: Mapa Köppenovy klasifikace podnebí Evropy [19]

1.2.5. Klimatické zóny

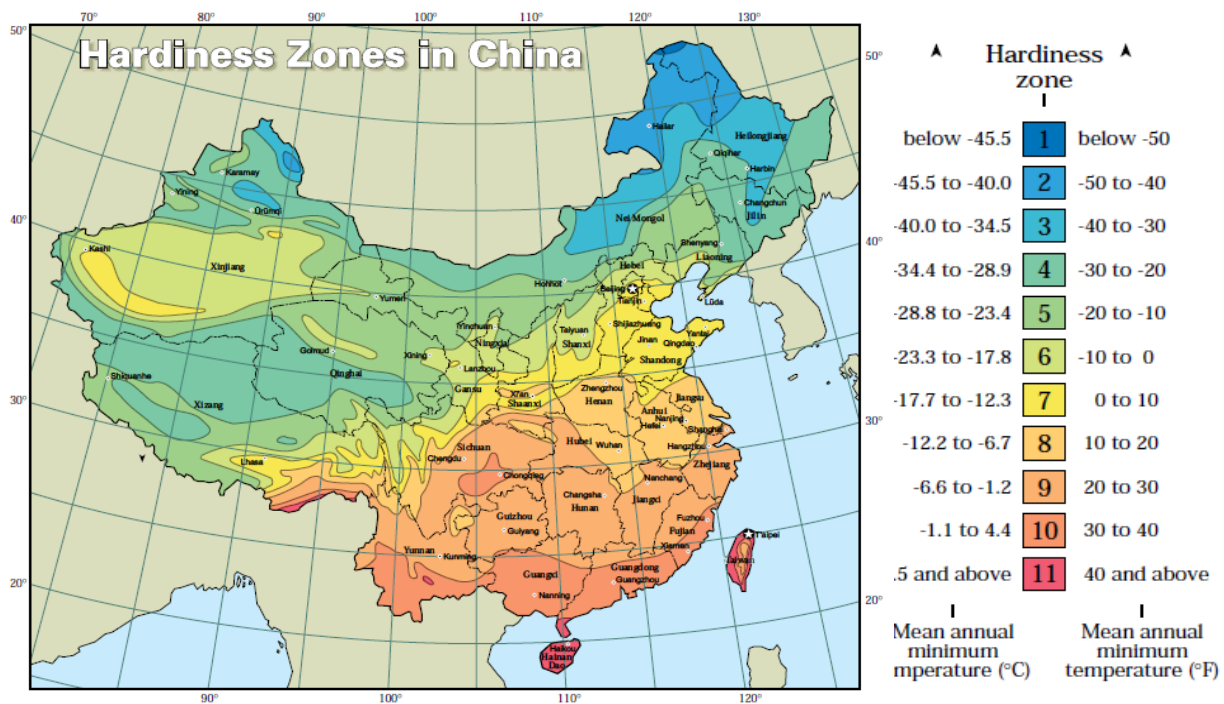
Každá rostlina má své dispozice, jak se v kterém klimatu bude vyvíjet a jak dobře přečká horká, suchá léta a mrazivé zimy. Mezi nejdůležitější vlivy působící na rostliny jsou slunce, voda, vítr a teplota, na kterou je kladen největší důraz. Především na teplotu zimní, která představuje mrazuvzdornost rostliny [20].

Jeden z nejstarších, zároveň i nejvíce rozšířených a populárních způsobů členění klimatických pásem, vznikl už v roce 1960 podle amerického způsobu USDA (ministerstvo zemědělství Spojených Států Amerických) a další možné členění je vlastní Austrálii, Kanadě, Číně nebo některým evropským zemím.

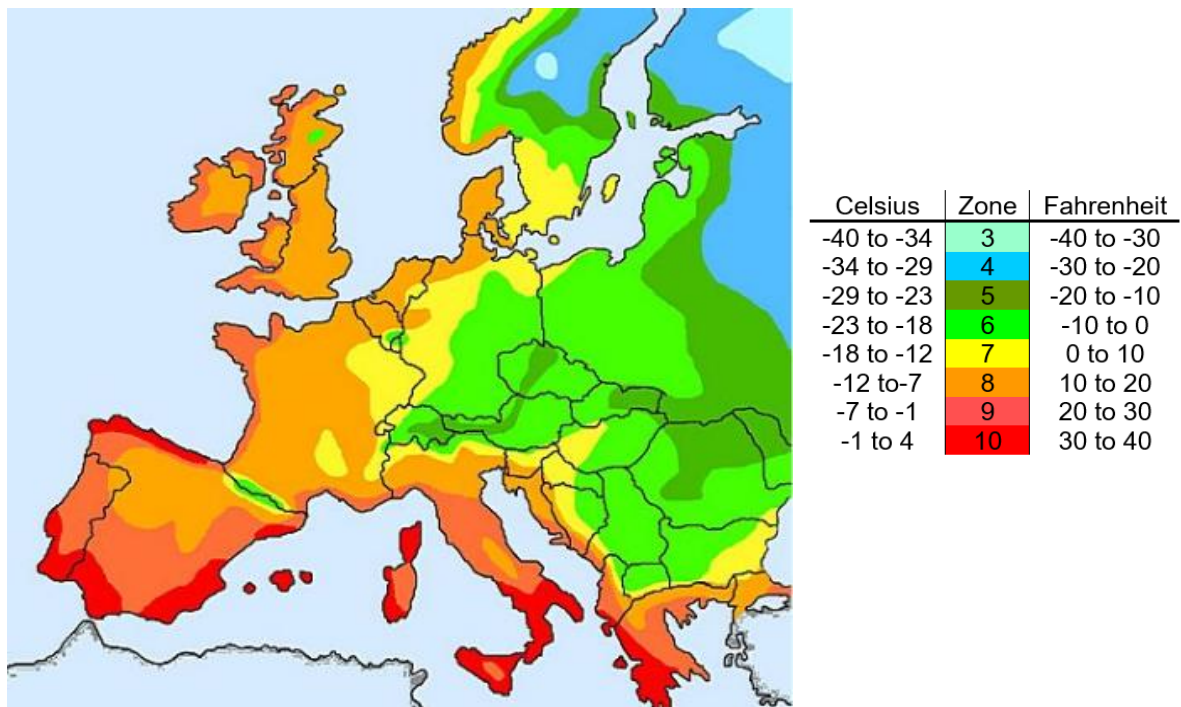
Klimatické zóny, neboli zóny odolnosti rostlin (hardiness zone), jsou zóny určující zeměpisné regiony vhodné pro přirozený růst a přežití daného rostlinného druhu. Tyto zóny jsou definovány vztahem klimatu v dané oblasti a hranicemi teplotní odolnosti rostliny (minimální a maximální), kterou je druh schopen přežít. Myšleny jsou rostliny rostoucí na volném prostranství, kde jsou zimní vlivy nejhorší.

Mapa klimatických zón je rozdělena do 11 klimatických zón podle naměřené průměrné minimální teploty během zimy. Ty jsou stupňovány po 10 F, tedy většinou po 5,6°C. Číslo 1 označuje oblast s minimální teplotou klesající pod -50 F, tj. -45,5 °C. Naopak číslo 11 znázorňuje oblasti s nejnižší zimní teplotou neklesající pod 40 F, tj. 4,4 °C. Lze v praxi najít i podrobnější členění klimatických pásem po 5 F, tedy po 2,8 °C, kdy jsou jednotlivá pásma navíc rozdělena do podtříd *a* – chladnější a *b* – studenější [21].

Pro porovnání růstových klimatických podmínek *Schisandry chinensis* nám slouží Obrázek 6: Klimatické zóny Číny s klimatickými zónami Číny, jakožto původní oblasti výskytu, a Obrázek 5: Klimatické oblasti Evropy, který znázorňuje klimatické zóny Evropy, tudíž i zóny pro Českou republiku. Většina území ČR a SR patří do zóny 6, můžeme předpokládat, že nejvyšší polohy do zóny 5, naopak teplejší jižní Morava a jižní Slovensko do zóny 7. Právě tyto zóny nalezneme také v Číně, kde zaujímají přibližně 1/3 rozlohy.



Obrázek 6: Klimatické zóny Číny [26]



Obrázek 5: Klimatické oblasti Evropy [27]

1.2.6. Podmínky v jihomoravském kraji

Jihomoravský kraj leží ve srážkovém stínu Českomoravské vrchoviny, proto je kraj sušší než ostatní kraje České republiky. Podnebí zde má vnitrozemský charakter – teplá léta a chladné zimy. Celkově podnebí Jihomoravského kraje je mírně teplé až teplé. Podle podnebních podmínek, které se podobají původnímu výskytu *Schisandry*, je možné rostlinu pěstovat i v Jihomoravském kraji.

Klanopraška je pěstována v botanické zahradě přírodovědné fakulty Masarykovy univerzity v Brně, kde roste moc dobře. Je umístěna na dřevěné opěrné konstrukci, která je na slunném místě. Po této konstrukci šplhá nahoru a prolétá ji. Plodí velmi dobře. Jediné, co jí trochu vadí, je vápenitá půda, která brání příjmu některých prvků, hlavně kovů, takže některé rostliny potom trpí chlorózou. To se dá substituovat hnojením. (Magdalena Chytrá, vedoucí botanické zahrady, 2017)

V Brně ji můžeme najít i v botanické zahradě a arboretu Mendelovy univerzity v Brně. „V arboretu máme velkou rostlinu na terasách. Roste v polostínu velkých stromů, chráněná před přímým sluncem. Roste dobře a plodí, byť proměnlivě v rámci let. Pak jsme měli rostlinu přímo na terasách, kde sice nějak rostla, ale ani omylem neplodila. Bývalý vedoucí arboreta ing. Nohel pěstoval a pěstuje klanoprašku ve svých rodných Blažovicích a jeho klon má velké plody a plodí bohatě. Klanopraška na zahradě léčivých rostlin na Kraví hoře je pověstná, byť roste na horké kozí hůrce, je chráněná budovou a plodí, pokud vím, pravidelně. Ale už je tam spousta let“, sdělil Ing. Michal Pavlík, vedoucí oddělení dřevin botanické zahrady Mendelovy univerzity.

V jihomoravském kraji se také rostlina pěstuje v Bylinkové zahradě ve Valticích, kde je „umístěna v malém vinohradu na drátěnce mezi révou – na plném slunci. V předešlých letech příliš neplodila (zejména z důvodu omrznutí květní násady v jarních měsících), vloni byla ale násada plodů poměrně bohatá. Vlivem extrémního sucha a horka ale plody dozrávaly jen obtížně – většina se jich scvrkla a nedošla do plné zralosti. Listy bývají poměrně často popáleny sluncem. Navíc roste v místech, kde je v podloží nějaký problém – vinohrad zde trpí chlorózami. Na jiném stanovišti – v polostínu, úrodnější půdě a s dostatečnou vláhou by podle mě profitovala o poznání lépe“, okomentoval pěstební podmínky rostliny *Schisandra chinensis* zahradník Ing. Vojtěch Kobližka.

1.2.7. Sběr a úprava

Kresánek a Krejča [16] zmiňují získávání dvou drog *Fructus schisandrae chinensis* (v Japonsku zvané Gomishi, v Číně Wu—Wei-Zi) – plod *Schisandry* a *Semen schisandrae* – semeno *Schisandry*. Obě jsou zapsány v ruském lékopise a plody taktéž zahrnuty v lékopise Čínské lidové republiky a Japonska. V lékopise Evropské unie tato rostlina obsažena není, proto na českém trhu se s ní setkáváme jako s potravinovým doplňkem (tablety, čaj apod.).

Plody jsou nejprve očištěny a sušeny v sušárnách při 35 – 40 °C (maximálně 60 °C) nebo na slunci (sesychací poměr 1 : 5). Další způsob je vylisování šťávy z bobulí. Zbýlý odpad se rozprostře a promyje vodou, dokud nezbydou pouze semena. Výtěžek takto upravených semen je kolem 5 % na hmotnost čerstvých plodů [23].

V praxi se zhotovuje ze semen anebo z celých plodů extrakt v poměru 1 díl plodů nebo semen na 3 díly 70% ethanolu. Denní dávka by se měla pohybovat okolo 6–15 g. Po měsíci se přefiltruje a užívá se 20 až 30 kapek dvakrát až třikrát denně po dobu 20-30 dnů. Používají se i rozemletá semena: 0,5 – 1 g 2krát denně. Odvar připravujeme z 10 g suchých rozdrčených plodů zalitých 200 ml vody při varu 20 minut. Denní dávka jsou dvě polévkové lžíce. Čaje nebo extrakty s nižším účinkem se připravují z listů a mladých výhonků. Bobule

mohou být také součástí nealkoholických nápojů, sirupů, kompotů, marmelád a také cukrovinek. Kůra se pro své vonné silice (vůně po citrónu) používá v parfumerii a jako přísada do čajů [22].

Klanopraška je i velmi dekorativní rostlinou a díky svému liánovitému vzrůstu je vhodná k použití na pergoly [7].

V sibiřských oblastech se Klanopraška používá jako koření, díky jejím pěti chutím. V dnešní době přídavek schizandry najdeme i v některých bylinných směsích, odvarech, mastech, krémech, a dokonce i při aromaterapiích [6; 7].

1.2.8. Obsahové látky

V plodech *Schisandra chinensis* byly nejvíce identifikovány tyto látky:

1. dibenzo[a,c]cyklooktadienové lignany (schisandriny (RU), gomisin (JAP), wuweizisu C (CHIN)) [24] dibenzylbutanové lignany (pregomisin, meso-dihydroguajaretová kyselina [25], nordihydroguajaretová kyselina [26])
2. monoterpeny (borneol, 1,8-cineol, cotral, p-cymol a α - a β -pinen)
3. seskviterpeny (seskvikaren, α -ylangen, chamingrenal, α -chamigren a β -chamigren, β -bisabolen) [11]
4. organické kyseliny (citrónová 11 %, jablečná 8 %, jantarová, fumarová, askorbová, malová, vinná 0,8 %, sorbová, protokatechová a stopy šťavelové kyseliny) [24]
5. další sloučeniny (thymochinol, β -sitosterol, schisandrová a isoschisandrová kyselina, flavonoidy – kvercetin a kamferol, které jsou jednou hlavních složek v listech a stoncích)

V oplodí byly navíc prokázány cukry, anthokyan, peptidy, vitaminy (zvláště C a E), a minerální látky. Semena, jakožto z hlediska použití nejdůležitější část rostliny, obsahují až 34 % mastného oleje. Tento olej se skládá z glyceridů kyseliny linolenové a oleinové, pryskyřice a tuku. Obsahuje také silice, steroly např. citrostadienol a vitamín E. Celou rostlinou prostupuje silice s řadou terpenických látek, především seskviterpeny, které dodávají charakteristickou citronovou vůni. [26] V kůře je jí okolo 3 %, v semenech 2 % [27]. Huang a spol. [28] vyizolovali z listů a stonku vysoce oxidované norterpenoidy netypických struktur nazvané wuweizidilaktony A – F s schiartanovým skeletem, a dva bisnortriterpenoidy 18 - norschiantanového skeletu nazvané wuweizidilaktony G a H [29]. U těchto látek zatím nebyl zjištěn účinek v lékařství, ale mohly by být důležitým markerem pro identifikaci a kontrolu kvality drogy [11].

1.3. Adaptogeny

Termín adaptogen byl poprvé použit sovětským lékařem a vědcem Nikolajevem Lazarevem v roce 1947, kdy hledal látky, které by dlouhodobě zvýšily výkonnost, aniž by byly zdraví škodlivé. Následně v roce 1968, Israel I. Brekhman, PhD, a Dr. I. V. Dardymov navázali na Lazarevovy práce a publikovali formální definici adaptogenu: [30]

1. Vyvolává nescifickou odpověď, tj. zvýšení odolnosti organismu vůči několika stresujícím faktorům prostřednictvím široké škály fyzikálních, chemických a biologických faktorů.
2. Má normalizující vliv na fyziologii bez ohledu na to, v jakém směru od normálu stresor působí. To znamená, že zlepšuje všechny stavy a nezhorší žádný z nich.
3. Nezasahuje do normálního fungování organismu více, než je nutné ke zvýšení nescifické odolnosti a není toxický. Musí mít jen minimální nepříznivé působení na fyziologické funkce organismu.

