



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

ROSTLINNÉ ADAPTOGENY - SCHIZANDRA CHINENSIS

VEGETABLE ADAPTOGENS - SCHIZANDRA CHINENSIS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Pospíchalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Josef Kotlík, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1158/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lucie Pospíchalová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Josef Kotlík, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Rostlinné adaptogeny – Schizandra chinensis

Zadání bakalářské práce:

Charakteristika rodu Schizandra.
Adaptogeny z chemického hlediska.
Technologie izolace adaptogenů z jednotlivých částí rostliny.
Pěstování, sběr a získávání rostlinného materiálu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Lucie Pospíchalová
student(ka)

Ing. Josef Kotlík, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá rostlinnými adaptogeny (bioaktivními látkami) v rostlině *Schisandra chinensis*. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci rodu *Schisandra*, charakterizaci rostliny *Schisandra chinensis*, její vlastnosti, výskyt a pěstební možnosti v regionálním podnebném pásmu Jihomoravského kraje a také využití této rostliny. Dále jsou popsány adaptogeny z chemického hlediska a jejich možné metody izolace z jednotlivých částí rostlin. Experimentální část práce se zabývá extrakcí plodů a listů v rostlině *Schisandra chinensis*. Z extraktů listů byl dále stanoven obsah chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů pomocí spektrofotometrie, kdy bylo potvrzeno množství jednotlivých látek na období duben - květen.

ABSTRACT

This 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 regional climate zone of the South Moravian Region as well as the use of this plant. Furthermore, adaptogens are described from a chemical point of view and their possible methods of isolation from individual parts of plants. The experimental part deals with extraction of fruits and leaves from plant *Schisandra chinensis*. Further, in the leaves extract was determined chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids by spectrophotometry, where the quantity of individual substances was confirmed for months April – May.

KLÍČOVÁ SLOVA

Schisandra chinensis, extrakce dle Soxhleeta, chlorofyl, karotenoidy, spektrofotometrie

KEY WORDS

Schisandra chinensis, Soxhlet extraction, chlorophyll, carotenoids, spectrophotometry

POSPÍCHALOVÁ, L. *Rostlinné adaptogeny - Schizandra chinensis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Josef Kotlík, CSc..

Prohlášení

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

.....

(podpis studenta)

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Josefu Kotlíkovi, CSc. za jeho odborné vedení, odborné vedení v oblasti získávání, zpracování rostlinného materiálu, za cenné rady a připomínky, které mi během zpracování této bakalářské práce poskytoval a za pomoc při laboratorním zpracování vzorků. Také bych ráda poděkovala své rodině.

OBSAH

ÚVOD.....	7
1. TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1. Rod Schizandra.....	8
1.2. Schisandra chinensis	8
1.2.1. Biologická klasifikace	9
1.2.2. Popis rostliny.....	9
1.2.3. Výskyt	10
1.2.4. Köppenova klasifikace podnebí	10
1.2.5. Pěstební podmínky	11
1.2.6. Podmínky v jihomoravském kraji	12
1.2.7. Sběr a úprava	12
1.2.8. Farmakologie	13
1.2.9. Obsahové látky	14
1.2.10. Lignany	14
1.2.11. Chlorofyl.....	16
1.2.12. Karotenoidy.....	17
1.1. Technologie izolace bioaktivních látek.....	17
1.1.1. Extrakce v Soxhletově extraktoru	19
1.2. Instrumentální metody	20
1.2.1. Spektrofotometrie.....	20
2. CÍL PRÁCE	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1. Rostlinný materiál a chemikálie	22
3.2. Instrumentace	22
3.2.1. Zařízení pro přípravu a extrakci.....	22
3.2.2. Přístroje	22
3.2.3. Softwarové vybavení.....	22
3.3. Postupy a podmínky měření.....	23
3.3.1. Extrakce	23
3.3.2. Stanovení chlorofylu a karotenoidů na UV-VIS spektrofotometru	23
3.3.3. Podmínky pro identifikaci chlorofylu a karotenoidů na spektrofotometru....	24
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
4.1. Výsledky extrakce plodů.....	25
4.2. Výsledky extrakce listů	27
4.3. Výsledky identifikace chlorofylu a karotenoidů.....	29
5. ZÁVĚR	32

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	39
8. PŘÍLOHY.....	40
8.1. Fotografie rostliny <i>Schisandra chinensis</i>	40

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. Nejvíce je zastoupen adaptogen schizandrin. Celkově se jedná o lignandy s chemickou strukturou odvozenou od dibenzo[a,c]cyklooktadienu. 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 a krémů. 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 kapalné chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Identifikace a kvantitativní stanovení chlorofylu ze zelených částí rostlin se získá proměřením absorbance pomocí spektrofotometru.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Rod Schizandra

Rod Schisandra 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].

1.2. Schisandra chinensis

Jméno „*Schisandra*“ je odvozeno od dvou slov řeckého původu: „schizein“, což znamená dělit, rozetnout, rozrazit a „andros“ – muž. Jméno bylo zvoleno podle separace prašnickových buněk z tyčinek druhu *Schisandra coccinea* [5].

Schisandra chinensis nebo-li klanopraška čínská se začleňuje do rodu *Schisandra*, čeleď Schisandraceae [2; 3; 6]. Klanopraška čínská má mnoho synonym, *Schisandra* japonská, Čínská magnolie, Citronové dřevo, čínský citrónovník, Wu-wei-zi, *Kadsura chinensis*, *Maximoviczia chinensis*. a je to opadavá liána šplhající do koruny listnatých stromů [5].

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 [5].

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 [7].

V Číně je po mnoho staletí známá pro své blahodárné účinky a od pradávna se používá jako léčivka. Působí blahodárně na lidský organismus [5]. *Schisandra* nepatří mezi léčivé rostliny, ale je zařazována mezi rostliny s povzbuzujícími a tonizujícími účinky, tzv. adaptogeny [7].

1.2.1. Biologická klasifikace [7]

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

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

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

1.2.2. Popis rostliny

Jednodomá, opadavá, pravotočivá, popínavá a liánovitá rostlina s ovíjivými lodyhami dosahujícími délky 8-15 m [6]. 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 neovívá se. Výhonky 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) [6; 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; 6]. 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 dosahuje 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 20-50krát 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 kulovitěho 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].