Obecně adaptogeny – též biostimulátory, harmonizátory, tonika, tonizéry – lze chápat jako prostředky, které zvyšují všeobecnou odolnost (imunitu) a výkonnost organismu, která je mu geneticky vlastní, a navíc nevnaší do těla nové či cizí látky. Umožňují přizpůsobovat se rychleji na změnu podmínek (to znamená lépe odolávat stresům vznikajícím následkem zvýšených nároků na psychický a fyzický výkon nebo vlivem nepříznivých klimatických podmínek), uplatňují se při překonávání potíží, které dostaly společné pojmenování „civilizační faktory“. Více informací o působení adaptogenů i schisandry na organismus nalezneme v kapitole 1.3.1 Farmakologie a 1.3.2 Farmakologie schisandry chinensis. [30], [31], [32]

1.3.1. Farmakologie

Adaptogeny se vyznačují širokou škálou farmakologických vlastností působící na lidský organismus. Celkově jde o kombinaci několika vlivů, do kterých se zahrnuje antioxidační účinek, podpora biosyntézy (tvorba nejdůležitějších aminokyselin a bílkovinných sloučenin, podpora přenosu energie do buňky, posila metabolismu, asimilaci a látkovou výměnu vůbec, urychlení léčebných a regeneračních procesů organismu (tkání, orgánů, buněk, systémů), zpomalení stárnutí organismu, zpomalení degenerativních pochodů v živočišném organismu a zábrana jeho opotřebení, zlepšení kondice nervového systému, posílení imunity, zlepšení hormonálního systému (žláz s vnitřní sekrecí), vyrovnání patologických výkyvů hodnot různých tělesných funkcí a obsahu určitých látek v organismu nebo pomoc tyto funkce zlepšovat, prevence proti rakovině a pomoc při její léčbě, zlepšení snášenlivosti chemických léků nebo léčebného ozařování, protizánětlivý účinek a zbrzdění rozvoje zánětu a pomoc při jeho léčení, zlepšení odolnosti vůči fyzické a psychické zátěži, snížení nároku na výživu, snížení fyzikálních účinků na změnu prostředí včetně extrémních podmínek (chlad, horko, průvan, vysoký/nízký atmosférický tlak), zlepšení chemického a biochemického účinku změněného prostředí z například zhoršeného životního prostředí, zlepšení potence, libida, sexuální kondice a zlepšení pracovní a sportovní výkonnosti. [33]

Definovat nebo logicky vysvětlit mechanismy působení adaptogenů je obtížné. Imunitní systém a stresový systém jsou dva regulační systémy zodpovědné za spojení podnět–odezva a adaptogeny jsou toho součástí. Stress je obranná reakce organismu na vnější faktory vedoucí ke stimulaci tvorby endogenního aktivujícího poslu, jako jsou například katocholaminy, prostaglandiny, cytokiny, oxid dusnatý (NO), atd., které následně aktivují energetické a jiné zdroje organismu. Toto je takzvaný „switch-on“ systém, který zahrnuje efferentní sympathoadrenální systém (SAS) a osu hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA), jakož i různé mediátory na buněčné, orgánové a systémové úrovni. Switch-on systém je vyvažován switch-off systémem, který chrání buňky a celý organismus před přehnanými reakcemi na aktivní posly. Tento systém zahrnuje některé důležité enzymy a mediátory v rámci vnitřní a mimobuněčné komunikace také na buněčné, orgánové a systémové úrovni. Když je stresový (zátěžový) systém v normálním stavu (homeostáza), činnost switch-on a switch-off systému se navzájem vyrovná a dostane do rovnováhy, která odráží reaktivitu stresového systému, myšleno také citlivost na stresor a stupeň ochrany organismu vůči škodlivým vlivům. Adaptování se na stresové situace má za následek snížení citlivosti na daný stresor a také ke zvýšení bazální hladiny switch-on a switch-off mediátorů, ale jejich poměr se nemění a dosahuje se heterostázy. Různé podání adaptogenů má za následek různou účinnost. V případě opakovaného podávání po dobu 1–4 týdnů lze pozorovat účinek podobný opakovanému tělesnému cvičení a změnu organismu z homeostázy do heterostázy. Tento efekt je hlavně přiřazován ose HPA. Takovéto opakované dávkování je užitečné ve sportovní medicíně při zvýšení vytrvalosti pro vytrvalostní běžce a zrychluje regeneraci ze stresové situace. Také je přínosné pro pacienty trpící chronickými nemocemi. Naopak jednorázová dávka je účinná v situaci, která vyžaduje rychlou reakci na napětí nebo stresovou událost.

Tyto účinky jsou spjaty s SAS systémem, který doprovází rychlou odezvu mechanismu na danou situaci [32].

Je také prokázáno, že se adaptogeny ve vyšších dávkách mohou chovat i jako stimulanty. Rozdílné chování je ukázáno v tabulce Tabulka 1: Rozdíl mezi stimulujícími účinky adaptogenů a ostatním stimulantům

Tabulka 1: Rozdíl mezi stimulujícími účinky adaptogenů a ostatním stimulantům [32].

Účinek	Stimulanty	Adaptogeny
Obnova po vyčerpávajícím fyzickém zatížení	Nízká	Vysoká
Vyčerpání energie	Ano	Ne
Výkonnost ve stresu	Klesá	Vzrůstá
Přežití ve stresu	Klesá	Vzrůstá
Kvalita vzrušení	Špatná	Dobrá
Nespavost	Ano	Ne
Vedlejší účinky	Ano	Ne
DNA/RNA a syntéza bílkovin	Klesá	Vzrůstá

1.3.2. Farmakologie *Schisandra chinensis*

Mezi interakcemi léků bylo prokázáno zvýšení plasmatické hladiny takrolimu a talinololu, které inhibují látku metabolizující izoenzym CYP3A a protein pro transport léků P-gp. Co se týče farmakologických studií v rámci lidských studií, žádné nebyly identifikovány. Ve studiích na myších bylo prokázáno, že schisandra podporuje obnovu jaterní tkáně, při současném podání tetrachlormethanu vykazovaly lignany schisandry jak protektivní funkci, tak i antikardiotoxickou funkci.

Lignany byly podrobeny pokusu, při kterém se sledovala antiradikálová aktivita schizandrolu A a schizandrolu B a byla porovnána se dvěma nejznámějšími antioxidanty – vitamínem C a E. Oba schizandriny měly větší vliv na hydroxylové radikály než vitamíny [11]. Dále také existují studie na méně známý lignan gomisin J a jeho halogenové deriváty, zejména bromové, které jsou potencionálními inhibitory replikace viru HIV-1.

Důvodem ke kontraindikaci je zvýšení nervové drážlivosti, epilepsie a také užívání přípravků z plodů Klanošprašky není vhodné při léčbě kumarinovými antikoagulancii (Warfarin). Lidé trpící poruchami srdeční činnosti, nebo počátečním stádiem ka šle by měli užití zvážít. Záběr biologických účinků je velice široký vzhledem ke skoro nulové toxicitě lignanů. Projevy toxických účinků u myší se projeví poklesem aktivity, apatií a zstupem tělesné hmotnosti, ovšem činnost hlavních orgánů nevykazovala změny [8]. Jako nežádoucí účinek se může objevit pálení žáhy, uvedeny také byly alergické vyrážky na očních víčkách, rukách, hrudi a dolní části zad. U velmi citlivých lidí se při požívání plodů nebo doplňků stravy může objevit průjem, bolesti břicha, zácpa a plynatost. V případě předávkování (standartní dávka uvedena jako odvar z 3–6 g plodů) byla pozorována nepříjemná bolest a pálení v podbříšku, pocity nachlazení, bolesti žaludku a snížená chuť k jídlu. [32], [33]

1.3.3. Lignany

Hlavními sloučeninami obsaženými v plodech a semenech *Schisandry* jsou lignandy, které jsou zodpovědné za jejich biologickou aktivitu. Zatím je celkově známo okolo 200 lignanů nacházejících se ve více než 70 čeledích rostlin. Vyskytují se ve formě glykosidů, převážně ve formě aglykonů. Nachází se hojně u nahosemenných (jehličnany) a u dvouděložných rostlin. Lignany jsou hlavními sekundárními metabolity čeledi *Podophyllaceae* a *Schisandraceae*. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typicky pak ve dřevě, kůře nebo pryskyřicích [34]. U některých druhů byl nalezen největší obsah v semenech [35]. Také bylo dokázáno, že různé hladiny ligandů jsou ovlivněny dobou sklizně a místem původu rostliny [36].

Lignany se skládají ze dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální β uhlíky obou postranních řetězců. Název lignany si tato skupina přírodních látek získala odvozením z toho, že tyto sloučeniny byly původně považovány za meziprodukty při biosyntéze ligninu $(C_6-C_3)_n$, polymeru složeného také z fenylypropanových jednotek jako lignany $(C_6-C_3)_2$. V současné době pouze některé z nich mohou sloužit k tomuto účelu, vzhledem se sktruktuře lignanů a ligninu [37].

Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8' [38].

Nepolární charakter lignanů umožňuje, aby snáze prostupovaly buněčnými membránami a dostávají tak schopnost ovlivňovat řadu buněčných dějů. Lignan podofylotoxin je inhibitorem polymerace tubulinu. Etoposid a teniposid, chemicky modifikované deriváty epipodofylotoxinu, jsou používány jako cytostatika, která způsobují zlomy v obou vláknech DNA dělících se buněk ireversibilní inhibicí topoizomerázy II. Tyto lignandy se používají jako léčiva působící v širokém spektru chemoterapie rakoviny [39]. Některé lignany také vykazují antivirovou, mikrobiální aktivitu a byla prokázána účinnost proti viru HIV-1.

Funkce lignanů u rostlin zůstává prozatím neznámá. Ovšem podle doložitelných informací hrají lignany nezanedbatelnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami, houbami, rostlinami navzájem a mezi rostlinami a hmyzem. A to formou buďto přímou nebo prostřednictvím vzájemného působení s jinými účinnými rostlinnými látkami. Pokud bychom vycházeli z důkazů, že prekurzory lignanů jsou meziprodukty nebo také komponenty tvorby ligninu, hrají roli v regulaci růstu rostlin [38].

1.1.1.1 Lignany čeledi *Schisandraceae*

Klasifikace do čtyř základních skupin: dibenzocyklooktadienové lignany, 4-aryltetralinové lignany, 2,3.dimethyl-1,4-diaryl-butanové lignany a 2,5-diaryltetrahydrofuranové lignany [13].

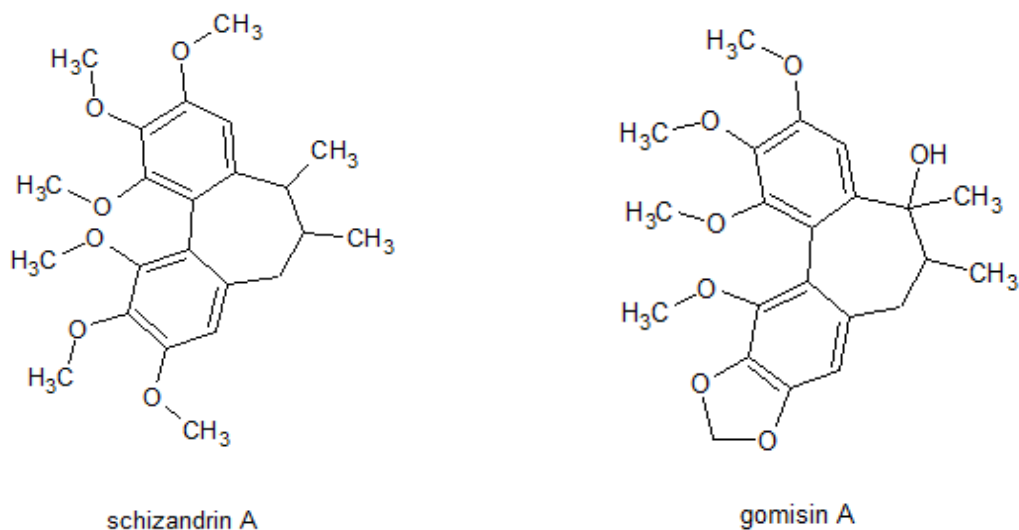
1.1.1.2 Lignany *Schisandra chinensis*

Na studii a izolaci lignanů pracovalo v šedesátých a sedmdesátých letech minulého století několik nezávislých vědeckých týmů – ruský, japonský a čínský. To má za důsledek synonyma jednotlivých lignanů. Jména lignanů byla ve většině případů převzata od jména drogy v originálním jazyce [40]. Například schisandrin je často v literatuře uváděn jako schisandrol A, gomisin A jako schisandrol B, deoxyschisandrin jako schisandrin A nebo wuweizu A [41]. Podle týmu vedeného prof. Ikeyou jsou v japonštině nazývány „Hoku-gomishi“ nebo „Kita-gomishi“ (např. gomishin) a „Wu-wei-zi“ např. (wuweizisu C) [42]. První lignan schisandry schisandrin byl izolován v roce 1961 Kočetkovem ze semen.

Deng *et al.* uvádějí, že 90 % celkových lignanů obsažených v plodech klanoprašky představuje pouze 15 lignanů a jejich zastoupení se velmi liší [26].

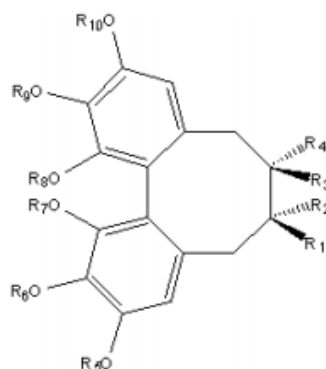
Za hlavní lignany Lu a Chen považují schisandrin, gomisin A a schisandrin B. Deoxyschisandrin už není tak hojně zastoupen, jako v ostatních druzích rostlin rodu *Schisandra*. V roce 2004 zjistili Schwarzingler a Kranawetter hlavní podíl lignanů v semenech, osemení a plodech, kde bylo celkové množství lignanů 3,21 %, 1,87 % a 1,43 %. Listy a kořeny obsahovaly lignany jen v nízkých koncentracích – 0,43 % a 0,44 %. V plodech zaznamenali pětikrát vyšší koncentrace gomisinu N než bylo množství ostatních lignanů, zatímco v semenech a osemení byla vyšší koncentrace gomisinu N a schisandrinu [43].

U evropských rostlin byly v semenech zjištěny především schizandrin (0,75-1,86%), gomisin A (0,13-0,90%), deoxyschizandrin (0,07-1,09%), gomisin N (0,24-1,49%) a wiweizisu C (0,01-0,34%), přičemž jednotlivé zastoupení lignanů v rostlině striktně závisí na místě původu a podmínkách růstu a i době sběru. Největší množství lignanů bylo zaznamenáno v plodech nasbíraných v srpnu [23], [44]. V semenech rostliny z Jižní Koree byl identifikován kromě hojně zastoupeného schizandrinu, gomisinu A i tigloylgomisin H [13].

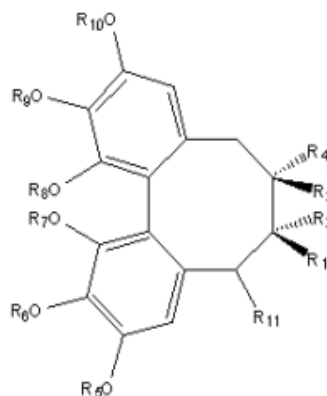


Obrázek 7: Hlavní lignany obsažené v *S. chinensis* - schizandrin A a gomisin A

Tabulka 2: Shrnutí struktur bioaktivních lignanů obsažených v rostlině *Schisandra chinensis* [6], [13]



Jméno	Vzorec	M_r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
Schizandrin	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	432	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
Isoschizandrin	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	432	H	Me	OH	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
Deoxyschizandrin	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	416	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
Schisanhenol	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	402	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	H	Me	Me
Gomisin N	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	400	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	Me	Me	Me	Me
Angeloygomisin H	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	500	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	Angeloyl	Me	Me
Tigloylgomisin H	C ₂₈ H ₃₆ O ₈	500	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	Tigloyl	Me	Me
Schisandrol B	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	416	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -	
Gomisin M1	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	H	Me	Me	Me
Gomisin M2	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	H	Me	Me	Me	Me
γ-Schizandrin	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	400	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	Me	Me	Me	Me
Schizandrin C	C ₂₂ H ₂₄ O ₆	384	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	Me	-CH ₂ -		
Gomisin J	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	388	H	Me	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	H
Gomisin L1	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	H	Me	Me	Me
Gomisin L2	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	386	H	Me	H	Me	-CH ₂ -	Me	Me	Me	Me	H



Jméno	Vzorec	M_r	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
Gomisin R	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	400	Me	H	Me	H	-CH ₂ -	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-OH
Gomisin O	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	416	Me	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-OH
Epi-gomisin O	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	416	Me	H	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		α-OH
Schisantherin A	C ₃₀ H ₃₂ O ₉	536	OH	Me	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-O-Benzoyl
Schisantherin B	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	514	OH	Me	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-O-Angeoyl
Schisantherin C	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	514	OH	Me	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-O-Tigloyl
Gomisin F	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	514	OH	Me	Me	H	-CH ₂ -	Me	Me	Me	Me		β-O-Angeoyl
Gomisin G	C ₃₀ H ₃₂ O ₉	536	OH	Me	Me	H	-CH ₂ -	Me	Me	Me	Me		β-O-Benzoyl
Angeoylgomisin P	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	514	Me	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-O-Angeoyl
Tigloylgomisin P	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	514	Me	OH	Me	H	Me	Me	Me	Me	-CH ₂ -		β-O-Tigloyl

Pozn.: Deoxyschizandrin = Schizandrin A; Schizandrin = Schisandrol A; Schizandrin B = γ-schizandrin; Gomisin A = Schisandrol B; Gomisin K3 = Schisanthenol, Gomicin C = Schisantherin A; Gomisin B = Schisantherin B

1.3.4. Schisandrin A

Je to bioaktivní lignan nacházející se v plodech několika druhů rodu *Schisandra*, nejvíce ve *Fructus Schisandrae* a *Schisandra chinensis*, které mají ochranné účinky pro játra a i protinádorové, antioxidační účinky a antiischemické účinky *in vivo*. Jedná se o organickou heterotetracyklickou, konkrétněji dibenzocyklooktadienovou sloučeninu inhibující apoptózu u organismů s více buňkami a také je řazen mezi rostlinné metabolity [32],

1.3.5. Chlorofyl

Zelené rostliny získávají energii především pohlcením světelného záření o určitých vlnových délkách (především červeného světla). Právě pohlcení světelné energie a její přeměna na chemickou energii (fotolýza vody) je zprostředkována rostlinnými pigmenty přítomnými v chloroplastech. Jsou to obvykle hydrofobní barviva obtížně rozpustná ve vodě a v buňce jsou proto vázána v membránách a složitých proteinových komplexech [45].

Chlorofyl je pigment obsažený v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách. Barva chlorofylu je zelená, neboť absorbuje modrou a červenou část světelného spektra a ostatní odráží, tím se nám jeví jako zelený. Je zjištěno, že v průběhu fotosyntézy absorbuje energii světelného záření ze Slunce a využívá ji k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého a vody [46]. Právě pro fotosyntézu mají rozhodující význam především chlorofyly a, b a také karotenoidy.

Chlorofyl výborně absorbuje energii světelného záření díky aromaticitě, tzn. pozici delokalizovaných π -elektronů nad a pod planárním strukturním kruhem. Molekuly chlorofylů jsou složeny ze dvou komponent: substituovaný porfyrinový kruh s centrálně navázaným kationtem Mg^{2+} a dlouhý uhlovodíkový řetězec – fytol [47].

Většina vyextrahovaných barviv se pozvolna rozkládá na vzduchu a na světle, pokud je nutné extrakt rostlin skladovat, je nejlepší jej dát do ledničky.

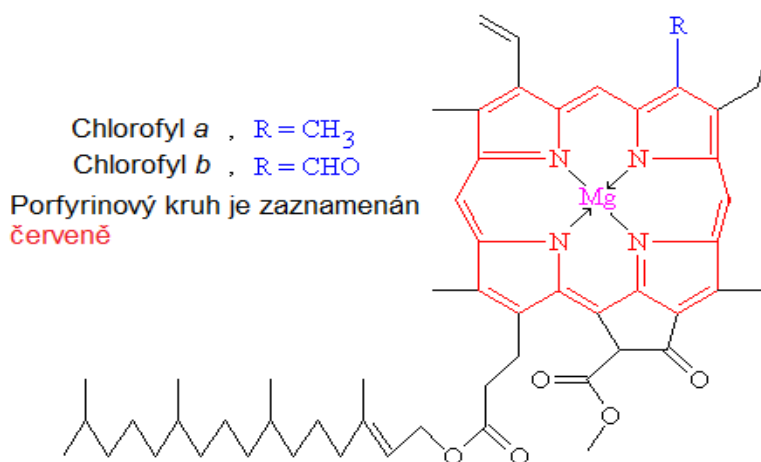
1.1.1.3 Chlorofyl a

Chlorofyl a je základní fotosyntetický pigment, který obsahují pouze autotrofní organismy schopné primární produkce, tj. fotosyntézy (vyšší rostliny, sinice, řasy).

1.1.1.4 Chlorofyl b

Chlorofyl b je identický chlorofylu a s výjimkou C-7 pozice, kde je formylová skupina nahrazena methylovou skupinou. Dostaneme ho oxidací chlorofylu a. Tato změna posune hodnotu maximální absorpce na kratší vlnovou délku.

Feopigmenty jsou produkty rozkladu chlorofylu. Hodnota koncentrace feopigmentů slouží jako indikace stavu organismů [48].



Obrázek 8: Struktura chlorofylu a a chlorofylu b

1.4. Potravinové doplňky

Označení doplněk stravy, potravní doplněk neboli také nutraceutika, je označení pro přípravky vypadající podobně jako léčivý přípravek, avšak spadá do zvláštní kategorie potravin. Mají za úkol dodat organismu chybějící živiny, které nejsou dostatečně přijímány v běžné stravě [49].

I na českém trhu poptávka po potravních doplňcích každým rokem roste a objevují se i doplňky s příměsí schisandry, které v minulosti byly pouze dováženy z ciziny. Díky rozmanitým farmakologickým vlastnostem se setkáváme s lihovými extrakty, také se sušenými plody *Schisandry*, které jsou obsaženy v mnoha polykomponentních přípravcích.

Právě kvůli hořko-trpko-kyselé chuti není moc příjemná samostatná konzumace. V případě jak vodného extraktu, sirupu, či prášku, se mi jeví chutná kombinace v podobě přidavku do smoothie nápojů, či kaší, kde zaboduje právě kyselá chuť. Jako tonizující složka by schisandra mohla být obsažena v nealkoholických nekvašených nápojích v množství nepřesahujícím 20 mg na 1 l nápoje. Takový nápoj by se dále skládal z minimálně 5 obj. % a maximálně 70 obj. % hroznové šťávy (*Vitis vinifera*) a minimálně 5 obj. % a maximálně 25 obj. % šťávy případně dřeně rakytníku řešetlákového (*Hippophae Rhamnoides*). Toto složení může být doplněno pitnou nebo minerální vodou, v případě rychlého dodání energie v podobě sacharidů přidavkem fruktózy případně fruktózového sirupu (není nutné). Jako regulátor kyselosti může obsahovat také přírůdek kyseliny askorbové v množství nepřesahujícím 25 mg na 1 l nápoje. Obsah rozpustné sušiny musí být minimálně 5 hmotnostních %, obsah veškerých kyselin minimálně 2 g v jednom litru nápoje. Nápoj může být variantně sycen oxidem uhličitým.

Nejznámější přípravek v Číně, jakožto v kolébce čínské medicíny a používání schisandry, je Shend Mai San. Je to kombinace *Panax ginseng*, *Schisandra chinensis* a *Ophiopogon japonicus*. Používá se při vyčerpání organismu a ztrátě tělesné energie [50]. Jiný přípravek S-113m skládající se z *Panax ginseng*, *Schisandra chinensis* a *Biota orientalis* byl navržen pro zlepšení procesu učení a paměti, což úzce souvisí s ovlivněním fyziologického stárnutí a při deficitech paměti spojených s věkem [51]. Spolu s pikolinátem chromu jsou plody schisandry doporučovány k léčbě zhoršené glukózové tolerance. Již po třítydenním užívání se objevuje výrazné zlepšení tolerančního testu [6]. Mangolka je spolu s dalšími osmi rostlinami součástí korejské medicíny Dae Jo Whan, která tuto směs využívá při léčbě ischemické choroby srdeční. Mezi nejvíce prostudovanou aktivitu plodů patří aktivita hepatoprotektivní, kdy bylo prokázáno, že antioxidační aktivita (nejvíce schizandrin B) vede ke snížení poškození jaterní tkáně, kdy dojde ke zvýšení kapacity jaterního antioxidačně detoxikačního systému. Při fyzické zátěži se zvyšuje obsah oxidu dusnatého a hydrokortisonu v krvi a ve slinách, v případě podání adaptogenu se koncentrace NO a hydrokortisonu ve slinách nezvýšila. Lze tedy používat klanoprašku jak pro hodnocení fyzické zátěže, tak ochranného účinku vůči stresu [52].

1.5. Technologie izolace bioaktivních látek

Obecně je extrakce separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalnou či pevnou fázi do jiné kapalnou fáze. Je velmi výhodná, protože ji lze provádět i při laboratorní teplotě nebo za chladu. Extrakce (vyluhování) je dělicí metoda, ve které se využívá rozdílné rozpustnosti látek v rozpouštědlech. Tudíž extrahovaná látka může přecházet do roztoku z kapalnou fáze (vytřepávání) nebo pevnou fáze (extrakce). Podle podmínek vyluhování a zvoleného postupu získáváme různé vyluhování, pro které je také důležitý hmotnostní poměr mezi drogou a vyluhovadlem: nálevy a odvary 1:10, tinktury 1:5 nebo extrakty 1:1. Uplatňují se v zásadě dva mechanismy: difuze a permeace. Obsahové látky z rozrušených buněk přecházejí do luhovadla prostým rozpouštěním, které je v principu řízeno mechanismem difuze a probíhá podle koncentračního spádu. Rychlost vyluhování se řídí stejnými principy jako

rychlost rozpouštění a podobně jako rozpouštění je tedy i extrakce ovlivněna mnoha faktory, mezi něž patří zejména: povrch rozpouštěných částic, teplota, doba extrakce a koncentrační spád. Z neporušených buněk je rozpouštění látek složitější, protože luhovadlo musí nejdříve proniknout přes buněčnou membránu do buňky a roztok musí naopak přestoupit přes buněčnou membránu do buňky (permeovat) [53].

Vlastnosti vyluhovaného roztoku záleží na vlastnostech použitého rozpouštědla. Nejčastěji se používá voda nebo ethanol různé koncentrace (60–90 %), k extrakci lze použít i stlačený plyn, například oxid uhličitý.

Extrakční postupy se v zásadě rozdělují podle dvou kritérií: teploty a pohybu vyluhovadla. Spadají sem metody macerace, perkolace a vytřepávání [54]. Tyto extrakční metody jsou jednoduché a není potřeba drahých přístrojů, postačí jednoduché laboratorní vybavení, bohužel během nich dochází ke ztrátě řady sloučenin kvůli izomeracím a oxidacím během probíhající extrakce. Proto byly vyvinuty nové metody extrakce a izolace lignanů, které šetří čas a mají nižší spotřebu rozpouštědel [36]. K těmto metodám patří například ultrazvuková extrakce, která poskytuje kratší extrakční čas, prokazuje lepší reprodukovatelnost a i nižší spotřebu rozpouštědel. Vybrané lignany, například schizandrin, schizanthrin A a deoxyschizandrin, jsou extrahovány pomocí homogenní iontové kapalinové mikroextrakce, která nevyužívá těkavá organická rozpouštědla a postačí pouze malé množství vzorku. Extrakční čas je srovnatelný s ultrazvukovou extrakcí a Soxhletovou extrakcí [55]. Gao a You (2012) využili tlakovou extrakci kapalinou (PLE), kdy je jako extrakční činidlo použit methanol za teploty 125 °C. Principem této metody je zvýšení extrakční kinetiky právě díky zvýšené teplotě rozpouštědla, k čemuž je potřeba i zvýšený tlak, aby se rozpouštědlo udrželo v kapalném stavu a nepřecházelo do stavu plynného [56].

Mezi novější techniky extrakce jednotlivých lignanů z klanoprašky patří superkritická fluidní extrakce oxidem uhličitým (SFE). Tato metoda je vhodná pro extrakci čistých látek z přírodních materiálů. Je založená na rozpustnosti dané složky v rozpouštědle, která je v superkritickém stavu. Rozpouštědlo v tomto stavu je velmi mobilní, schopnost rozpouštění se přibližuje kapalným rozpouštědlům, zatímco penetrace do pevné matrice je usnadněna transportními vlastnostmi blízcí se plynu. Výhodou je čistota extraktů, kdy zde nejsou detekovány zbytky toxických rozpouštědel. Alternativou SFE je superkritická fluidní mikroextrakce (SFME) lišící se od SFE menším množstvím vzorku. Další metodou je mikrovlnná extrakce (MAE) a v praxi je využívána k extrakci rostlin s využitím v medicíně. Využívá zvýšení efektivity klasické extrakce. Vzorek je během extrakce promícháván a ohříván. Mikrovlnné záření proniká do materiálu spolu s polárními molekulami rozpouštědla a dochází k tvorbě tepla, poté se celý materiál ohřívá stejnoměrně. Zvyšuje se tím migrační rychlost rozpouštěných iontů a tím penetrace rozpouštědla do tuhé matrice, tím je usnadněno uvolnění cílových analytů [57]. Výhodou je rychlost a nízká spotřeba rozpouštědel, oproti tomu je aplikace této metody možná pouze u termostabilních sloučenin, kvůli vyšší teplotě. Také je možno použít pouze polární rozpouštědla, protože nepolární nejsou mikrovlnami ovlivňovány [58]. Mimo jiné se pro extrakci používá i on-line dynamická mikrovlnná extrakce (DMAE).

Většinu ligandů z klanoprašky čínské lze izolovat a extrahovat podobným postupem. V experimentální části bude využita extrakce v Soxhletově extraktoru.

1.5.1. Extrakce v Soxhletově ekstraktoru

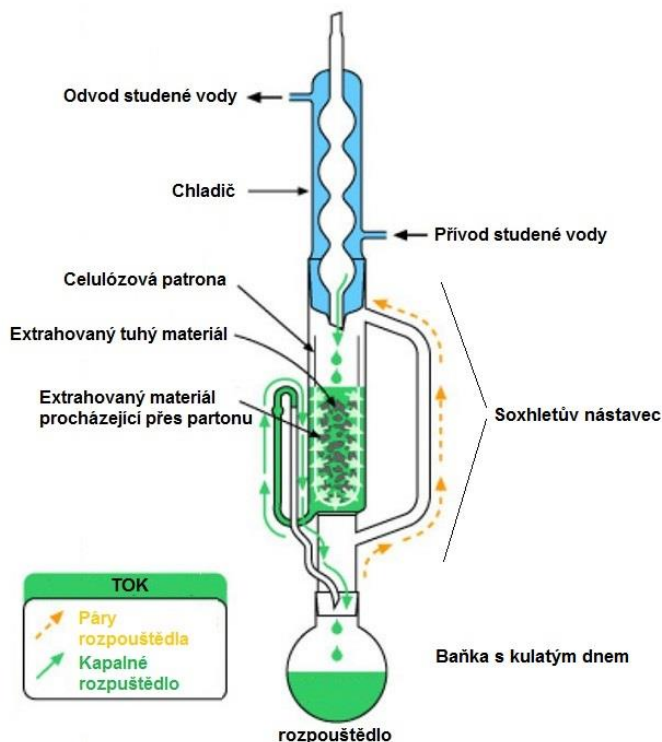
Tato technika je využívána pro extrakci látek z tuhých matric. Jedná se o extrakci typu tuhá látka – kapalina. Používá se většinou k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu nebo z technických produktů. Extrahuje se většinou v přístroji, ve kterém se jednoduchým způsobem realizuje opakovaná extrakce, aby byl výtěžek izolace co největší. Do destilační baňky se nalije vyluhovadlo, na baňku se nasadí extrakční nástavec, ve kterém je vložena patrona s extrahovanou látkou. Vrchní část tvoří zpětný kuličkový chladič, kterým proudí studená voda. Po zahřátí destilační baňky páry vyluhovadla stoupají boční trubicí do chladiče, kde kondenzují a stékají na extrahovanou látku v extraktoru. Hladina kapaliny v extraktoru stoupá, až dosáhne úrovně přepadové trubice. V tomto okamžiku extrakt přeteče na principu spojených nádob zpět do baňky a celý děj se opakuje. Extrakt se hromadí v destilační baňce. V Soxhletově extraktoru se droga extrahuje několik hodin až dní.

Rozpouštědlo volíme tak, aby se v něm co nejselektivněji rozpouštěla izolovaná složka. Je vhodné, má-li použité rozpouštědlo nízký bod varu, aby je bylo možno odstranit destilací od izolované složky, aniž by došlo k jejím ztrátám těkáním [54].

Výhody extrakce dle Soxhleta jsou v nízké pořizovací ceně extraktoru, extrakce za atmosférického tlaku, minimální nároky na obsluhu extraktoru, robustnost, avšak nevýhodou je časová náročnost, kdy extrakce trvá 6 až 48 hodin, také velká spotřeba organických rozpouštědel (250-500 ml) [59; 60]. Tato extrakce byla nejvíce používána v 80. letech 20. století a přestože tuto klasickou extrakční metodu v současné době nahradily modernější extrakční techniky, je extrakce dle Soxhleta dodnes využívána jako srovnávací metoda pro jiné extrakční techniky.

Soxhletův extraktor se skládá ze tří hlavních částí:

- Baňka s kulatým dnem
- Soxhletův nástavec
- Chladič zpětný kuličkový



1.6. Instrumentální metody

1.6.1. Spektrofotometrie

Metoda využívající jev, ke kterému dochází při interakci záření s hmotou. Při absorpci záření v ultrafialové a viditelné oblasti dochází k excitaci valenčních a nevazebných elektronů, ale i ke změnám rotačních a vibračních stavů molekuly. Takto vzniklé absorpční pásy se dají využít ke kvalitativní a strukturní analýze, ale hlavně ke kvantitativní analýze organických látek.

Světlo, které projde vzorkem, je částečně tímto tělesem pohlceno (absorbováno). Tuto fyzikální vlastnost popisuje veličina absorbance. Opakem je transmitance, která vyjadřuje míru schopnosti tělesa propouštět záření. Důležitým vztahem, nejen pro spektrofotometrii, je Lambert – Beerův zákon, podle kterého se absorbance rovná součinu molárního absorpčního koeficientu, koncentraci měřeného roztoku a tloušťku absorbující vrstvy, tudíž je absorbance přímo úměrná tloušťce absorbující vrstvy a koncentraci látky. Zákon lze použít pouze na zředěné roztoky při použití přísně monochromatického světla, kdy absorbující částice nepodléhají žádným interakcím [57].

1.1.1.5 Spektrofotometr

K měření v oblasti viditelného a ultrafialového záření slouží spektrofotometry, kde jsou jako monochromátory použity hranoly nebo mřížky. U těchto přístrojů lze libovolně měnit vlnovou délku. Konstrukčně se dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. U jednopaprskového spektrofotometru lze změřit pouze vystupující tok záření, proto je nutné nejdříve proměřit srovnávací roztok a následně roztok analyzovaný. Dvoupaprskový spektrofotometr měří v prostoru dvěma paprsky – referenční a srovnávací. Do dráhy srovnávacího paprsku se vkládá standard (nejčastěji čisté rozpouštědlo), do dráhy měřícího svazku kvjeta s měřeným vzorkem. Spektrofotometr vyhodnocuje podíl signálu, který je úměrný intenzitě dopadajícího srovnávacího svazku po průchodu standardem. Výsledný podíl je hodnota propustnosti vzorku [58].

Zdrojem světelného záření paprsku slouží elektrická žárovka s wolframovým vláknem (viditelná oblast – 400-800 nm), vodíková výbojka (ultrafialová oblast –10-400 nm), Nernstova tyčinka nebo různé zářiče. Požadavkem je, aby záření bylo časově stálé a intenzivní po dobu měření [58].

Polychromatické záření zdroje se po průchodu kondenzorem odráží od zrcadla do vstupní štěrbině monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází svazek téměř monochromatických paprsků, z nichž je vybrána požadovaná vlnová délka. Po průchodu absorpčním prostředím (kvjeta se zkoumaným roztokem), kde dochází k jeho částečné absorpci, dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor, který na principu diodového pole převádí zářivý tok na elektrický signál [61].

Pro další kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení obsahu účinných látek lze použít citlivější analytické metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC), spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC - MS), dále také spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií za použití analyzátoru doby letu (HPLC-TOF-MS), spojené plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). A analýze struktur lignanů se používá UV spektroskopie, IR spektroskopie, hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance (NMR) [11].

1.6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separáčnı́ technika HPLC (High performance liquid chromatography) je pouřívána ke kvalitativnı́ a kvantitativnı́ analýze látek organického původu. Separace sloučenin je zalořena na retenci látek v chromatografickém systému. Různá retence složek látky způsobuje to, ře jednotlivé složky opouřtřej chromatografickı́ systém v různých časech (eluční časy), které umožňují jednotlivé složky látky identifikovat. Chromatografickı́ systém se skládá ze stacionární a mobilnı́ fáze. Stacionární fází je sorbent v kolonovém uspořádanı́. Volba mobilnı́ fáze je důležitá nejen z hlediska separace látek v koloně, ale i z hlediska detekce [62].

Vysokoúčinná reps. ultraúčinná kapalinová chromatografii (HPLC reps. UPLC) dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti zejména použitım kolon naplněných sorbentem s velmi malými částicemi 1,5 až 5 μm a poměrně velkým průtokem mobilnı́ fáze [63; 64].

1.6.3. Součásti spektrofotometru

Kapalinový chromatograf je slořen z jednoho či více zásobnıků mobilnı́ fáze, z čerpadel mobilnı́ fáze, tlumiče pulzů, směřovače mobilnı́ fáze, odplynovače, dávkovací zařizenı́, analytické kolony, detektoru a záznamového zařizenı́ (obr. ř. 11). Můře být doplněn i o další volitelné doplňky např. kolektor frakcí.

Čerpadla mobilnı́ fáze v HPLC jsou důležitou součástí chromatografu z důvodu vysokých odporových tlaků kolony. Proto je potřeba použitım kvalitních čerpadel, které jsou dvojnı́ druhu. Prvnı́ na principu velkoobjemové střıkačky a druhı́ na principu střıkačky s malým objemem činné části. Výhodou čerpadla na principu velkoobjemové střıkačky je absence tlakových pulzů tzv. bezpulznı́ režim, ale nevýhodou je zdlouhavá výměna a promývání mobilnı́ fáze. Čerpadla s malým objemem činné části naopak využívají rychlejší výměny mobilnı́ fáze a nevýhodou je přítomnost tlakových pulzů mobilnı́ fáze.