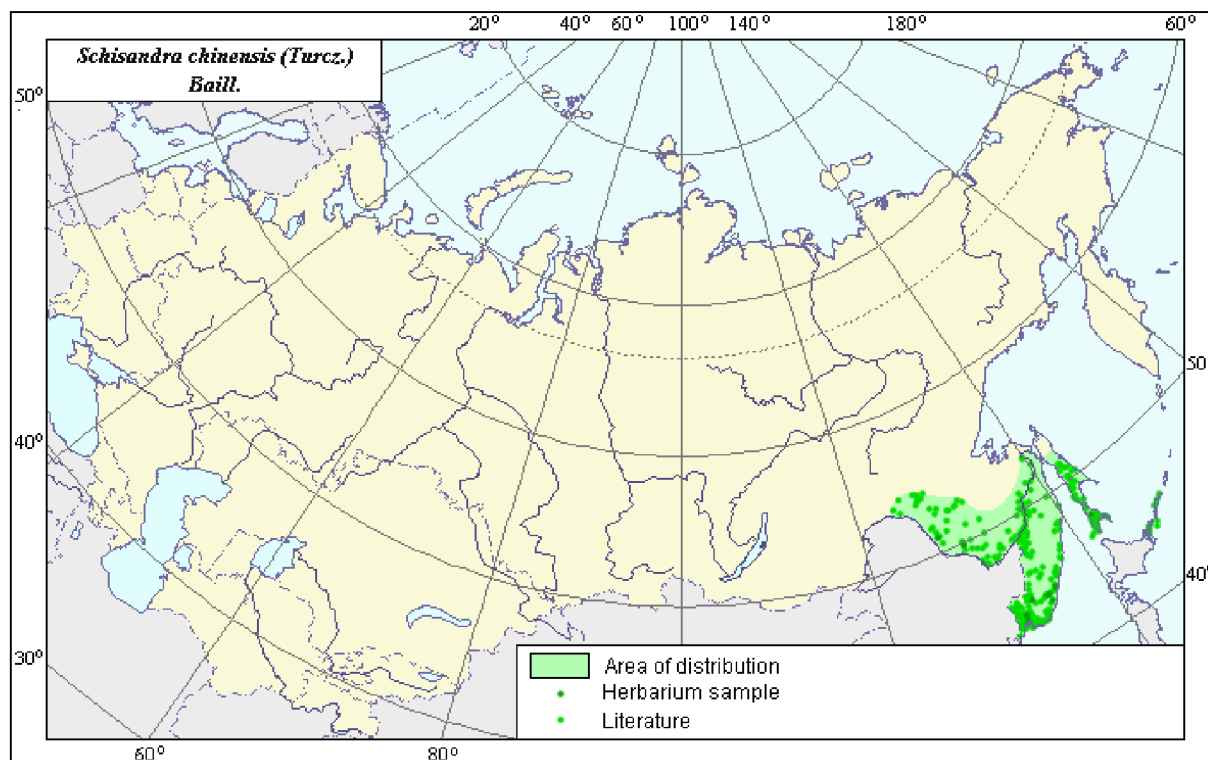
Fotky jednotlivých částí rostliny viz příloha (dole).

1.2.3. Výskyt

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 schizandry rostou především v severní Číně, Japonsku a Himalájích [5]. *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) [5; 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]

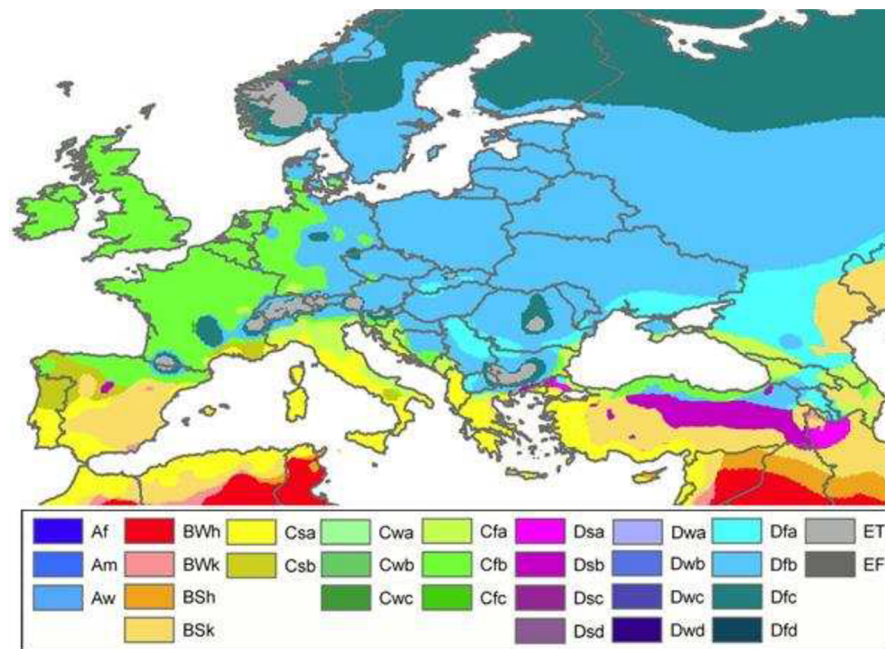
1.2.4. Köppenova klasifikace podnebí

Podle Köppenovy klasifikace podnebí, která je utvořena podle teplot vzduchu a atmosférických srážek ve vztahu s vegetací, se 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 do vlhkého, mírně teplého podnebí se suchou zimou, střední a vyšší polohy do vlhkého, mírně chladného podnebí se studenou zimou. Podle Köppenovi klasifikace patří do typu Dwb, který tedy odpovídá mírně studenému klimatu se studenou zimou a teplým létem. (obr. č. 2).

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 si velmi podobné. Dokonce by se dalo přepokládat, že pokud by byla na stinném místě s dostatečnou závlahou, v České republice se teploty pohybují o něco výše než v západním Rusku, tudíž by se rostlině mohlo dařit a plody by tak měly dostatečnou teplotu pro dozrání.



Obrázek 2: Mapa Köppenovy klasifikace podnebí Evropy [15]

1.2.5. 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 [5; 6].

Rozmnožování je možné vegetativní i generativní. Mezi vegetativní způsoby je uváděno řízkování v červnu až červenci zelenými řízkami z polovyzrálých mezičláneků 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 [16].

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 [5; 6].

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 schizandry, 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.

1.2.7. Sběr a úprava

Kresánek a Krejča [17] zmiňují získávání dvou drog *Fructus schisandrae chinensis* (v Japonsku zvané Gomishi, v Číně Wu—Wei-Zi) – plod schizandry a *Semen schisandrae* – semeno schizandry. 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. Zbylý odpad se rozprostře a promyje vodou, dokud nezbydou pouze semena. Výtěžek takto upravených semen je kolem 5 % na hmotnost čerstvých plodů [18].