Dávkování vzorku lze provádět manuálně přesnou střıkačkou (např. značky Hamilton) pomocí šesticestného ventilu s využitım smyčky nebo vnitřního prostoru. Další možností dávkování jsou automatické injektory.

Nejdůležitější součástí chromatografického systému je kolona, v níř se uskutečňuje samotný separáčnı́ proces. Kolona je trubice z inertního materiálu vyplněná částicemi stacionární fáze. Průměrná kolona pro HPLC má délku 10 až 25 cm s vnitřním průměrem 3 až 5 mm a velikostí částic mezi 2 až 5 μm . Existují různé typy stacionárních fází. Nejčastěji se uřívají plně poréznı́ a povrchově poréznı́ částice.

Klíčovou součástí HPLC je detektor, který využívá různých fyzikálně chemických vlastností analyzovaných látek. Detektor měř konkrétnı́ vlastnost eluátu, u které dochází ke změně při eluci analytu [65].

1.6.4. Hmotnostnı́ spektrometrie (MS)

Hmotnostnı́ spektrometrie je spektrální analytická metoda slouřící k měření poměru hmotnosti a náboje iontů analyzovaných látek. Je zalořená na převodu molekul na ionty, rozlišení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboj a následnému záznamu relativních intenzit těchto iontů. Výsledkem je hmotnostnı́ spektrum, které vyjadřuje závislost relativnı́ intenzity iontového proudu na efektivnı́ hmotnosti m/z . Hmotnostnı́ spektrometrie je metoda destruktivnı́, ale k analýze je potřeba pouze malé množství vzorku.

Hmotnostnı́ spektrometr se skládá z iontového zdroje, který slouř k ionizaci vzorku, hmotnostnı́ho analyzátoru, kde dochází k separaci iontů na základě poměru m/z , detektoru, který slouř k detekci vzorku a vyhodnocovacího zařizenı́. Další součástí hmotnostnı́ho spektrometru je vakuovı́ systém. Separace a detekce iontů probíhá ve vakuu [66].

2 CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce byla identifikace rostlinných adaptogenů v rostlině *Schisandra chinensis*. Na základě rešeršní analýzy bylo popsáno působení těchto adaptogenů na organismus a predikováno možné využití v potravních doplňcích. Byly vytipovány vhodné regionální pěstební klimatické zóny pro rostlinu a k její analýze také vhodné extrakční techniky pro izolaci adaptogenu a chlorofylu. Dalším dílčím cílem diplomové práce byla extrakce plodů a listů rostliny *S. chinensis* pomocí Soxhletovy extrakce a acetonové extrakce a následná kvalitativní analýza lignanu Schisandrinu A. Zpracování a vyhodnocení kvantity chlorofylu *a*, chlorofylu *b* z extraktu listů pomocí spektrofotometrie, zpracování kvantitativních výsledků Schisandrinu A a jejich diskuze byla konečným cílem diplomové práce.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tématem experimentální části této diplomové práce bylo porovnání extrakce dle Soxhleta a extrakce ultrazvukem sušených plodů a následná identifikace, kvalifikace a kvantifikace lignanu Schisandrinu A prostřednictvím HPLC, dále extrakce čerstvých zelených listů metodou acetonové extrakce a identifikace a kvantifikace chlorofylu pomocí UV-VIS spektrometru.

Pro vyhodnocení nejlepšího extrakčního činidla pro zjištění obsahu rostlinných barviv, speciálně chlorofylu, byla provedena extrakce 99,98% ethanolem a další extrakce 80% acetonem. Byly extrahovány čerstvé listy ze zahrady Ing. Josefa Kotlíka, CSc. Nejvhodnějším eluentem byl 80% aceton, z důvodu přesnějšího absorpčního spektra chlorofylu, proto jsou dále popsány výsledky pouze z této extrakce.

Extrakce sušených plodů rostliny *Schisandra chinensis* z roku 2018 byla provedena celkem u 2 vzorků, a to 3x u vzorků původem z ČR ze zahrady Ing. Josefa Kotlíka, CSc a 3x u vzorků původem z Číny. Těchto šest extraktů bylo nejprve extrahováno ultrazvukem, poté extrakce dle Soxhleta proběhla pouze 1x u každého vzorku. Navíc byl analyzován ultrazvukový extrakt z roku 2013 od Ing. Soni Kozákové. Všech celkem 9 roztoků bylo nakonec analyzováno pomocí HPLC s vyhodnocením kvality a kvantity adaptogenu Schisandrinu A.

3.1 Rostlinný materiál a chemikálie

VZORKY

- *Schisandra chinensis*, původem z Ruska, pěstována v České republice, Ing. Josef Kotlík, CSc. (sušené plody z roku 2018)
- *Schisandra chinensis*, Čína – Dongbei, e-shop Salvia paradise (sušené plody 2018)
- *Schisandra chinensis*, Česká republika, Ing. Josef Kotlík (čerstvé listy otrhány 30. 4. 2019)

CHEMIKÁLIE

- Ethylalkohol (Lachema, Brno; pro UV spektroskopii)
- Methanol (Biosolve, Francie; pro LC-MS)
- Uhličitán hořečnatý (Lachema, Brno)
- Destilovaná voda

3.2 Instrumentace

3.2.1 Zařízení pro přípravu a extrakci

- Analytické váhy Scaltex SPB 52, Scaltex Instruments, Germany
- Extrakční celulózová patrona, 30/100 mm, Filtrak-VEB-Specialfilterfabrik
- Soxhletův extraktor
- Přístroj EVATERM pro sušení pod dusíkem (LABICOM s.r.o., ČR)
- Ultrazvuková lázeň, typ Teson 4, Tesla, Česká republika
- Zařízení pro přípravu MilliQ vody Millipore QGARD
- Filtry: Cronus syringe filter, Nylon, 4 mm, 0,2 μm
LUT syringe filter, PTFE, 13 mm, 0,45 μm
- Běžné laboratorní vybavení

3.2.2 Přístroje

- Jednopaprskový UV-VIS spektrofotometr Specord 50 PLUS
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, USA (HPLC)

3.2.3 Softwarové vybavení

- WinASPECT PLUS
- Microsoft Office Word 2016
- Microsoft Office Excel 2013
- Instrument 1 (online): Method & Run control
- Instrument 1 (offline 2): Data analysis

3.3 Postupy a podmínky měření

3.3.1 Extrakce

3.3.1.1 Listy *S. chinensis*

0,0501 g čerstvě natrhaných listů bylo naváženo na analytických vahách a převedeno do třecí misky. V misce byly lístky třeny s přidavkem uhličitanu hořečnatého (dvě špachtličky 0,1038 g) a se 3 mililitry 80% acetonu. Tření bylo ukončeno, když byly rozdrceny veškeré lístky a v misce již nebyl žádný pevný zelený podíl. Takto připravený extrakt byl dvakrát přefiltrován přes filtrační papír a převeden do malé kádinky. Třecí miska byla několikrát vymyta malým množstvím 80% acetonu a z kádinky byl extrakt převeden do malé odměrné baňky (10 ml) a ta byla doplněna po rysku 80% acetonem.

Chlorofyl je citlivý na světlo a kyslík, především v průběhu extrakce. Vzorky nesmí být vystaveny přímému světlu nebo vzduchu, aby nedocházelo k oxidačnímu a fotochemickému rozkladu. Proto byl při tření do misky přidáván uhličitan hořečnatý, který zabraňuje přeměně chlorofylu na feopigmenty. Homogenizace vzorku může v některých případech zvýšit účinnost extrakce.

Doba mezi extrakcí a následným spektrofotometrickým měřením by měla být co nejkratší. Extrakt však může být před měřením skladován přes noc v chladničce při teplotě 4 °C (doba skladování by neměla být delší než 3 dny). Skladovat extrakty při teplotě -25 °C je možné až 30 dní.

3.3.1.2 Plody *S. chinensis* – extrakce ultrazvukem

Sušené CZ plody *Schisandry chinensis* byly rozdrceny v třecí misce a částečně homogenizovány. Dále bylo naváženo množství 0,1248 g, 0,1265 g a 0,1257 g plodů a společně s 9 ml methanolu převedeno do vialky. Vzorky byly následně extrahovány v ultrazvuku při pokojové teplotě 30 minut. Vzniklá směs byla zfiltrována přes papírový filtr a filtráty byly zkoncentrovány dusíkem do sucha. Takto zkoncentrované vzorky byly poté rozpuštěny v 1 ml methanolu a zfiltrovány přes 0,45 µm (PTFE) membránový filtr a potom přes 0,2 µm nylonový filtr.

Usušené plody původem z Číny byly rozdrceny a homogenizovány v třecí misce, následně bylo odváženo množství 0,1250 g, 0,1263 g, 0,1252 g plodů a společně s 9 ml methanolu převedeno do vialky. Vzorky byly potom extrahovány v ultrazvuku při pokojové teplotě 30 minut. Vzniklá směs byla zfiltrována přes papírový filtr a filtráty byly zkoncentrovány dusíkem do sucha. Takto zkoncentrované vzorky byly následně rozpuštěny v 1 ml methanolu a zfiltrovány přes 0,45 µm (PTFE) membránový filtr a potom přes 0,2 µm nylonový filtr.

3.3.1.3 Plody *S. chinensis* – extrakce dle Soxhleta

2,5023 g nedrcených sušených plodů bylo naváženo na analytických vahách s přesností ± 0,0001 a přesypáno do extrakční patry z čisté celulózy (d = 3 cm, l = 10 cm). Celulózová extrakční patra byla spolu se vzorkem vložena do Soxhletova extraktoru a za použití celkově 180 ml rozpouštědla - methanolu a sušené nedrcené plody byly extrahovány za stálého

mírného varu rozpouštědla po dobu 5 hodin. Vzniklý extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír, zkoncentrován dusíkem do sucha a opět rozpuštěn v 1 ml methanolu. Dále byl extrakt filtrován přes 0,45 µm (PTFE) membránový filtr a potom přes 0,2 µm nylonový filtr.

2,5249 g nedrcených usušených plodů původem z Číny bylo naváženo na analytických vahách a dále bylo postupováno podle předešlého postupu – lyofilizované CZ plody. Přehled jednotlivých navážek ku vzorkům a způsobu extrakce je uvedeno v Tabulka 3.

Všechny vzorky byly před samotnou analýzou zředěny do 1,8 ml vialky 10krát (100 µl extraktu + 900 µl MilliQ vody)

Roztok standardu byl připraven v methanolu o koncentraci 1 mg/ml. Následně byl zásobní roztok rozředěn na koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,001 mg/ml. Objem každé koncentrace byl 1 ml.

Tabulka 3: Hmotnost navážky v jednotlivých reálných vzorcích

vzorek	metoda extrakce	vzorek	navážka [g]
1	soxhlet	CZ	2,5249
2		CH	2,4986
3	ultrazvuk	CZ	0,1248
4		CZ	0,1265
5		CZ	0,1257
6		CH	0,1250
7		CH	0,1263
8		CH	0,1252
9		kozáková	0,1250

3.3.2 Stanovení chlorofylu na UV-VIS spektrofotometru

Míra fotosyntetické aktivity je podmíněna množstvím fotosynteticky aktivních pigmentů. Jednou z metod jejich kvantifikace je spektrofotometrické měření absorbance vlnových délek ve směsi pigmentů vyextrahovaných z asimilačních orgánů. Metoda je použitelná pro směsi pigmentů, které se spektrálně výrazně liší, tzn. nelze určit obsahy jednotlivých složek ve směsi chlorofylů nebo obsahy jednotlivých karotenoidů v jejich směsi (Lichtenthaler 1987). Tuto metodu lze použít jen pro stanovení celkového obsahu chlorofylu-*a* (Chl_a) i chlorofylu-*b* (Chl_b).

Obsah odměrné baňky byl převeden do kyvety o optické délce 1 cm a proměřen na spektrofotometru Specord 50 PLUS v intervalu vlnových délek od 400 nm do 800 nm proti referenci 80% acetonu. Hodnoty absorbance při nastavených vlnových délkách 647 nm, 663 nm a 750 nm byly dosazeny do rovnic pro výpočet koncentrace chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b*.

Rovnice pro výpočet obsahu pigmentů (Lichtenthaler 1987) byly upraveny podle Makeena et al. (2007) o odečet absorbance při 750 nm, kde již chlorofyly neabsorbují a hodnota absorbance je způsobena rozptylem nečistot v extraktu. Koncentrace chlorofylu-*a*, chlorofylu-*b* a součtu celkového chlorofylu byla vyjádřena na základě výpočtu podle rovnice(1). Dále byla použita rovnice (2) bez odečtu absorbance, pro srovnání výsledků.

Rovnice 1: Výpočet koncentrace chlorofylu v 80% acetonu [67]

$$\begin{aligned}
 Chl_a(\mu g/ml) &= 12,25 \cdot (A_{663} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{647} - A_{750}) \\
 Chl_b(\mu g/ml) &= 21,50 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 5,10 \cdot (A_{663} - A_{750}) \\
 Chl_{a+b}(\mu g/ml) &= 7,15 \cdot (A_{663} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{647} - A_{750})
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Rovnice 2: Výpočet koncentrace chlorofylu [68]

$$\begin{aligned} Chl_a(\mu\text{g/ml}) &= 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \\ Chl_a(\mu\text{g/ml}) &= 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \end{aligned} \quad (2)$$

Výsledek je udáván v mikrogramech na 1 mililitr extraktu. Poté byly výsledky přepočteny na celé množství extraktu a následně uvedeny jako množství pigmentů v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty.

3.3.3 Podmínky pro identifikaci chlorofylu na UV-VIS spektrofotometru

Chlorofyl-*a*, chlorofyl-*b* a celkový chlorofyl byl ve vzorcích listů stanoven na jednopaprskovém UV-VIS spektrofotometru Specord 50 PLUS za podmínek uvedených v Tabulka 4.

Tabulka 4: Podmínky UV-VIS spektrofotometru

range [nm]	600-800
delta lambda	1,0
speed	10,0
integration time	0,1
cycle mode	none
display	absorbance
correction	reference

3.3.4 Podmínky pro identifikaci schisandrinu A na HPLC

Schisandrin byl ve vzorcích plodů stanoven na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series (Agilent, USA) za podmínek uvedených v Tabulka 5.

Tabulka 5: Parametry stanovení schisandrinu A na HPLC

Kolona	Kinetex® 2.6 μm C18 100Å, LC Column 150 x 2.1 mm
Průtok mobilní fáze	0,16 ml/min
Objem nástřiku	2 μl
Teplota kolony	35 °C
Složení mobilní fáze	Složka B – voda (MilliQ) Složka C - MeOH
Gradient	0 – 5 min 70 % C 5 – 10 min 70 % C 10 – 22 min 100 % C 22 – 25 min 100 % C 25 – 27 min 70 % C
UV spektra	190 – 400 nm
Vlnová délka	225, 254, 260 nm
Post time	8 minut
Celková doba analýzy	27 minut

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci diplomové práce byl analyzován jeden vzorek čerstvých listů a dva vzorky sušených plodů *Schisandra chinensis*. Jeden vzorek pochází z roku 2018 z rostliny původem z Ruska, ale pěstována je v České republice v Jihomoravském kraji, konkrétně na zahradě Ing. Josefa Kotlíka, CSc., další plody jsou ze sběru také v roce 2018, ale původem z Číny, přesněji z oblasti Dongbei.

Zjištěné hodnoty absorbance extraktů z listů při nastavené vlnové délce byly použity pro výpočet koncentrace chlorofylu-a, chlorofylu-b.

Identifikace schisandrinu A proběhla pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1100 Series, kdy bylo analyzováno celkem 9 reálných extraktů. Z toho 2 vzorky byly extrakty ze Soxhletovy extrakce (1x CZ, 1x CH), dalších 6 vzorků plodů bylo extrahováno pomocí ultrazvuku (3x CZ, 3x CH) a poslední vzorek z roku 2013 z diplomové práce Ing. Soni Kozákové byl použit ke srovnání obsahu schisandrinu A.

4.1 Identifikace chlorofylu

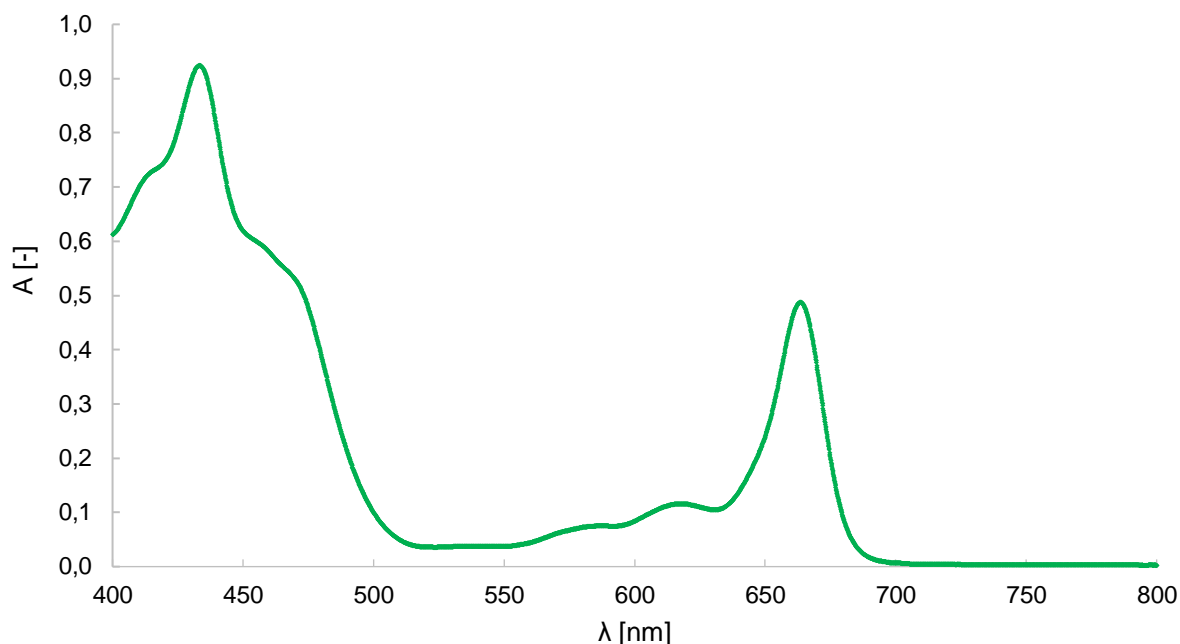
Připravená navážka čerstvých listů byla zpracována v třecí misce a poté převedena do odměrné baňky. Po extrakci 80% acetonem byl extrakt po zfiltrování přes filtrační papír spektrofotometricky proměřen.

Pro analýzu chlorofylu v mnou měřeném reálném vzorku bylo nejdříve proměřeno referenční extrakční činidlo, tj. 80% aceton jako slepý vzorek, poté vzorek listů. Hodnoty absorbance při vlnových délkách 647 nm, 663 nm a 750 nm uvádí Tabulka 6.

Obrázek 10 zobrazuje absorpční spektrum (závislost absorbance na vlnové délce) mého vzorku.

Tabulka 6: Hodnoty absorbance při vybraných vlnových délkách

λ [nm]	A [-]
A_{647}	0,2034
A_{663}	0,4868
A_{750}	0,0038



Obrázek 10: Absorpční spektrum reálného vzorku listů *Schisandra chinensis*

Analýza fotosynteticky aktivního pigmentu ve vzorku z dubnového odběru dospěla k měřitelným koncentracím chlorofylu-*a* i chlorofylu-*b* (Chl_a, Chl_b). Dosazením naměřených absorpcí do výše uvedených rovnic pro výpočet koncentrace pigmentu bylo zjištěno jejich množství.

Obsah chlorofylu-*a* se podle prvního výpočtu pohybuje mírně pod hodnotou 1100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, obsah chlorofylu *b* pak lehce přes 350 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Poměr celkového množství chlorofylů (Chl_a/Chl_b) skoro dosáhl hodnoty 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a u druhého způsobu výpočtu tento poměr dosáhl hodnoty pouze o něco menší, tj. 2,98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Všechny mnou zpracované hodnoty fotosynteticky aktivních pigmentů jsou uvedeny a přepočteny v tabululkách: Tabulka 7 - Tabulka 9.

Tabulka 7: Obsahy fotosyntetických pigmentů (v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ extraktu) v listech Schizandry chinensis a poměry fotosyntetických pigmentů.

30.4.2019		$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$		
Vzorek	Chl _a	Chl _b	Chl _{a+b}	Chl _a /Chl _b
1	5,42	1,82	7,24	2,97
2	5,69	1,90	7,59	2,99

Tabulka 8: Obsahy fotosyntetických pigmentů (v μg na celé množství extraktu – 10 ml) v listech Schizandry chinensis a poměry fotosyntetických pigmentů.

30.4.2019		μg na 10ml (celý extrakt)		
Vzorek	Chl _a	Chl _b	Chl _{a+b}	Chl _a /Chl _b
1	54,20	18,20	72,40	2,98
2	56,90	19,00	75,90	2,99

Tabulka 9: Obsahy fotosyntetických pigmentů (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvých plodů) v listech Schizandry chinensis a poměry fotosyntetických pigmentů.

30.4.2019		$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
Vzorek	Chl _a	Chl _b	Chl _{a+b}	Chl _a /Chl _b
1	1081,83	363,27	1445,10	2,98
2	1135,72	379,24	1514,96	2,99

Postup přepočtu znázorněný na vzorku 1 chlorofylu-*a*:

$$\begin{array}{l}
 5,42 \mu\text{g} \dots\dots\dots 1 \text{ ml} \\
 \underline{x \mu\text{g} \dots\dots\dots 10 \text{ ml}} \\
 x = \frac{10 \times 5,42}{1} = 54,2 \mu\text{g na } 10 \text{ ml}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 10 \text{ ml} \dots\dots 0,0501 \text{ g} \\
 \underline{x \text{ ml} \dots\dots\dots 1 \text{ g}} \\
 x = \frac{1 \times 10}{0,0501} = 199,6 \text{ ml}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 54,2 \mu\text{g} \dots\dots\dots 10 \text{ ml} \\
 \underline{x \mu\text{g} \dots\dots\dots 199,6 \text{ ml}} \\
 x = \frac{199,6 \times 54,2}{10} = 1081,8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}
 \end{array}$$

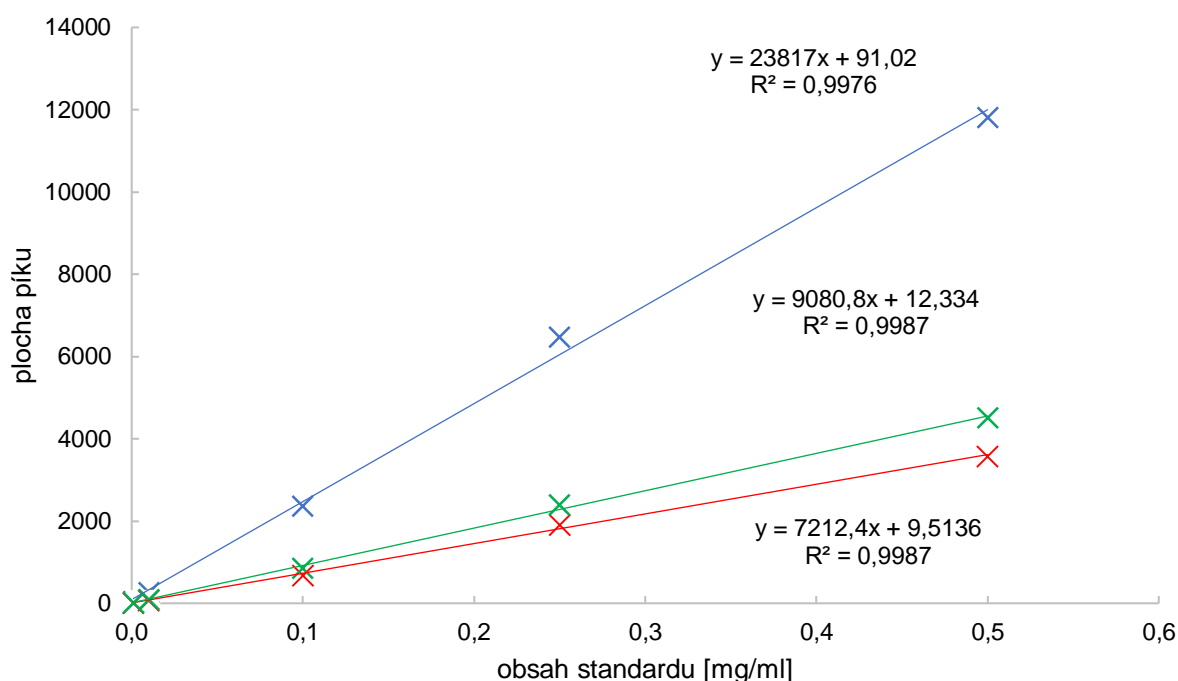
Mnou naměřené poměry chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b* (Chl_a/Chl_b) z těchto dubnových odběrů se pohybují v hodnotách těsně pod 3 a odpovídají v literatuře uváděnému poměru 3:1 až 4:1 u rostlin rostoucích za optimálních podmínek (Ryplová, 2014). Jak ukazují Sarijeva et al. (2007), poměr Chl_a/Chl_b nejen u Schizandry významně závisí na světelné pohodě a množství dopadajícího světla. U zastíněných a světelně stresovaných listů může tato hodnota spadnout pod spodní hranici výše uvedeného rozmezí (autoři uvádí hodnotu 2,68), tudíž byly potvrzeny ideální podmínky pro rostlinu pěstovanou v České republice v dubnu roku 2019.

4.2 Identifikace shisandrinu A na HPLC

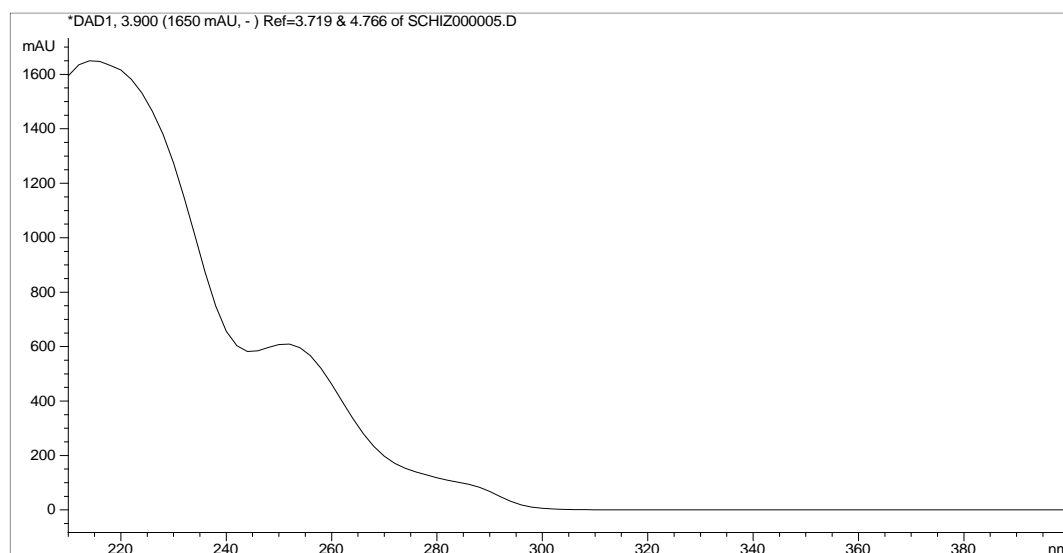
Schisandrin A byl identifikován na chromatografu Agilent 1100 Series (Agilent USA). Po provedení analýzy a proměření standardu za podmínek uvedených v Tabulka 5 byl zjištěn obsah adaptogenu ve všech reálných vzorcích.

Proměření standardu i vzorků proběhlo ve třech vlnových délkách 225, 254 a 260 nm. Tyto vlnové délky byly určeny na základě výsledků z diplomové práce Ing. Soni Kozákové z roku 2013, kdy bylo měřeno spektrum pouze ve vlnové délce 254 nm za předpokládaného maxima. Při zhodnocení výsledného absorpčního spektra byla určena jiní dvě maxima, a to 225 a 260 nm, tudíž byly mé vzorky proměřeny ve všech délkách.

Nejprve byla proměřena kalibrační závislost (Obrázek 11) a absorpční (UV) spektrum (Obrázek 12), ze kterého byla vybrána vlnová délka 225 nm z důvodu nejvyššího maxima. Právě kvůli tomu byly následné analýzy vyhodnocovány pouze při $\lambda=225$ nm.



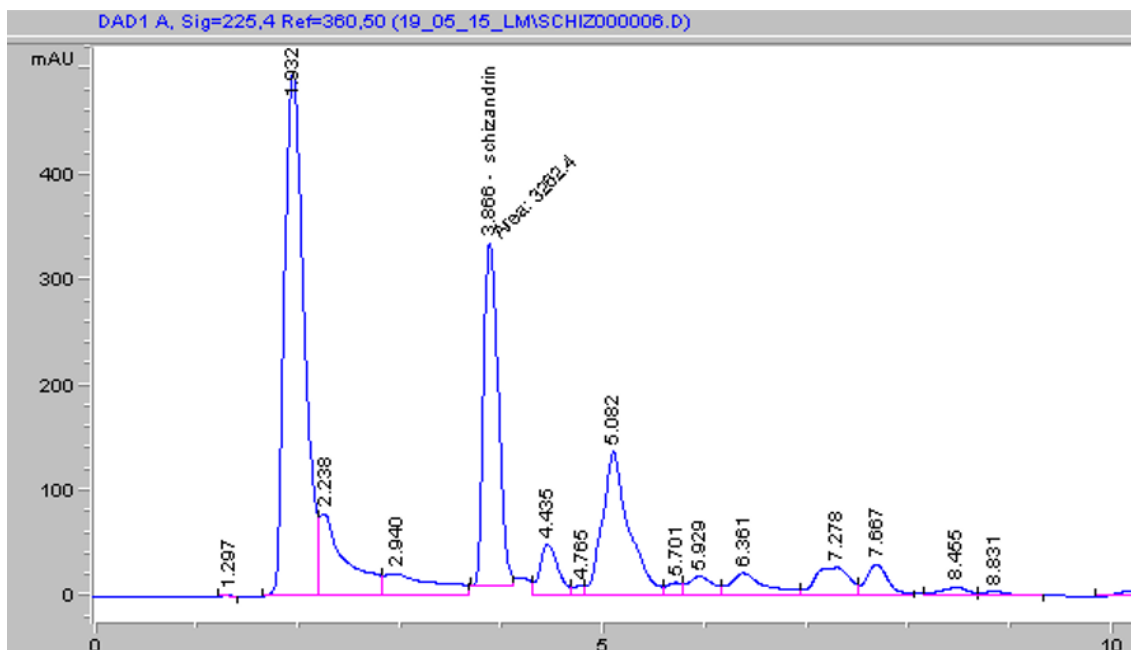
Obrázek 11: Kalibrační závislost standardu schisandrinu A při vybraných vlnových délkách



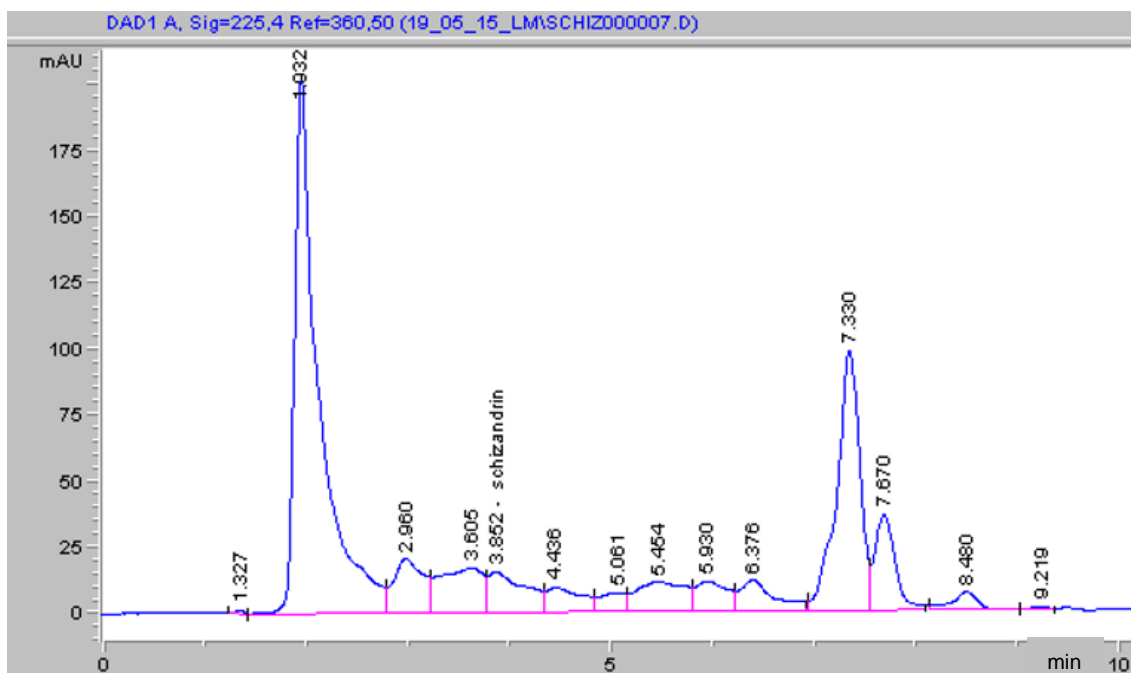
Obrázek 12: Absorpční UV spektrum standardu schisandrinu A

Při porovnání chromatogramů obou extraktů ze Soxhletovy extrakce bylo zjištěno, že při zředěných extraktech plodů CH je výsledek nulový. Proto bylo provedeno další měření s neředěným vzorkem, kde byl zjištěn obsah schisandrinu 0,0455 mg/ml. Oproti tomu v 10× zředěném vzorku CZ plodů byl stanoven obsah skoro trojnásobný 1,4473 mg/ml. Pro identifikaci adaptogenu bylo použito absorpční spektrum všech třech měřených vzorků (viz přílohy: Absorpční spektra vzorků 1 – 9). Oba vzorky pochází ze sklizně roku 2018.

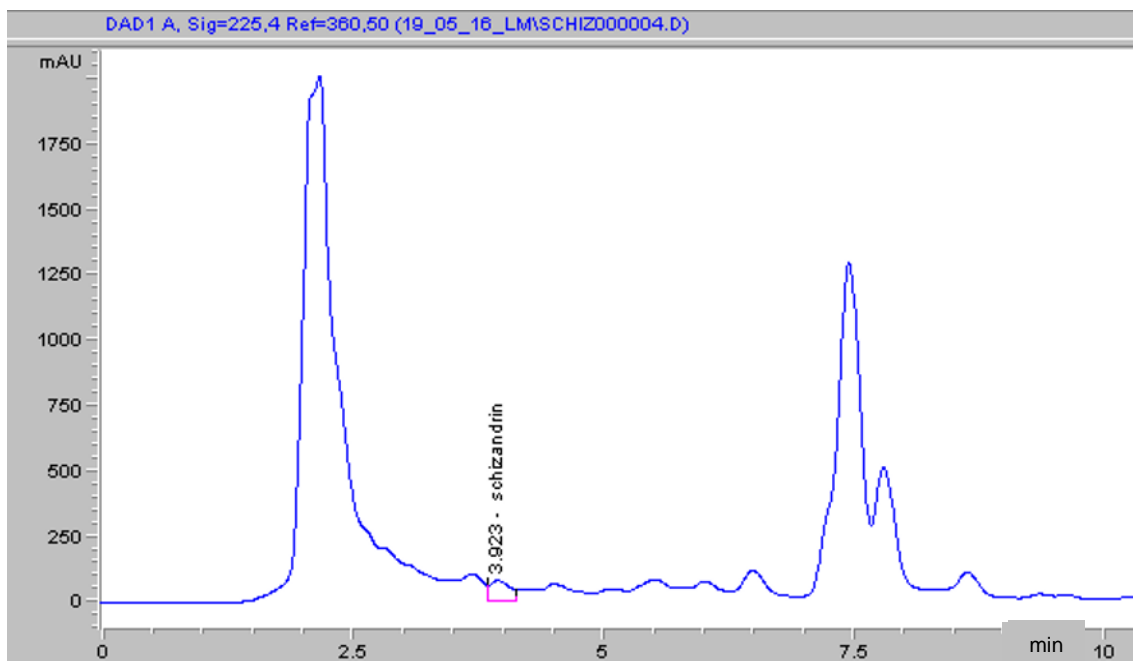
V tomto případě hraje velkou roli podnebí, kdy se klimatické podmínky obou rostlin od sebe výrazně liší, avšak splňují dostatečnou potřebu růstu rostliny.