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 2-3krát denně po dobu 20-30 dnů. Používají se i rozemletá semena: 0,5 – 1 g 2krát denně. Odvar připravujeme z 10 g suchých rozdrcených 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 [19; 20]. Kůra se pro své vonné silice (vůně po citrónu) používá v parfumerii a jako přísada do čajů [17].

Klanopraška je i velmi dekorativní rostlinou a díky svému liánovitému vzrůstu je vhodná k použití na pergoly [6].

V sibiřských oblastech se Klanopraška používá jako koření, díky jejím pěti chutí. V dnešní době přídavek schizandry najdeme i v některých bylinných směsích, odvarech, mastech, krémech, a dokonce i při aromaterapiích [5; 6].

1.2.8. Farmakologie

Plody a lignandy mají různé farmakologické vlastnosti. V tradiční čínské medicíně se hojně setkáváme s lihovými extrakty, také s plody schizandry, které jsou obsaženy v mnoha polykomponentních přípravcích. Tyto přípravky jsou kombinací většinou tří rostlin s podobnými vlastnostmi na lidský organismus.

Nejznámější přípravek, Shend Mai San, je kombinací *Panax ginseng*, *Schisandra chinensis* a *Ophiopogon japonicus*. Používá se při vyčerpání organismu a ztrátě tělesné energie [21]. 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 [22]. Spolu s pikolinátem chromu jsou plody schizandry doporučovány k léčbě zhoršené glukózové tolerance. Již po třítýdenním užívání se objevuje výrazné zlepšení tolerančního testu [5]. Mangolka je spolu s dalšími osmi rostlinami součástí korejské medicíny Dae Jo Whan, která tuto směs využívá při léčbě ischemické choroby srdeční. [66] 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 [23].

Lignany byly podrobeny pokusu, při kterém se sledovala antiradikálová aktivita schizandrolu A a schizandrolu B a byla porovnána s dvěma nejznámějšími antioxidanty – vitamínem C a E. Oba schizandriny měly větší vliv na hydroxylové radikály než vitamíny [11]. Existují studie na gomisin J a jeho halogenové deriváty, zejména bromové, jsou potenciálními inhibitory replikace viru HIV-1 [24].

Důvodem ke kontraindikaci je zvýšení nervové drážlivosti, epilepsie a také užívání přípravků z plodů Klanošprašky není vhodné při léčbě kumarinovými antikoagulanty (Warfarin). Lidé trpící poruchami srdeční činnosti, nebo počátečním stádiem kašle by měli užití zvážit. Nedoporučuje se užívání během těhotenství a kojení, rovněž by droga neměla být podávána malým dětem [25].

Záběr biologických účinků je velice široký a vzhledem k nízké toxicitě lignanů. Projevy toxických účinků u myši se projeví poklesem aktivity, apatií a vzestupem tělesné hmotnosti, ovšem činnost hlavních orgánů nevykazovala změny [8]. Jako nežádoucí účinek u velmi citlivých lidí se při požívání plodů nebo doplňků stravy může objevit průjem, bolesti břicha, zácpa, plynatost, také alergická reakce v podobě kopřivky není vyloučena.

1.2.9. Obsahové látky

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

1. dibenzo[a,c]cyklooktadienové lignany (schisandrin, gomisiny, wuweizisu C) [26] dibenzylbutanové lignany (pregomisin, meso-dihydroguajaretová kyselina [36], nordihydroguajaretová kyselina [27])
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) [26]
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, anthokyany, 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 [27]. V kůře je jí okolo 3 %, v semenech 2 % [28]. Huang a spol. [29] vyzolovali z listů a stonku vysoce oxidované norterpenoidy netypických struktur nazvané wuweizidilaktony A – F s schiartanovým skeletem, a dva bisnortriterpenoidy 18 - norschiartanového skeletonu nazývané wuweizidilaktony G a H [30]. U těchto látek zatím nebyl zjištěn účinek v lékařství, ale mohly by být důležitým markerem pro identifikaci a kontrolu kvality drogy [11].

1.2.10. Lignany

Hlavními sloučeninami obsaženými v plodech a semenech Schizandry 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 [31]. U některých druhů byl nalezen největší obsah v semenech [32]. Také bylo dokázáno, že různé hladiny ligandů jsou ovlivněny dobou sklizně a místem původu rostliny [33].

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 sktrkture lignanů a ligninu [34].

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' [35].

Nepolární charakter lignanů umožňuje, aby snáze prostupovaly buněčnými membránami a dostávají tak schopnost ovlivňovat řadu buněčných dějů. Lignan podofylotoxin je inhibítoem polymerace tubulinu. Etoposid a teniposid, chemicky modifikované deriváty epipodofylotoxinu, jsou používány jako cytostatika, která způsobují zlomy v obou vláknech DNA dělicích se buněk ireversibilní inhibicí topoizomerázy II. Tyto lignandy se používají jako

léčiva působící v širokém spektru chemoterapie rakoviny [36]. 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 [35].

1.2.10.1. 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].

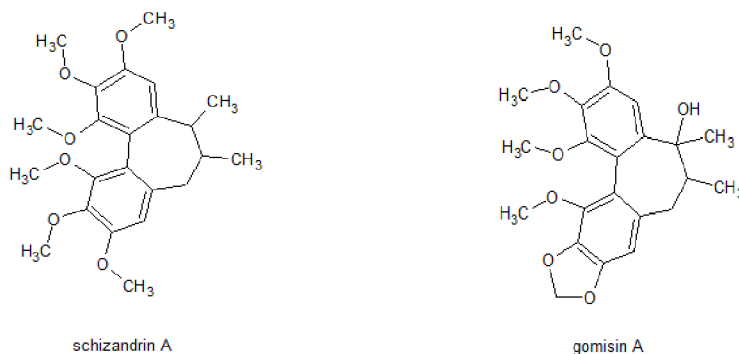
1.2.10.2. Lignany Schisandra chinensis

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 [37]. Například schisandrin je často v literatuře uváděn jako schisandrol A, gomisin A jako schisandrol B, deoxyschisandrin jako schisandrin A nebo wuweizu A [38]. Podle týmu vedeného prof. Ikeyou jsou v japonštině nazývány „Hoku-gomishi“ nebo „Kitagomishi“ (např. gomishin) a „Wu-wei-zi“ např. (wuweizisu C) [39]. 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 [27].

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 Schwarzinger 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 pětkrát vyšší koncentrace gomisinu N než bylo množství ostatních lignanů, zatímco v semenech a osemení byla vyšší koncentrace gomisinu N a schisandrinu [40].