Obrázek 13: Chromatogram vzorku Sox CZ

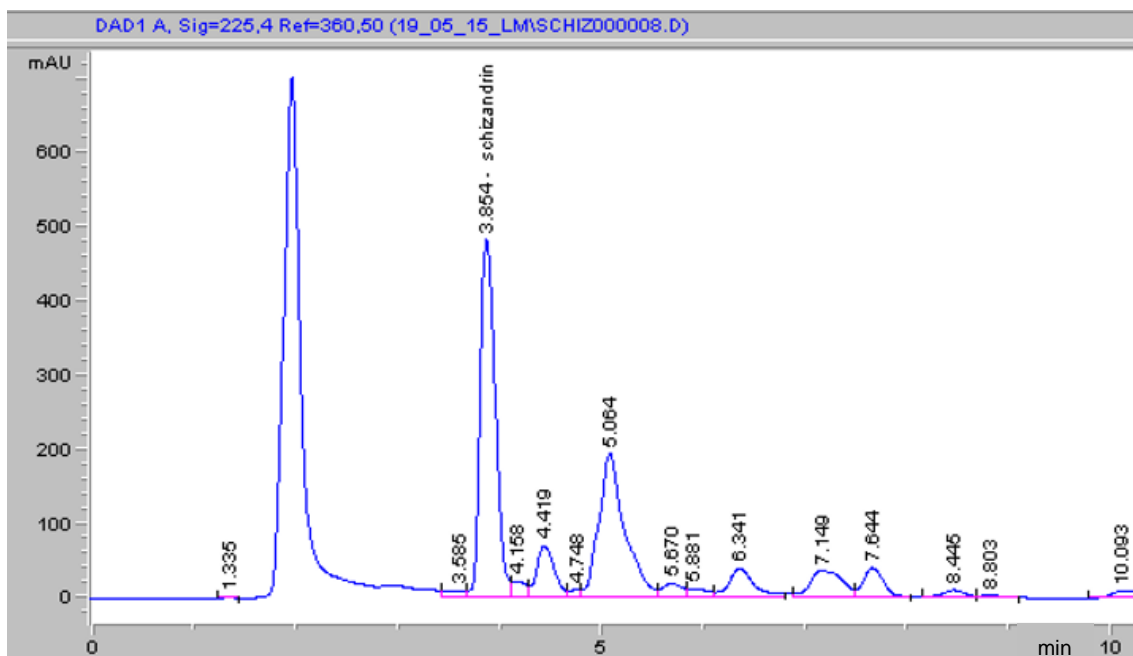


Obrázek 14: Chromatogram vzorku 1 - Sox CH řaděné

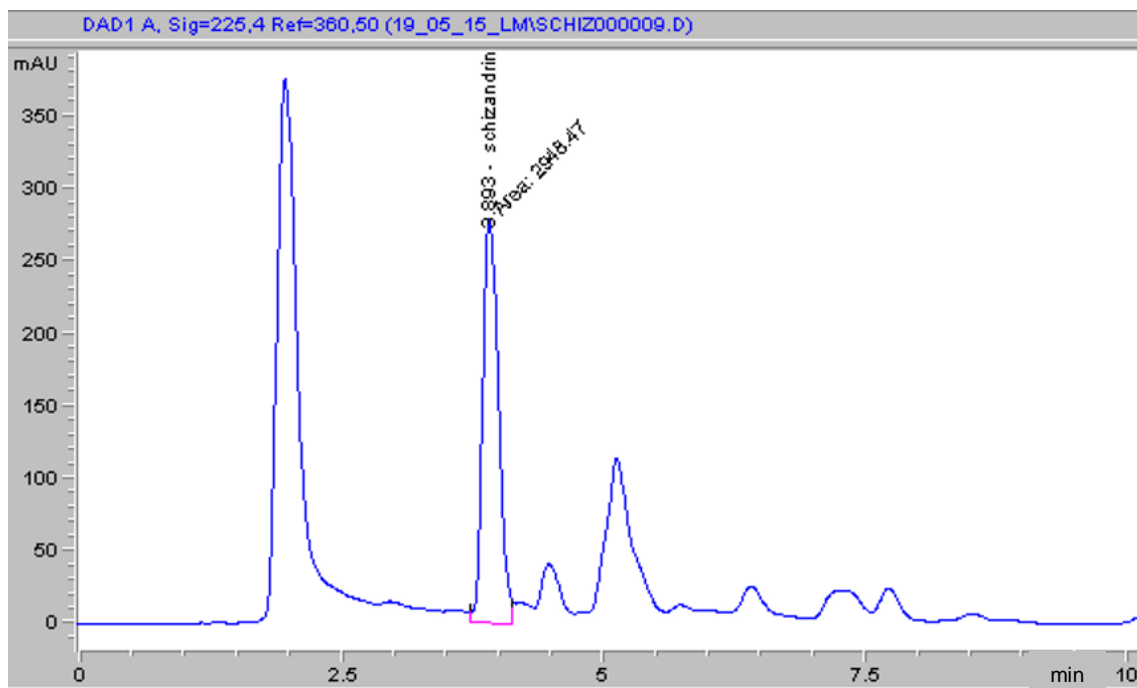


Obrázek 15: Chromatogram vzorku 2 – Sox CH neředěné

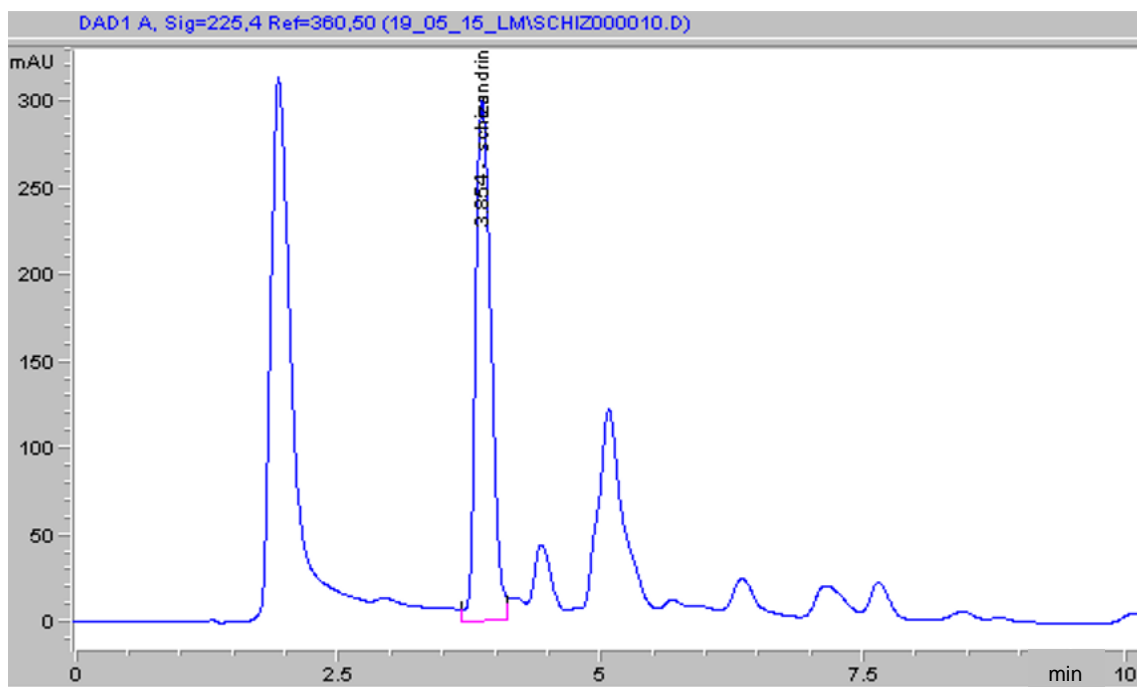
Chromatogramy vzorků podrobených ultrazvukové extrakci jsou zobrazeny na obrázcích: Obrázek 16 až Obrázek 22. Nejprve jsou uvedeny vzorky pocházející z České republiky (CZ), které jsou navíc oproti vzorkům z Číny 10krát zředěny, u kterých je pík schizandrinu dobře rozeznatelný. Oproti tomu vzorky pocházející z Číny neobsahují až takové množství adaptogenu, jak by se dalo předpokládat.



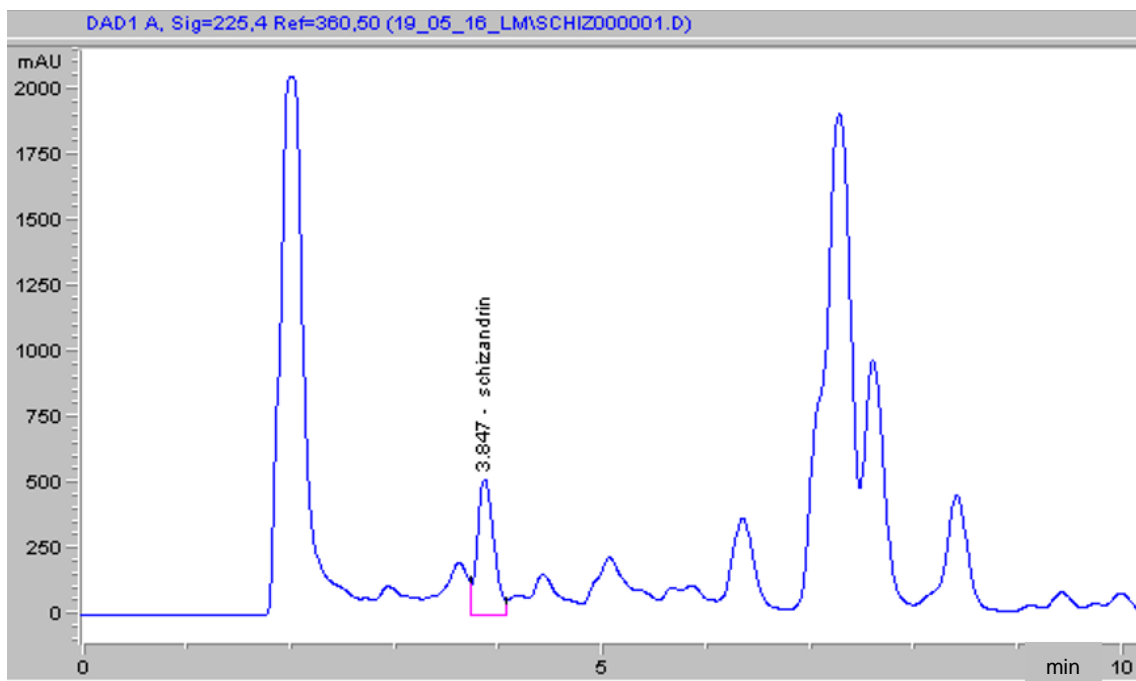
Obrázek 16: Chromatogram vzorku 3 – ultrazvuk CZ 1



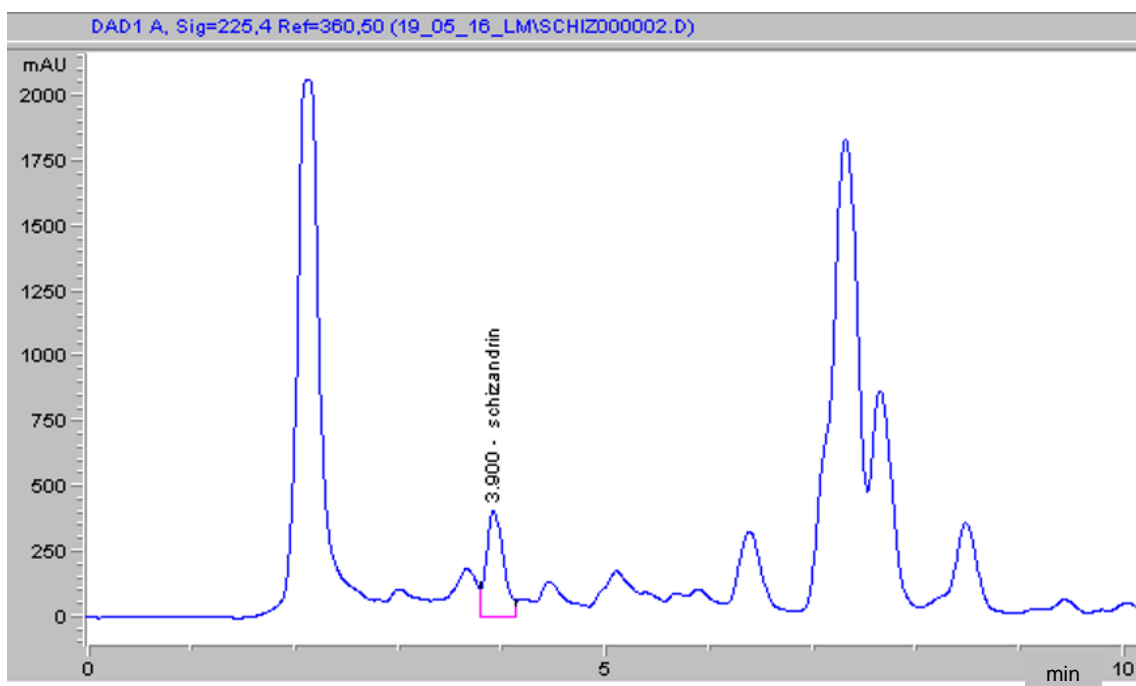
Obrázek 17: Chromatogram vzorku 4 – ultrazvuk CZ 2



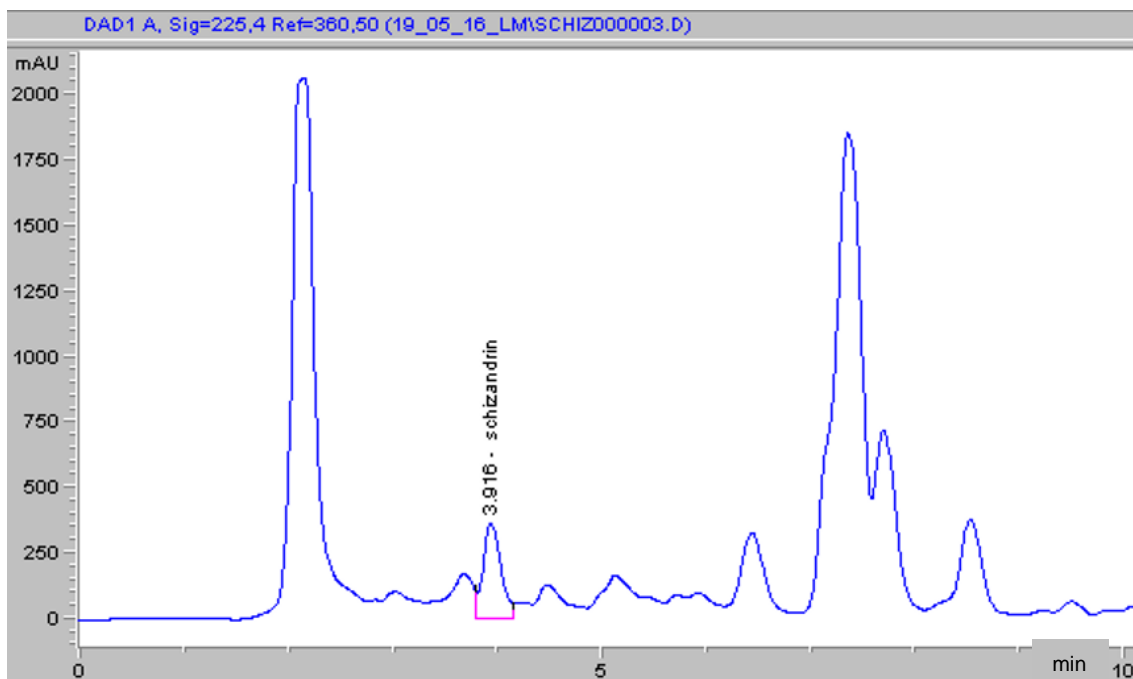
Obrázek 18: Chromatogram vzorku 5 – ultrazvuk CZ 3



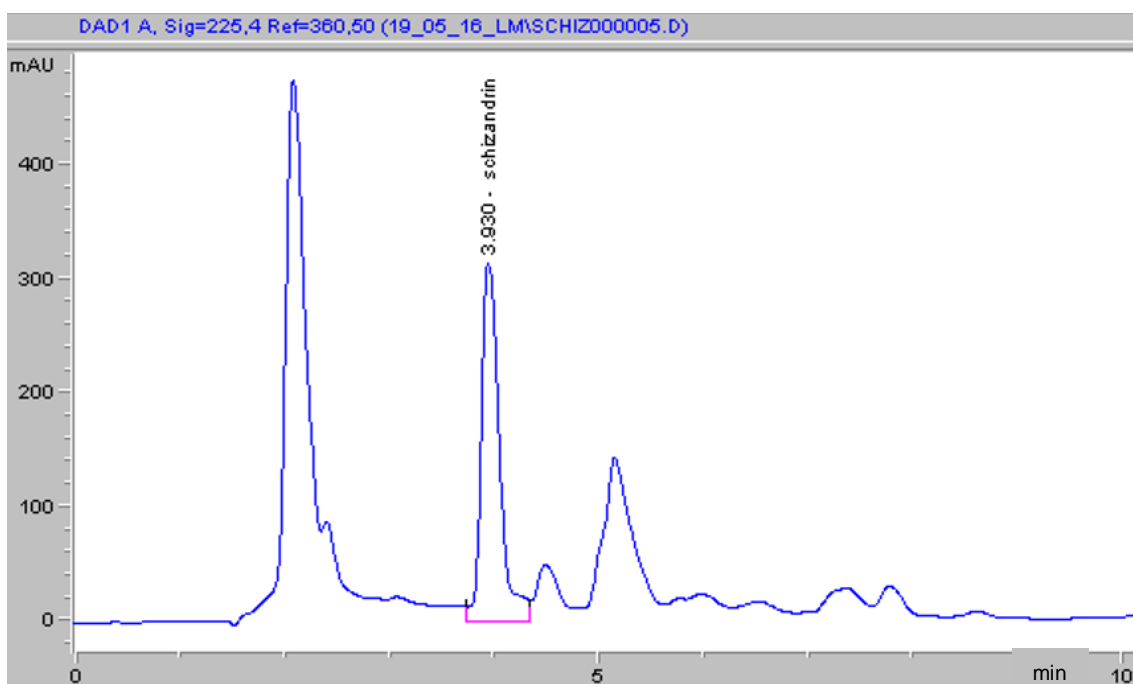
Obrázek 19: Chromatogram vzorku 6 – ultrazvuk CH 1



Obrázek 20: Chromatogram vzorku 7 – ultrazvuk CH 2



Obrázek 21: Chromatogram vzorku 8 – ultrazvuk CH 3



Obrázek 22: Chromatogram vzorku 9 – ultrazvuk Kozáková

V tabulce Tabulka 10 jsou uvedeny výsledky obsahu schizandrinu A ve všech proměřených vzorcích. Při porovnání těchto výsledků je zřejmé, že větší obsah lignanů obsahují plody z České republiky i přes to, že e-shop Salvia paradise popisuje tyto plody Klanoprašky z oblasti Dongbei následovně: „Schizandra čínská neboli klanopraška pochází ze severočínské oblasti Dongbei, která je známá chladným podnebím. Nepříznivé podmínky sice způsobují pomalejší vývoj plodů, avšak větší kumulaci účinných látek. Plody původem z Dongbei jsou drobné, ale velmi účinné“. Bohužel již při dodání zboží převládala tmavá až černá barva plodů, což značí nižší kvalitu a ve většině případů i nízký obsah účinných látek, jak se také při měření potvrdilo. Přesnou dobou sběru za optimálního stavu počasí a šetným

sušením se získává sytě tmavá rubínová barva, která je ukazatelem vyšší kvality plodu a s ní i spojené vyšší množství účinných látek. S tím souvisí i má Soxhletova extrakce, kdy bylo vidět, že z CZ plodů se vyextrahovalo skoro všechno barvivo již po 5 hodinách, kdežto u plodů z Číny nebyl vidět po stejné době extrakce skoro žádný rozdíl v barvě ani ve změně objemu, což může být způsobeno právě nesprávným sušením či přesušením. V takových případech by byla účinnější delší extrakce více než 10 hodin, dále vyšší teplota rozpouštědla nebo také extrakce za vyššího tlaku. Lepšímu vyextrahování látek by také pomohlo rozdrcení sušených plodů na jemný prášek.

Takovéto rozdíly v obsahu lignanu mohou mít několik důvodů. Jako první je potřeba dbát na vitalitu rostliny, tzn. na její klimatické, podnební a pěstební podmínky, jak se jí na daném místě daří, zda kvete a plodí každý rok, jestli jsou listy zdravé, zelené, neusychají atd. Také stáří rostliny udává kvalitu plodů. Jak již bylo zmíněno v experimentální části, velký vliv hraje nejnižší teplota, kterou rostlina může snést, avšak nízká teplota není jediný faktor ovlivňující přežití rostlin. Stejně důležitá je i vysoká letní teplota, srážky, půdní reakce, půdní teplota. Mnohé rostliny, aby kvetly, a tedy mohly vytvořit semena a na daném území tak dlouhodobě přežívat, potřebují určitý poměr dne a noci.

Po sběru plodů je také rozdílný obsah adaptogenů dán odlišným způsobem a podmínkami sušení. Všechny tyto jednotlivé informace bohužel není možno u plodů z Číny zjistit a porovnat je s plody vypěstovanými v České republice.

Po vyhodnocení výsledků nelze zcela jasně říci, která extrakce je výhodnější pro izolaci adaptogenu schisandrinu A. Obě extrakce mají podobnou účinnost extrakce daných lignanů z plodů, avšak mnohem více záleží na kvalitě plodů. Soxhletova extrakce je většinou používána k izolaci jedné nebo více složek přírodního materiálu nebo z technických produktů. Jedná se o opakovanou extrakci, kdy lze dosáhnout maximálního výtěžku. Její výhodou je v nízké pořizovací ceně extraktoru a extrakce za atmosférického tlaku. Také klade minimální nároky na obsluhu, proto může extrakce probíhat přes noc, až 48 hodin. Nicméně extrakce ultrazvukem se díky její rychlosti, množství potřebného materiálu a tím i finančnímu hledisku jeví výhodněji. Kdybychom chtěli porovnat tyto dvě extrakce, musela by se prodloužit doba extrahování materiálu až do úplného vyextrahování vzorků u obou extrakcí.

Tabulka 10: Shrnutí výsledků obsahu schisandrinu A v sušených plodech rostliny Schisandra chinensis

č.	metoda extrakce	10x zředěno	vzorek	retenční čas [min]	obsah schisandrinu [mg·ml ⁻¹] · 10 ⁻¹	obsah bez ředění [mg·ml ⁻¹]	obsah schisandrinu v 1 g plodů [mg·g ⁻¹] 10 ⁻¹
1	soxhlet	ANO	CZ	3,866	1,447	1,447	2,477
2		NE	CH	3,923	0,455	0,046	0,079
3		ANO	CZ	3,854	2,057	2,057	3,562
4		ANO	CZ	3,893	1,207	1,207	2,061
5		ANO	CZ	3,854	1,256	1,256	2,159
6	ultrazvuk	NE	CH	3,847	2,362	0,236	0,408
7		NE	CH	3,900	1,998	0,200	0,342
8		NE	CH	3,916	1,829	0,183	0,316
9		ANO	Kozáková	3,930	1,567	1,567	2,708

5 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byl proveden literární průzkum působení těchto adaptogenů na organismus a popsáno jedno z mnoha využití v potravinových doplňcích. Nejvhodnější regionální pěstební klimatické zóny spadají do oblastí 5, 6 a 7. Typ podnebí v České republice je obdobný podnebí v lokalitách přirozeného výskytu rostliny *Schisandra chinensis*. Zejména vhodné mohou být lokality s přistíněným spodním rostlinným patrem a dostatečným množstvím vláhy bez periodických přísušků. Tomuto charakteru nejlépe vyhovují polohy okrajů vodních ploch a toků.

Dále byla vytipována vhodná extrakční technika pro chlorofyl, a to extrakce 80% acetonem. Extrakt byl podroben spektrofotometrické analýze na přístroji Specord 50 PLUS při vybraných vlnových délkách (647 nm, 663 nm a 750 nm). Hodnoty byly odečteny k identifikování množství fotosynteticky aktivních pigmentů (Chl_a, Chl_b) a byly potvrzeny ideální podmínky pro rostlinu pěstovanou v České republice v dubnu roku 2019.

Pro vypracování experimentální části práce byly použity vzorky pocházející z Číny a vzorky plodů vypěstovaných v jihomoravském podnebním pásmu, ale rostlina je původem z Ruska. Z těchto plodů *Schisandra chinensis* z roku 2018 byly vyextrahovány vzorky, které byly následně proměřeny na HPLC. Z výsledků obsahu adaptogenu schisandrinu A není jednoznačné, která ze dvou testovaných extrakcí je neúčinnější, ale lze porovnat kvalitu plodů v rámci obsahu adaptogenu. Z výsledků je zřejmé, že plody z Číny obsahují až 6x méně lignanu schisandrinu A za stejných podmínek přípravy i extrakce, jako plody vypěstované v České republice.

Předmětem dalšího výzkumu by mohlo být měření obsahu chlorofylu a karotenoidů v jednotlivých částech rostliny v závislosti na čase a sledovat tak měnící se poměry pigmentů během roku. Dále porovnání účinných látek v plodech s odlišným původem, pro zjištění kvality plodů. Ohledně původu a kvality plodů bych navrhovala i klinické testy na skupině dobrovolníků, nejlépe sportovců a vyhodnocení účinnosti.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009, 161(2), 105-121. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x. ISSN 00244074. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/botlinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- [2] XIA, Nianhe a Richard SAUNDERS. *Flora of China: Schizandraceae* [online]. b.r. [cit. 2017-05-10].
- [3] XIA, Nianhe a Richard SAUNDERS. *Flora of China: Illiciaceae* [online]. b.r. [cit. 2017-05-10].
- [4] KALKMAN, C. *Flora Malesiana / being an illustrated systematic account of the Malesian flora .. 13*. The Hague [u.a.]: Nijhoff, 1997. ISBN 90-712-3633-1.
- [5] BAILLON, H a Marcus M HARTOG. *The natural history of plant*. London: L. Reeve & Co, 1871. DOI: 10.5962/bhl.title.41454.
- [6] PANOSSIAN, A a G WIKMAN. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail: An overview of Russian research and uses in medicine. *Journal od Ethnopharmacology* [online]. b.r., 2008(118), 183-212 [cit. 2017-05-10]. ISSN 0378-8741.
- [7] ŠAMLA, Jiří. *Subtropy - pěstitelské praktikum: Pěstitelské praktikum - B*. In: . Edice citrusář, 1994.
- [8] HANCKE, J. L., R. A. BURGOS a F. AHUMADA. Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. *Fitoterapia*. b.r., (5), 451-471. ISSN 0367-326x.
- [9] *Schizandra chinensis (Turcz.) Bail* [online]. b.r. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/lakr/_private/data/SCHISANDRA%20CHINENSIS.htm
- [10] PENG, J., G. FAN a L. QU. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisin A from Schisandra chinensis. *Journal of Chromatography A*. b.r., 2005(1082), 203-207.
- [11] LU, Yan a Dao-Feng CHEN. Analysis of Schisandra chinensis and Schisandra sphenanthera. *Journal of chromatography. A* [online]. Amsterdam; New York: Elsevier, 2009, 1216(11), 1980-1990 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.09.070. ISSN 00219673.
- [12] LEE, You Jin, Sun Young PARK, Sun Gun KIM et al. Identification of a novel compound that inhibits iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages from Schisandra chinensis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. Elsevier Inc, 2010, 391(4), 1687-1692 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.131. ISSN 0006291X.

- [13] CHEN, Yong, Jinbao TANG, Xiaoke WANG, Fengxiang SUN a Shujuan LIANG. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2012, 50(3), 844-848 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.015. ISSN 01418130.
- [14] [online]. In: . b.r. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: dostupné z <http://travoved.org/schizandra-chinensis-baill.php>
- [15] WALTER, Vilém. *Rozmnožování okrasných stromů a keřů*. Vyd. 2. Praha: Brázda, 1997. ISBN 80-209-0268-6.
- [16] *Vlhké kontinentální podnebí* [online]. b.r. [cit. 2019-05-14].
- [17] World map od Köppen-Geiger climate classification. In: *Wikipedia* [online]. b.r.
- [18] Mapa kontinentálního podnebí. In: *Wikipedia* [online]. b.r. [cit. 2019-03-13].
- [19] *Köppenova klasifikace podnebí* [online]. b.r. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/K%C3%B6ppenova_klasifikace_podnebí
- [20] *Klimatické zóny* [online]. b.r. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: <http://www.bretham.eu/shop/planting-instructions/klimaticke-zony.html>
- [21] *Klimatické zóny 1* [online]. b.r. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: http://dendroz.dendrologie.cz/html_stranky/08_klimaticke_zony.htm
- [22] KRESÁNEK, Jaroslav. *Atlas léčivých rostlin a lesných plodov*. 3. vyd. Martin: Osveta, 1988.
- [23] PROTIVA, Miroslav. *Pokroky ve farmacii*. Vyd. 1. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1980. Pokroky ve farmacii.
- [24] SAUNDERS, Richard M.K. *Monograph of Kadsura (Schisandraceae)*. Ann Arbor, Mich: American Society of Plant Taxonomists, Systematic Botany Monographs, 1998. ISBN 09-128-6154-1.
- [25] D.C. AYRES AND J.D. LOIKE., . *Lignans: chemical, biological and clinical properties*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. ISBN 05-210-6543-7.
- [26] DENG, Xinxiu, Xiaohui CHEN, Weiming CHENG, Zhenduo SHEN a Kaishun BI. Simultaneous LC–MS Quantification of 15 Lignans in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fruit. *Chromatographia* [online]. Wiesbaden: Vieweg Verlag, 2008, 67(7), 559-566 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1365/s10337-008-0589-3. ISSN 00095893.
- [27] JABLONSKÝ, Ivan a Jiří BAJER. *Rostliny pro posílení organismu a zdraví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 80-247-1745-X.
- [28] HUANG, Sheng-Xiong, Quan-Bin HAN, Chun LEI et al. Isolation and characterization of miscellaneous terpenoids of *Schisandra chinensis*. *Tetrahedron* [online]. Elsevier Ltd, 2008, 64(19), 4260-4267 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.tet.2008.02.085. ISSN 0040-4020.

- [29] KUO, Reen-Yen, Keduo QIAN, Susan L. MORRIS-NATSCHKE a Kuo-Hsiung LEE. Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Natural Product Reports*. 2009, 26(10), 1321-. DOI: 10.1039/b810774m. ISSN 0265-0568. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b810774m>
- [30] *Adaptogeny: Známé a neznámé a d a p t o g e n y* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: http://www.darius.cz/archeus/LU_adapto.html
- [31] *Adaptogeny* [online]. b.r. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <https://adaptogeny.cz/>
- [32] WINSTON, David a Steven MAIMES. *Adaptogens: herbs for strength, stamina, and stress relief*. Rochester, Vt.: Healing Arts Press, 2007. ISBN 15-947-7158-8.
- [33] *Adaptogen W* [online]. b.r. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Adaptogen>
- [34] MACRAE, W.Donald a G.H.Neil TOWERS. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 1984, 23(6), 1207-1220. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80428-8. ISSN 0031-9422. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200804288>
- [35] SLANINA, Jiří, Eva TÁBORSKÁ a Lea LOJKOVÁ. Lignans in the seeds and fruits of *Schisandra chinensis* cultured in Europe. *Planta Medica*. Stuttgart - New York: Thieme Medical Publishers, 1997, 63(3), 277-280. ISSN 0032-0943.
- [36] ZHU, Min, Yan CAO a Guorong FAN. Microwave-assisted extraction and fingerprint studies of *Schisandra chinensis* (Turcz.) by high performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2007, 30(1), 67-73 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1002/jssc.200600261. ISSN 16159306.
- [37] SLANINA, Jiří. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2000, 1994(2), 111-116. ISSN 0009-2770.
- [38] HARMATHA, Juraj. *Chemie a biochemie přírodních látek, : Cyklus Organická chemie, FENYLPROPANOIDY, LIGNANY A JEJICH BIOLOGICKÉ ÚČINKY*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, 2002, s. 117 -142. Organická chemie. ISBN 80-86241-17-3.
- [39] AYRES, D.C. a J.D. LOIKE. *Lignans: chemical, biological and clinical properties*. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. ISBN 978-052-1065-436.
- [40] OPLETAL, Lubomír, Helena SOVOVÁ a Milena BÁRTLOVÁ. Dibenzo[a, c]cyclooctadiene lignans of the genus *Schisandra*: importance, isolation and determination. *Journal of Chromatography B* [online]. Elsevier B.V, 2004, 812(1), 357-371 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.07.040. ISSN 15700232.
- [41] WILLIAMSON, Elizabeth M., Samuel. DRIVER a Karen. BAXTER. *Stockley's herbal medicines interactions: a guide to the interactions of herbal medicines, dietary supplements and nutraceuticals with conventional medicines*. Chicago: Pharmaceutical Press, 2009. ISBN 978-0-85369-760-2.

- [42] SAKURAI, Heigo, Tamotsu NIKAIDO, Taichi OHMOTO, Yukinobu IKEYA a Hiroshi MITSUHASHI. Inhibitors of cAMP Phosphodiesterase in Medicinal Plants. Part XVIII. Inhibitors of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase from Schisandra chinensis and the Structure Activity Relationship of Lignans. *CHEMICAL*. 1992, 40(5), 1191-1195. DOI: 10.1248/cpb.40.1191. ISSN 0009-2363. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/40.1191?from=CrossRef>
- [43] SCHWARZINGER, Clemens a Hermann KRANAWETTER. Analysis of the Active Compounds in Different Parts of the Schisandra chinensis Plant by Means of Pyrolysis-GC/MS. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* [online]. Vienna: Springer-Verlag, 2004, 135(9), 1201-1208 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1007/s00706-004-0176-8. ISSN 00269247.
- [44] DEMMING-ADAMS, B, A. M GILMORE a III. W. W. ADAMS. In vivo function of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* [online]. 1996, (10), 403-412 [cit. 2017-05-11].
- [45] GARRETT, R. a Charles M. GRISHAM. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Centrage Learning, 2013. ISBN 978-1-133-10629-6.
- [46] CAMPBELL, Mary K. a Shawn O. FARRELL. *Biochemistry*. 8th ed. Stamford: Cengage Learning, 2015. ISBN 978-1-285-42910-6.
- [47] CHEN, M., M. SCHLIEP, R. D. WILLOWS, Z.-L. CAI, B. A. NEILAN a H. SCHEER. A Red-Shifted Chlorophyll. *Science*. 2010, 329(5997), 1318-1319. DOI: 10.1126/science.1191127. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1191127>
- [48] ČSN ISO 10260 (75 7575). *Jakost vod: Měření biochemických ukazatelů - Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a*. Český normalizační institut, 1996.
- [49] *Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků* [online]. b.r. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-lecivych-pripravku>
- [50] BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1405189767.
- [51] TAKEMOTO, Daigo, Adrienne HARDHAM a David JONES. Differences in Cell Death Induction by Phytophthora Elicitins Are Determined by Signal Components Downstream of MAP Kinase Kinase in Different Species of Nicotiana and Cultivars of Brassica rapa and Raphanus sativus[w]. *Plant Physiology* [online]. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2005, 138(3), 1491-504 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1104/pp.104.058388. ISSN 00320889.
- [52] LOU, Ziyang, Hai ZHANG, Chungui GONG, Zhenyu ZHU, Liang ZHAO, Yuanjie XU, Bin WANG a Guoqing ZHANG. Analysis of lignans in Schisandra chinensis and rat plasma by high-performance liquid chromatography diode-array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2009, 23(6), 831-842 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1002/rcm.3931. ISSN 09514198.

- [53] KOTLÍKOVÁ, Silvie. *Technologie extrakce účinných látek rostlin Schisandta chinensis a Hovenia Dulcis: Pojednání k disertační práci*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2015.
- [54] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [55] SHI, Peiyong, Qing HE, Yufeng ZHANG, Haibin QU a Yiyu CHENG. Characterisation and identification of isomeric dibenzocyclooctadiene lignans from Schisandra Chinensis by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Phytochemical analysis: PCA* [online]. 2009, 20(3), 197 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1002/pca.1115.
- [56] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody: učebnice základů instrumentálních analytických metod*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [57] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902-8961-4.
- [58] HRAZDIRA, Ivo, Vojtěch MORNSTEIN a Jiří LECHNER. *Biofyzikální principy lékařské přístrojové techniky*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1999. ISBN 80-210-2213-2.
- [59] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [60] SANDER, Lane C. Soxhlet Extractions. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*. 2017, 122, -. DOI: 10.6028/jres.122.004. ISSN 2165-7254. Dostupné také z: <http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/jres/122/jres.122.004.pdf>
- [61] DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [62] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. Praha: SPN, 1986.
- [63] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [64] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [65] JOKL, Vladimír, Drahomíra SVOBODOVÁ a Rudolf KARLÍČEK. *Analytická chemie pro farmaceuty II*. Praha: SPN, 1981.
- [66] DASS, Chhabil. *Principles and practice of biological mass spectrometry*. New York: John Wiley, 2001. ISBN 04-713-3053-1.