U evropských rostlin byly v semenech zjištěny především schisandrin (0,75-1,86%), gomisin A (0,13-0,90%), deoxyschisandrin (0,07-1,09%), gomisin N (0,24-1,49%) a wuweizisu 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 sbíraných v srpnu. [18] [58] V semenech rostliny z Jižní Koree byl identifikován kromě hojně zastoupeného schisandrinu, gomisinu A i tigloylgomisin H [13].



Obrázek 3: Hlavní lignany obsažené v *S. chinensis* - schizandrin A a gomisin A

1.2.11. 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 [41].

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 [42]. 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 [43].

Většina vyextrahovaných barviv se pozvolna rozkládá na vzduchu a na světle, pokud je nutné extrakt rostlin skladovat, je nejlepší jej dát do ledničky [44].

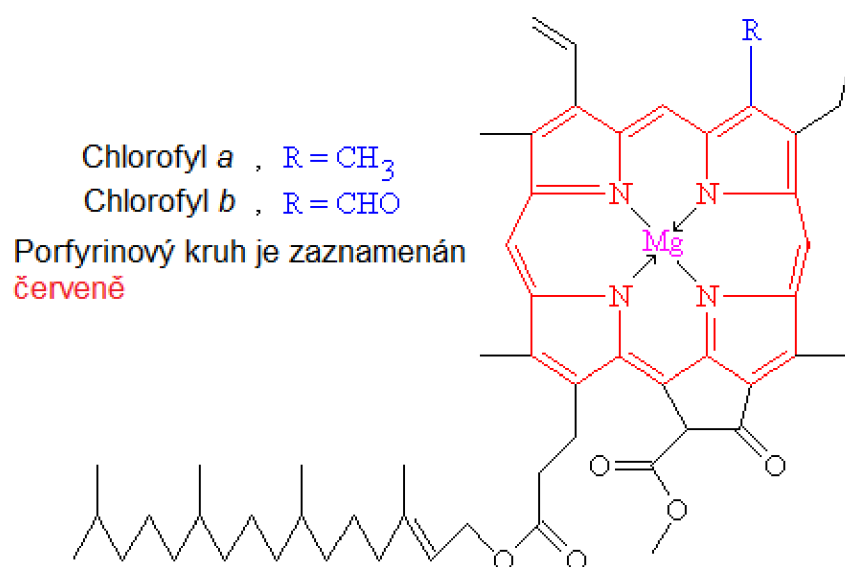
1.2.11.1. Chlorofyl a

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

1.2.11.2. 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 [44].



Obrázek 4: Struktura chlorofylu a a chlorofylu b

1.2.12. Karotenoidy

Z chemického hlediska patří karotenoidy do skupiny tetraterpenoidů a jedná se o oligomery isoprenu, vyznačující se pouze několika variantami uhlíkového skeletu. Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny: uhlovodíky nazývané karoteny a kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, xanthofyly. Karotenoidní barviva tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových pigmentů, které doprovázejí chlorofyly v rostlinách a v některých mikroorganismech a živočišných organismech. Listy zelených rostlin obsahují karotenoidy: β -karoten, α -karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. Xanthofyly jsou v listech přítomny volně na rozdíl od plodů, kde jsou vázány ve formě esterů vyšších mastných kyselin a ve formě glykosidů (bakterie a řasy) [45].

Karotenoidní barviva jsou doprovodné pigmenty vázány v chloroplastech ve formě chromoproteinů a funkčně se účastní fotosyntézy, kde mají dvě hlavní role ve fotosyntéze – sklízí světlo a vytváří fotoprotekci prostřednictvím zničení reaktivních druhů kyslíku, které vznikají jako vedlejší produkty fotoexcitace - teplo. Ve srovnání s chlorofyly je obsah karotenoidů obvykle nižší, v poměru přibližně 5:1 (Chl_{a+b} : karotenoidy). [41].

Za nepřítomnosti kyslíku jsou karotenoidy velmi stálé. Jsou hydrofobní, výborně rozpustné v tucích, benzenu, chloroformu, méně v hexanu, etheru, petroletheru, olejích, acetonu a ethanolu. Prakticky nerozpustné ve vodě, kyselinách a solích [43].

1.1. Technologie izolace bioaktivních látek

Obecně je extrakce separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či pevné fázi do jiné kapalně 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. Tudiž extrahovaná látka může přecházet do roztoku z kapalně fáze (vytřepávání) nebo pevně fáze (extrakce). Podle podmínek vyluhování a zvoleného postupu získáváme různé výluhy, 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) [46].

Vlastnosti vyluhovaného roztoku závisí 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 [47]. 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. K těmto metodám patří například ultrazvuková extrakce, která poskytuje kratší extrakční čas, prokazuje lepší reprodukovatelnost a i nižší spotřebu rozpouštědel [33]. Vybrané lignany, například schizandrin, schizantherin 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 [48]. 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 [49].

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 blížíci 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 rozpuštěných iontů a tím penetrace rozpouštědla do tuhé matrice, tím je usnadněno uvolnění cílových analytů [50]. 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 [51]. 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 ekstraktoru.

1.1.1. Extrakce v Soxhletově ekstraktoru

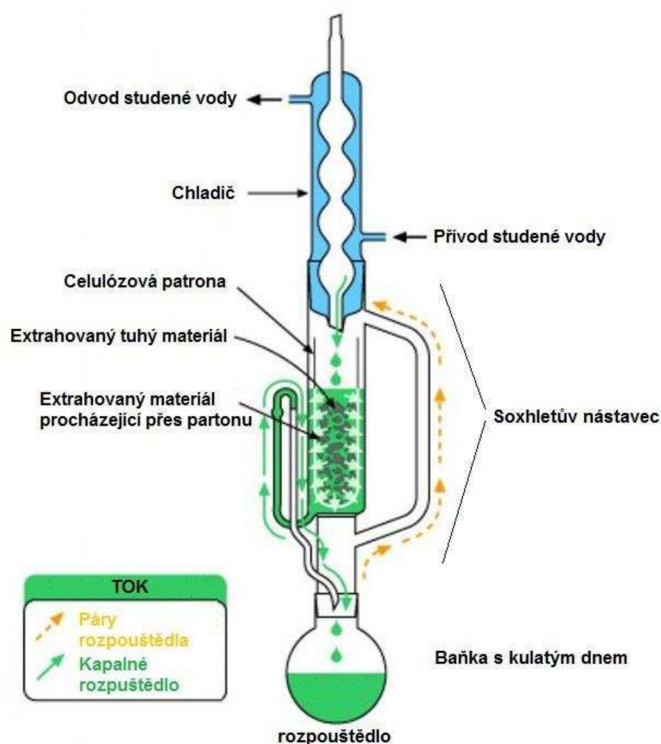
Tato technika je využívána pro extrakci látek z tuhých matric. Jedná se o extrakci typu tuhá látka – kapalina. Používá se většinou k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu nebo z technických produktů. Extrahuje se většinou v přístroji, ve kterém se jednoduchým způsobem realizuje opakovaná 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 [47].

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) [52; 53]. 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



Obrázek 5: Schéma aparatury pro Soxhletovu extrakci. [60]

1.2. Instrumentální metody

1.2.1. 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 strukturální 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 [50].

1.2.1.1. 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 [51].

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 [51].

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 [54].

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].

2. CÍL PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce byla identifikace rostlinných adaptogenů v rostlině *Schisandra chinensis*. V první řadě bylo důležité vyhledání literatury a zpracování literárního přehledu k charakterizaci rodu *Schisandra* a popisu adaptogenů (bioaktivních látek) z chemického hlediska. Také byl zpracován literární přehled k problematice pěstování, sběru a získávání rostlinného materiálu z rostliny, taktéž i literární a patentový průzkum se zaměřením na technologii extrakce účinné složky. Dalším dílčím cílem bakalářské práce byla extrakce plodů a listů rostliny *S. chinensis* pomocí Soxhletovy extrakce. Zpracování a vyhodnocení kvantity chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů z extraktu listů pomocí spektrofotometrie se zpracováním kompletních výsledků a jejich diskuze bylo konečným cílem bakalářské práce.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tématem experimentální části této bakalářské práce byla extrakce sušených plodů dle Soxhleta, extrakce čerstvých zelených okvětních a vrcholových listů dle Soxhleta a identifikace a kvantifikace chlorofylu obsaženého v zelených okvětních a vrcholových listech rostliny *Schisandra chinensis* pomocí UV-VIS spektrometru.

Extrakce sušených plodů rostliny *Schisandra chinensis* z roku 2015 byla provedena celkem u 3 extraktů. Chlorofyl byl detekován ze zelených listů rostliny *Schisandra chinensis* otrhané v dubnu 2017.

Dva vzorky byly nejprve extrahovány a poté byl chlorofyl analyzován UV-VIS detektorem.

Pro vyextrahování látek ze vzorků byla použita extrakce dle Soxhleta. Na extrakci plodů byla zvolena polární rozpouštědla ethanol v kombinaci s vodou ve třech poměrech. První extrakce byla provedena pouze za přítomnosti destilované vody, druhá proběhla v 50% ethanolu a třetí v 99,99% ethanolu. Tyto extrakty byly uloženy v temnu a chladnu a dále se s nimi bude pracovat při analýze jednotlivých lignanů. Při extrahování dvou vzorků listů byl použit pokaždé jako rozpouštědlo 99,99% ethanol.

3.1. Rostlinný materiál a chemikálie

VZORKY

- *Schisandra chinensis*, Česká republika, Ing. Josef Kotlík (sušené plody z roku 2015)
- *Schisandra chinensis*, Česká republika, Ing. Josef Kotlík (okvětní listy otrhány 6. 4. 2017)
- *Schisandra chinensis*, Česká republika, Ing. Josef Kotlík (vrcholové listy otrhány 6. 4. 2017)

CHEMIKÁLIE

- Ethylalkohol (Lachema, Brno; pro UV spektroskopii)
- HCl (Penta, Chrudim)
- Destilovaná voda

3.2. Instrumentace

3.2.1. Zařízení pro přípravu a extrakci

- Analytické váhy Scaltec SPB 52, Scaltec Instruments, Germany
- Extrakční celulózová patrona, 30/100 mm, Filtrak-VEB-Specialfilterfabrik
- Infračervený bezdotykový teploměr IR380
- Běžné laboratorní vybavení

3.2.2. Přístroje

- Jednopaprskový UV-VIS spektrofotometr Specord 50 PLUS

3.2.3. Softwarové vybavení

- WinASPECT PLUS
- Microsoft Office Word 2013
- Microsoft Office Excel 2013

3.3. Postupy a podmínky měření

3.3.1. Extrakce

Plody *S. chinensis*

10,0076 g, 10,0014 g a 10,0174 g nedrceného sušeného vzorku plodů *Schisandra chinensis* (Ing. Josef Kotlík) bylo naváženo na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ a přesypáno do extrakční patrony z čisté celulózy ($d = 3 \text{ cm}$, $l = 10 \text{ cm}$). Celulózová extrakční patrona byla spolu se vzorkem vložena do Soxhletova extraktoru a za použití celkově 250 ml rozpouštědla byly sušené nedrcené plody extrahovány za stálého mírného varu rozpouštědla po dobu 6 hodin. Vzniklý extrakt byl přelit do plastové láhve (150 ml) a uchován v lednici při max. teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pro další zpracování.

Takto byly provedeny celkem 3 extrakce, které se lišily koncentrací extrakčního rozpouštědla. První extrakční rozpouštědlo byla destilovaná voda ($t_v = 100 \text{ }^\circ\text{C}$). Při druhé extrakci byla jako rozpouštědlo použita směs vody a ethanolu v poměru 1:1, tzn. 50% ethanol ($t_v = 80 - 85 \text{ }^\circ\text{C}$). V poslední extrakci plodů bylo jako rozpouštědlo použito 99,99% ethanol ($t_v = 78,37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Okvětní a vrcholové listy S. chinensis

6,7185 g čerstvě natrhaných okvětních listů a 6,3565 g čerstvě natrhaných vrcholových listů bylo naváženo na analytických vahách a napěchováno co nejvíce hluboko do celulózové extrakční patrony. Ta byla dále vložena do Soxhletova extraktoru a za použití celkově 250 ml 99,99% ethanolu jako extrakčního činidla extrahována za stálého mírného varu rozpouštědla po dobu 6 hodin. Po vychladnutí byl extrakt uložen do plastových lahví (150 ml) a připraven pro detekci chlorofylu.

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. Homogenizace vzorku může v některých případech zvýšit účinnost extrakce. [71]

Doba mezi extrakcí a následujícím spektrofotometrickým měřením by měla být co nejkratší. Extrakt však může být před měřením skladován přes noc v chladničce při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (doba skladování by neměla být delší než 3 dny). Skladovat extrakty při teplotě $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ je možné až 30 dní. [71]

3.3.2. Stanovení chlorofylu a karotenoidů 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), chlorofylu b (Chl_b) a karotenoidů (Car_{x+c}).