- [67] ŠPULÁK, Ondřej a Jan VÍTÁMVÁS. Fluorescence chlorofylu, chemismu a obsah fotosynteticky aktivních pigmentů u listů buků vápněných do jamky. *Zprávy lesnického výzkumu* [online]. Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, VS Opočno: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Praha, 2011, 56(4), 301-309 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/23604637-Fluorescence-chlorofylu-chemismus-a-obsah-fotosynteticky-aktivnich-pigmentu-u-listu-buku-vapnenych-do-jamky.html>
- [68] *EXTRAKCE, CHROMATOGRAFICKÉ DĚLENÍ (C18, TLC) A STANOVENÍ LISTOVÝCH BARVIV: Úloha č. 7 – Extrakce a chromatografické dělení (C18 a TLC) a stanovení listových barviv*, Mendlova univerzita [online]. b.r. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/vyuka/fyr1/rtf/7.pdf
- [69] Plant Hardiness Zone Map for China. In: *United States Department of Agriculture* [online]. b.r. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50301000/Graphics/Climate_china.pdf
- [70] *Europe hardiness zone map* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <https://cz.pinterest.com/pin/564216659543489512/>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

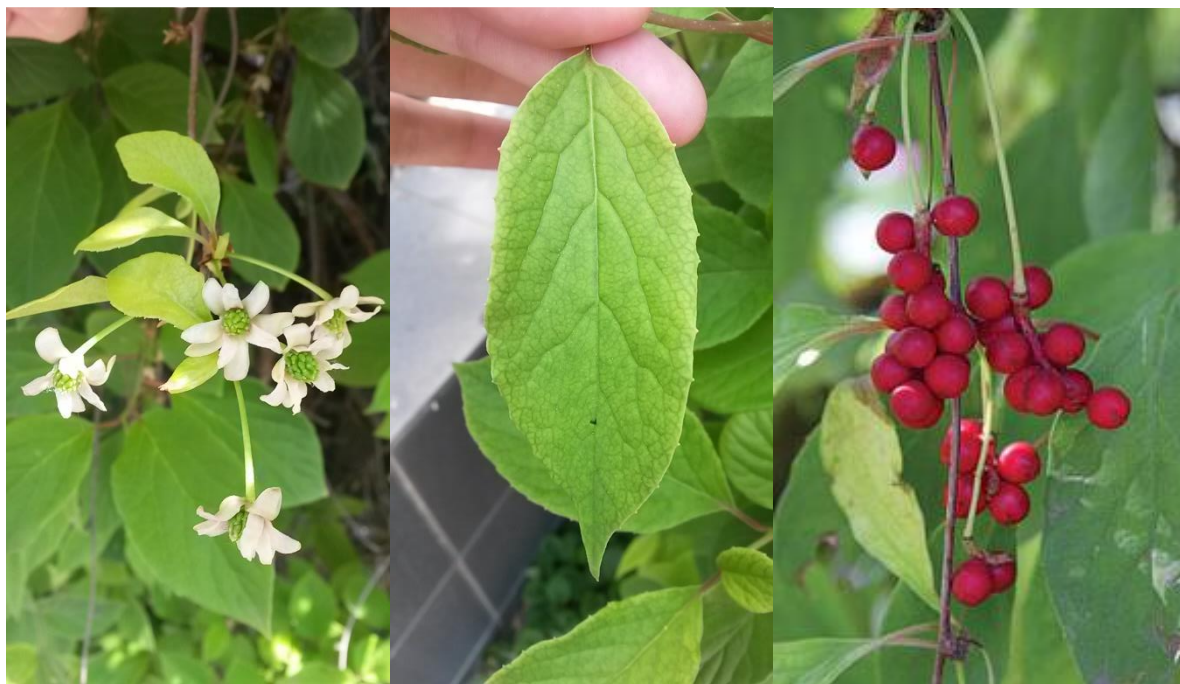
°C	stupně celsia
atd.	a tak dále
cm	centimetr
č.	číslo
d	průměr
DMAE	Dynamická mikrovlnná extrakce
g	gram
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IR	infra red, infra červený
l	výška, délka
MAE	Mikrovlnná extrakce
ml	mililitr
MS	Hmotnostní spektrometrie
nm	nanometr
NMR	Nukleární magnetická rezonance
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SFME	Superkritická fluidní mikroextrakce
TLC	Tenkvrstvá kapalinová chromatografie
TOF	Detektor doby letu
t_v	teplota varu
UV	Ultra violet, ultra fialový

8 PŘÍLOHY

8.1 Fotografie rostliny *Schisandra chinensis*

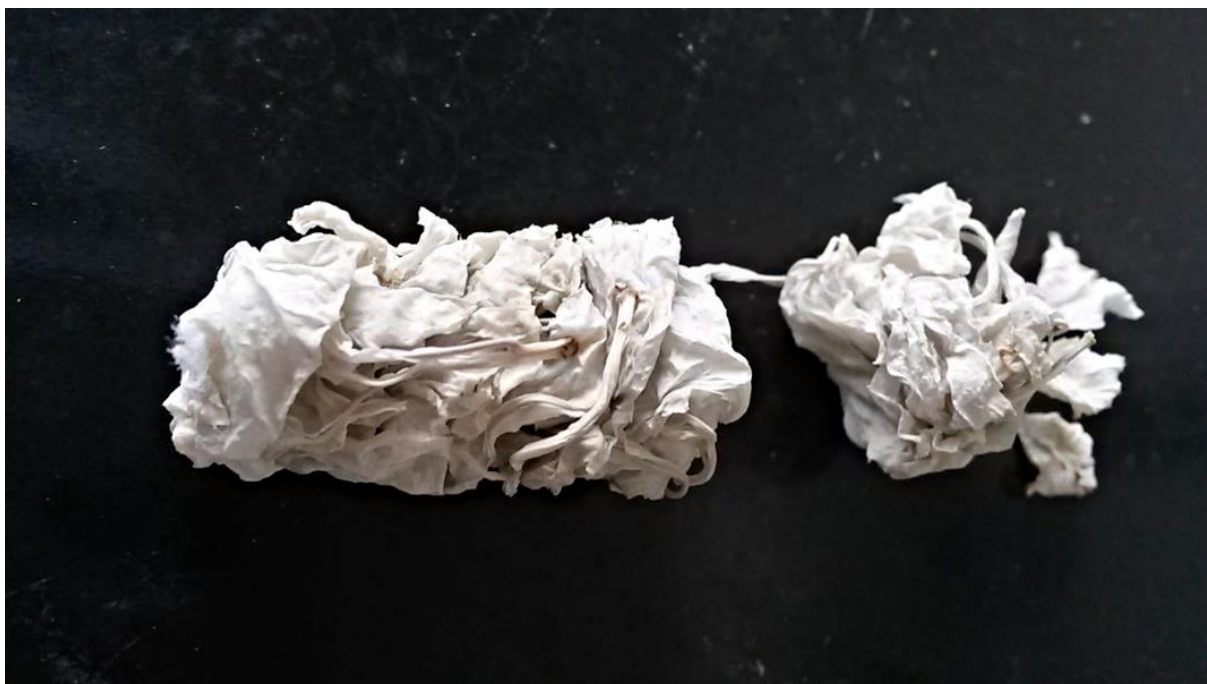


Obrázek 23: Fotografie celé rostliny *S. chinensis* (léto - Botanická zahrada Masarykovy univerzity, jaro – zahrada Ing. Josefa Kotlíka)

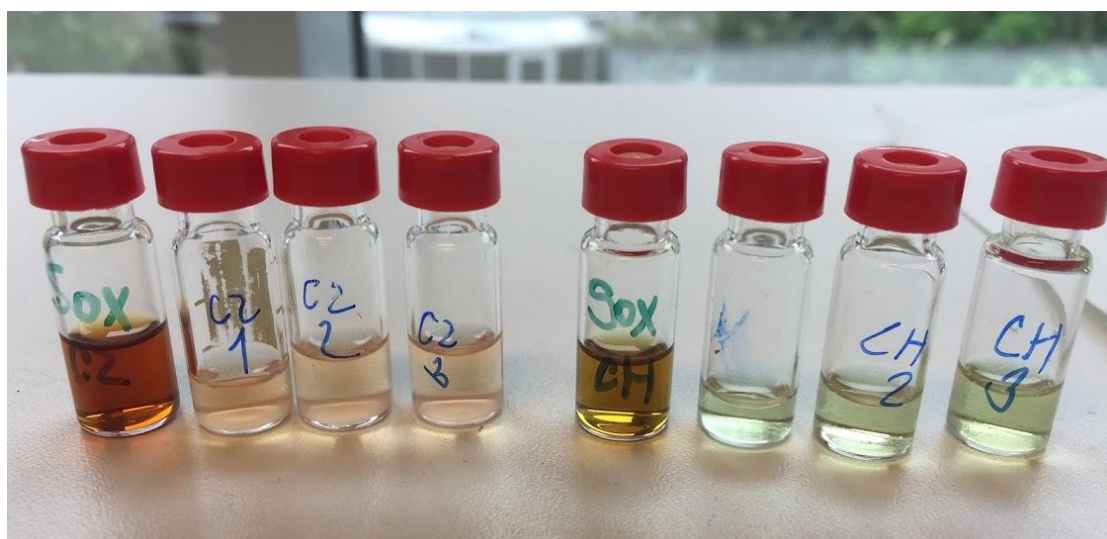


Obrázek 24: Fotografie rostliny *Schisandra chinensis* (květ, list, plody), Botanická zahrada Masarykovy univerzity

8.2 Fotografie v průběhu extrakce

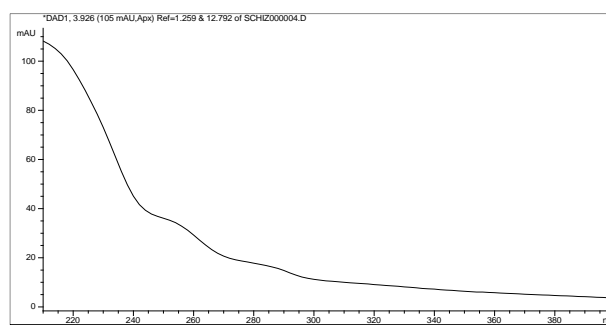
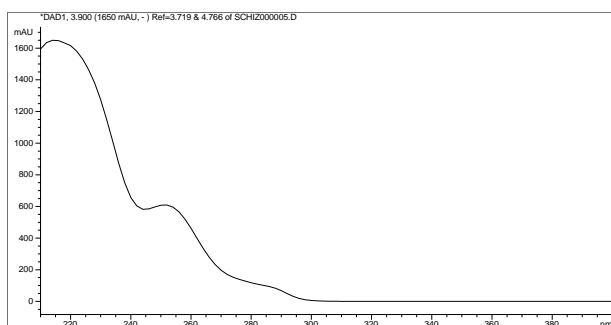


Obrázek 26: Vyextrahované listy rostliny *Schisandra chinensis* po extrakci dle soxhleta.

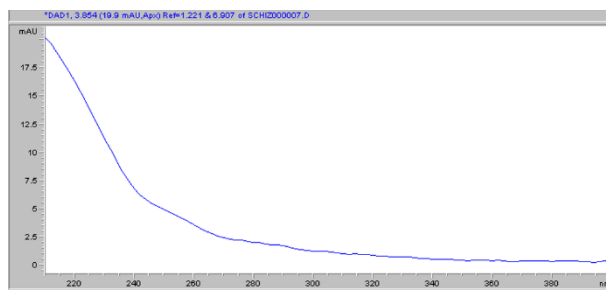
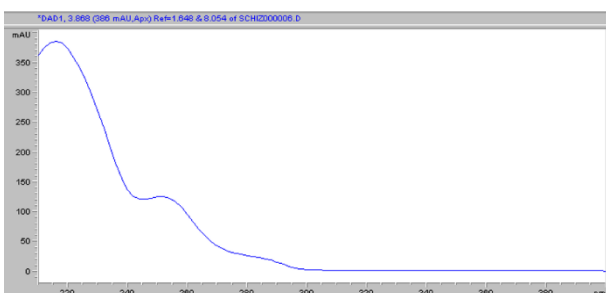


Obrázek 25: Připravené neředěné vzorky pro analýzu HPLC

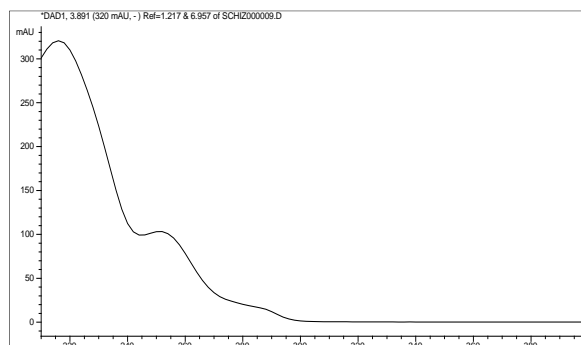
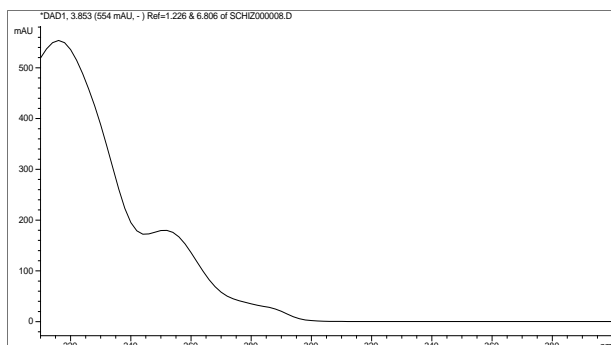
8.3 Absorpční spektra vzorků 1 – 9



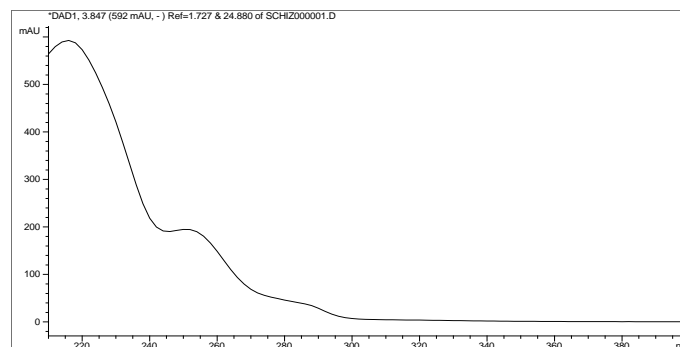
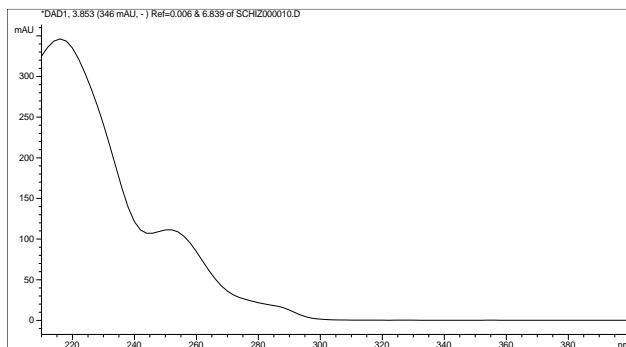
Obrázek 27: Absorpční UV spektrum standardu schizandrinu A (vlevo) a Sox CH neřaděného (vpravo).



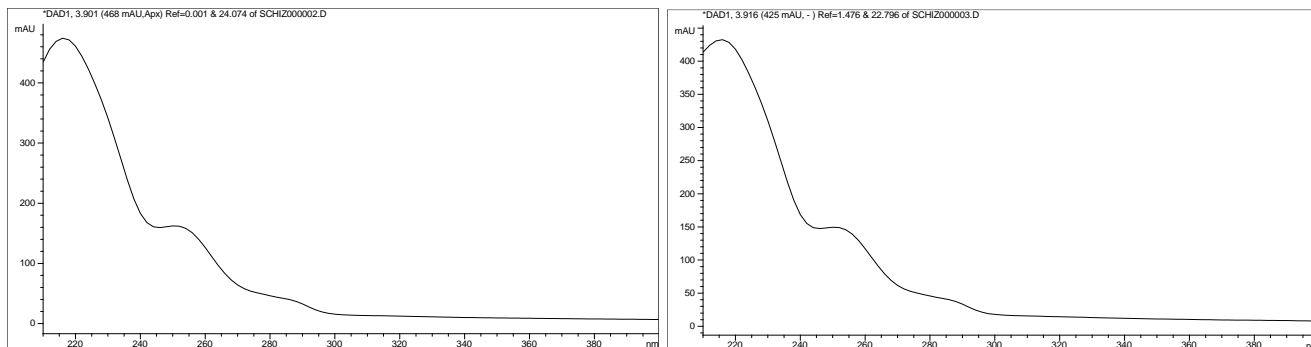
Obrázek 28: Porovnání absorpčních UV spekter vzorku Sox CZ (vlevo) a Sox CH red (vpravo)



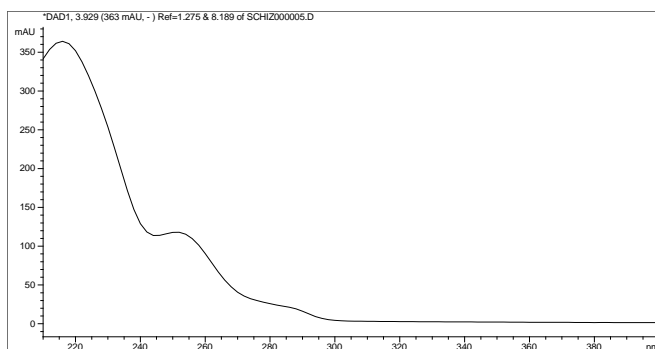
Obrázek 29: Absorpční UV spektrum vzorku CZ 1 (vlevo) a CZ 2 (vpravo).



Obrázek 30: Absorpční UV spektrum vzorku CZ 3 (vlevo) a CH 1 (vpravo).



Obrázek 31: Absorpční UV spektrum vzorku CH 2 (vlevo) a CH 3 (vpravo).



Obrázek 32: Absorpční UV spektrum vzorku z roku 2013 od p. Kozákové.