10 ml extraktu bylo převedeno do 5 cm kyvety spektrofotometru Specord 50 PLUS a byla proměřena absorbance při nastavených vlnových délkách 470 nm, 647 nm, 663 nm a 750 nm proti referenční kyvetě s extrakčním činidlem, tj. 99,99% ethanol.

Rovnice pro výpočet obsahu pigmentů (Lichtenthaler 1987) byly upraveny podle Makeena et al (2007) o odečet absorbance při 750 nm, kde již chlorofyly ani karotenoidy neabsorbují a hodnota absorbance je způsobena rozptylem nečistot v extraktu. Koncentrace

chlorofylu a, chlorofylu b, součtu celkového chlorofylu a karotenoidů byla vyjádřena na základě výpočtu podle rovnice (1)(2)(3)(4).

Rovnice: Výpočet koncentrace chlorofylu a feopigmentů v roztocích [55]

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g} / \text{ml}) = 12,25 \cdot (A_{663} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{647} - A_{750}) \quad (1)$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g} / \text{ml}) = 21,50 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 5,10 \cdot (A_{663} - A_{750}) \quad (2)$$

$$\text{Chl}_{a+b} (\mu\text{g} / \text{ml}) = 7,15 \cdot (A_{663} - A_{750}) + 18,71 \cdot (A_{647} - A_{750}) \quad (3)$$

$$\text{Car}_{x+c} (\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{1000 \cdot (A_{470} - A_{750}) - 1,82 \cdot \text{Chl}_a - 85,02 \cdot \text{Chl}_b}{198} \quad (4)$$

Kde A_{470} , A_{647} , A_{663} , A_{750} jsou absorbance při jednotlivých vlnových délkách a šířce kyvety 5 cm.

Výsledek je udáván v mikrogramech na 1 mililitr extraktu. Poté byly přepočteny výsledky 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 a karotenoidů na UV-VIS spektrofotometru

Chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy byly ve vzorcích vrcholových a okvětních listů stanoveny na jednopaprskovém UV-VIS spektrofotometru Specord 50 PLUS za podmínek uvedených v tabulce č. 1.

Tabulka 1: 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

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci bakalářské práce byl analyzován jeden vzorek sušených plodů *Schisandra chinensis* z roku 2015 a jeden vzorek čerstvých listů (okvětní a vrcholové) z roku 2017. Všechny vzorky byly původem z České republiky a majetkem Ing. Josefa Kotlíka, CSc.

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

4.1. Výsledky extrakce plodů

Tři dávky sušených plodů rostliny *S. chinensis* byly extrahovány v Soxhletově extraktoru. Tato 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. Klade minimální nároky na obsluhu, proto může extrakce probíhat přes noc, až 48 hodin.

Jako první bylo použito rozpouštědlo destilovaná voda, při druhé extrakci 50% ethanol a při poslední extrakci 99,99% ethanol. Po celou dobu extrakce byla pomocí infračerveného bezdotykového teploměru IR380 sledována teplota všech tří hlavních částí zařízení pro extrakci, tj. teplota rozpouštědla v baňce s kulatým dnem, teplota celulózové patrony uvnitř extraktoru a teplota chladiče.

Výsledné teploty všech tří částí u tří extraktů jsou zobrazeny v tabulkách 2,3 a 4.

Tabulka 2: Teploty během extrakce při vodném rozpouštědle

	Teplota [°C]			
	po 1 hodině	po 3 hodinách	po 5 hodinách	průměr
extrakt	96,2	98,5	96,2	97,0
Soxhlet	80,9	79,5	79,3	79,9
chladič	31,8	28,0	28,3	29,4

Tabulka 3: Teploty během extrakce při rozpouštědle 50% ethanol

	Teplota [°C]			
	po 1 hodině	po 3 hodinách	po 5 hodinách	průměr
extrakt	86,1	84,2	87,9	86,1
Soxhlet	71,3	64,0	65,1	66,8
chladič	20,1	25,0	21,0	22,0

Tabulka 4: Teploty během extrakce při rozpouštědle 99,99% ethanol

	Teplota [°C]			
	po 1 hodině	po 3 hodinách	po 5 hodinách	průměr
Extrakt	78,6	78,3	77,8	78,2
Soxhlet	70,6	69,5	68,7	69,6
Chladič	26,0	21,2	16,1	21,1

Dále bylo provedeno zhodnocení vlastností extraktů pomocí běžného laboratorního vybavení a pozorování. Jednotlivé parametry a vlastnosti shrnuje v tabulka 5 a obrázky 6 a 7.

Tabulka 5: Vlastnosti extraktů z plodů *S. chinensis*

	Extrakt		
	1	2	3
Patrona	zabarvená	lehce zabarvená	čistá
Roztok (barva)	tmavý/kalný	tmavý/méně kalný	světlý/čirý
Objem extraktu [ml]	210	195	220
Objem plodů po extrakci [ml]	15	20	17
Hmotnost plodů před extrakci [g]	10,0076	10,0014	10,0174
Hmotnost plodů po extrakci [g]	5,0764	6,7248	5,4386



Obrázek 6: Srovnání jednotlivých reálných vzorků po extrakci dle Soxhleta s různou koncentrací rozpouštědla (vlevo destilovaná voda, uprostřed 50% ethanol, vpravo 99,99% ethanol)



Obrázek 7: Srovnání množství plodů a barev celulózových parton po extrakci

Z fotodokumentace je zřejmé, že při použití rozpouštědel s odlišnou koncentrací se nám podařilo vyextrahovat vždy alespoň část látek z plodů. Ovšem je zřetelné, že při použití destilované vody, je roztok extraktu dost kalný. Při srovnání hmotnosti plodu před a po extrakci s ostatními extrakty, (Tabulka 4) můžeme vidět největší úbytek hmotnosti u plodů, tudíž bylo pomocí vody vyextrahováno největší množství obsažených látek z plodů. Pozorovat můžeme i největší zbarvení patrony. Bohužel takto zpracovaný vzorek nemá dlouhou dobu trvanlivosti, protože voda není dobrý konzervant a vzorek brzy degraduje. Barva extraktu č. 2 je červená a roztok je čirý. Lze tedy soudit, že v 50% ethanolu jako extrakčním rozpouštědlem se vyextrahovalo i dostatek pigmentů. Oproti tomu extrakt č. 3, který byl extrahován 99,99% ethanolu má zlatavou barvu a patrona je čistě bílá. Domnívám se, že ethanol s tak vysokou koncentrací není vhodný k extrakci, alespoň ne pro identifikaci barviv. Dle vizuálního hodnocení je třetí extrakt nejméně zbarvený. Obsah lignanů v jednotlivých extraktech zatím není znám a bude předmětem dalšího měření.

4.2. Výsledky extrakce listů

Při extrakci nehomogenizovaných vzorků okvětních a vrcholových listů *S. chinensis*, které byly extrahovány v Soxhletově extraktoru, byl jako rozpouštědlo použit 99,99% ethanol po dobu 6 h. V průběhu extrakce byla opět kontrolována teplota, která je uvedena v tabulce 6 a tabulce 7.

Tabulka 6: Teploty během extrakce okvětních listů

	Teplota [°C]			
	po 1 hodině	po 3 hodinách	po 5 hodinách	průměr
extrakt	76,5	77,4	76,9	76,9
soxhlet	69,2	60,3	67,3	65,6
chladič	25,6	23,1	17,8	22,2

Tabulka 7: Teploty během extrakce vrcholových listů

	Teplota [°C]			
	po 1 hodině	po 3 hodinách	po 5 hodinách	průměr
extrakt	75,3	78,7	79,1	77,7
soxhlet	68,3	69,4	66,8	68,2
chladič	16,4	20,9	20,3	19,2

Z hodnot vyplývá, že teplota extraktu byla udržována v průměru okolo 77,7 °C, tj. mírný var, aby nedošlo k prudké extrakci. Průměrná teplota v baňce s kulatým dnem se pohybovala okolo 77 °C, teplota v patroně Soxhletova extraktoru průměrně okolo 67 °C a nejnižší teplota byla naměřena v kuličkovém chladiči a to 21 °C.

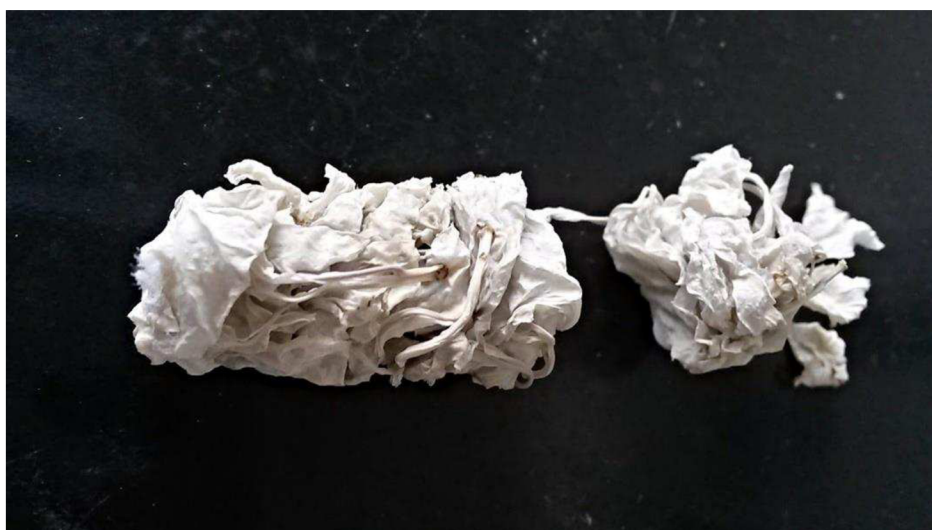
Nejvíce zbarvené bylo extrakční činidlo hned při prvním naplnění extrakční patrony, kdy listy pustily nejvíce barviva. S přibývajícím časem byla viditelná extrakce barviv slabší. Oproti tomu extrakce plodů byla postupná a k zbarvení docházelo postupně. Mohlo by se zdát, že oba extrakty budou mít stejnou barvu, ale reálný vzorek č. 2 byl o poznání tmavší. Objem extraktu nezůstal 250 ml, ale v prvním případě 225 ml a v druhém případě pouze 215 ml z důvodu nasáknutí celulózové patrony extrakčním rozpouštědlem. V tabulce 8 jsou zapsány jednotlivé vlastnosti dvou extraktů z reálných vzorků č. 1 a 2.

Tabulka 8: Vlastnosti extraktů z listů *S. chienesis*

	Extrakt	
	1	2
patrona roztok	čistá světlý/čirý	čistá tmavší/kalný
Objem extraktu [ml]	225	215
Hmotnost plodů před extrakci [g]	6,7185	6,3565
Hmotnost plodů po extrakci [g]	0,6445	0,6513
Rozdíl [g]	6,0740	5,7052



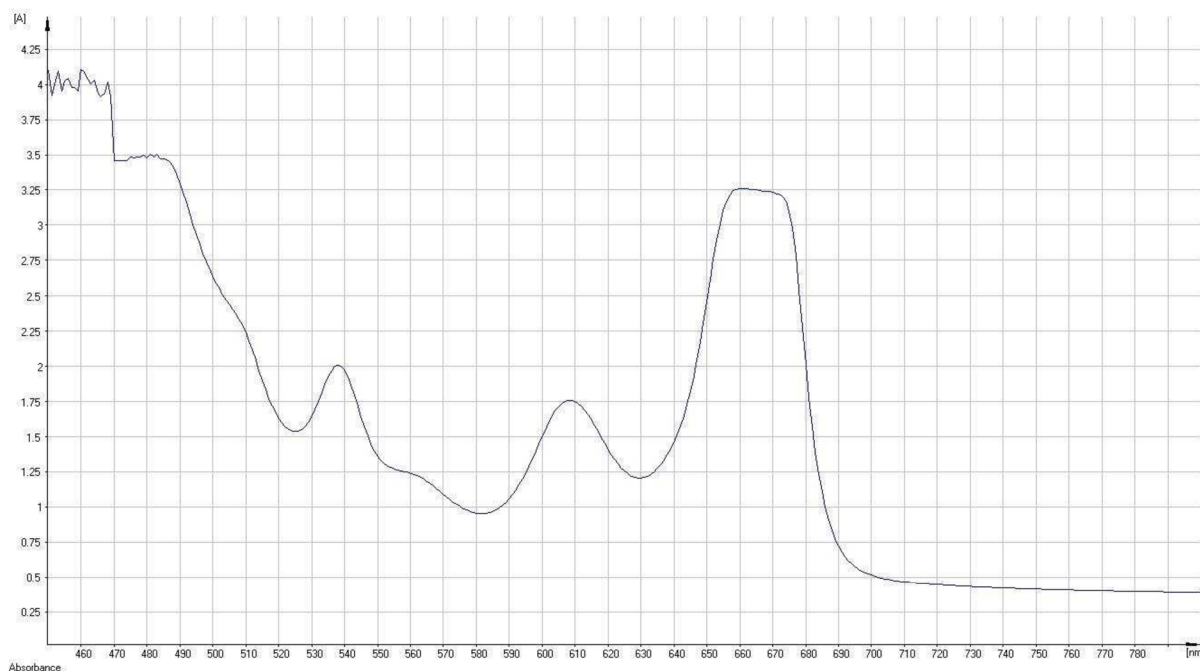
Obrázek 8: Srovnání reálných vzorků po extrakci dle Soxhleta (vlevo extrakt z okvětních listů, vpravo extrakt z vrcholových listů)



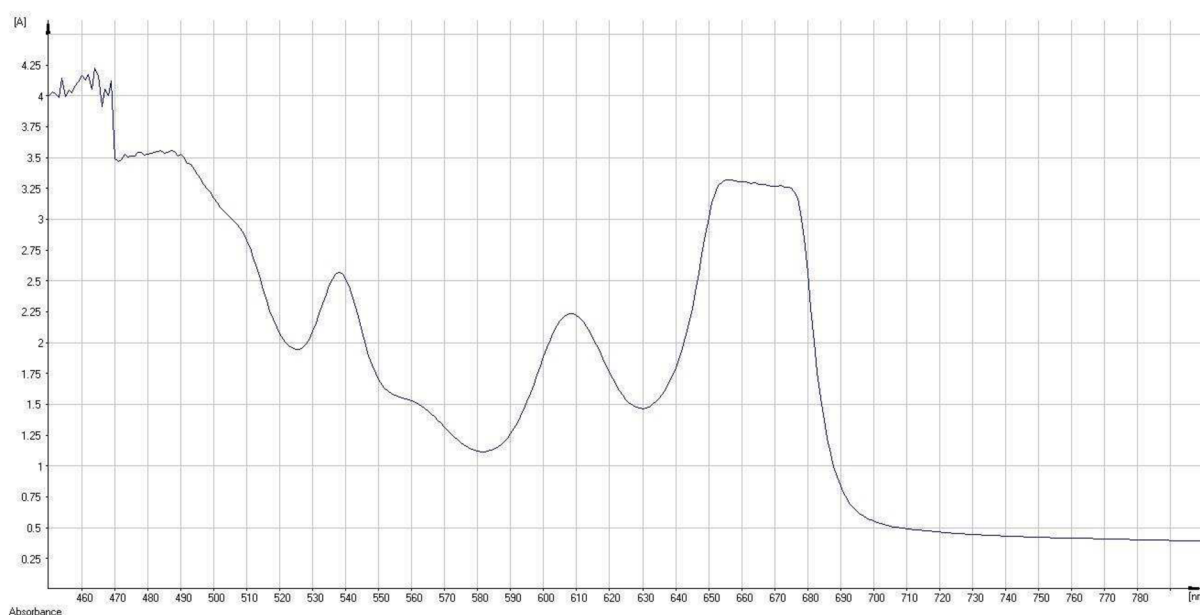
Obrázek 9: Rostlinný materiál bez pigmentů po 6 hodinové extrakci Soxhletem.

4.3. Výsledky identifikace chlorofylu a karotenoidů

Pro analýzu chlorofylu v mnou měřených reálných vzorcích bylo nejdříve proměřeno referenční extrakční činidlo, tj. 99,99% ethanol jako slepý vzorek. Po proměření absorbance reálných vzorků bylo porovnáním absorpčních spekter zjištěno, že v obou reálných vzorcích je obsažen chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Chlorofyly a karotenoidy absorbují při jiných vlnových délkách: karotenoidy 470 nm a chlorofyly při 647 nm a 663 nm, proto jsou relativně snadno identifikovatelné. Výsledné hodnoty naměřené absorbance jsou souhrnně uvedeny v tabulce 9. Na obrázku 10 je zobrazeno absorpční spektrum vzorku č. 1 pořízeného z okvětních listů *S. chinensis*. Na obrázku 11 potom můžeme vidět absorpční spektrum vzorku č. 2 pořízeného z vrcholových listů *S. chinensis*.



Obrázek 10: Absorpční spektrum vzorku č. 1 (okvětní listy *Schisandra chinensis* z roku 2017)



Obrázek 11: Absorpční spektrum vzorku č. 2 (vrcholové listy *Schisandra chinensis* z roku 2017)

Tabulka 9: Hodnoty absorbance při vybraných vlnových délkách

	Vzorek č.	
	1	2
A_{470}	3,4778	3,4920
A_{647}	2,0442	2,5592
A_{663}	3,2522	3,2916
A_{750}	0,4131	0,4217

Analýza fotosynteticky aktivních pigmentů vzorků z dubnového odběru dospěla k měřitelným koncentracím chlorofylů a karotenoidů (Chl_a , Chl_b , Chl_{a+b} a Car_{x+c}). Dosazením naměřených absorbancí do výše uvedených rovnice bylo zjištěno množství jednotlivých fotosyntetických pigmentů. Obsah chlorofylu a se u vzorku č.1 pohybuje mírně nad hodnotou $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, obsah chlorofylu b pak těsně pod $690 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a obsah karotenoidů byl mírně nad $210 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Poměr celkového množství chlorofylů (Chl_a/Chl_b) dosáhl hodnoty 1,47 a u vzorku č. 2 tento poměr dosáhl hodnoty pouze 0,93. Ještě vyšší rozdíly jsem zjistila při porovnání hodnot poměrů Chl_{a+b}/Car_{x+c} . U vzorku č. 2 – vrcholových listů byla vypočtena hodnota tohoto poměru dokonce 33,81. Obsah chlorofylu a se u vzorku č. 2 pohybuje mírně pod hodnotu $990 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, obsah chlorofylu b převyšuje hodnotu $1050 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a obsah karotenoidů dosahuje hodnoty $60 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Všechny mnou zpracované hodnoty fotosynteticky aktivních pigmentů jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka 10: Obsahy fotosyntetických pigmentů (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmotnosti) v listech Schizandry chinensis a poměry fotosyntetických pigmentů.

25.4.2017						
Vzorek	Chl_a	Chl_b	Chl_{a+b}	Car_{x+c}	Chl_a/Chl_b	Chl_{a+b}/Car_{x+c}
1	1012,33	689,53	1701,86	212,98	1,47	7,99
2	987,40	1059,35	2046,75	60,53	0,93	33,81

Mnou naměřené poměry chlorofylu a a chlorofylu b (Chl_a/Chl_b) z těchto dubnových odběrů se pohybují v rozmezí od 0,9 do 1,5 a neodpovídají v literatuře uváděnému poměru 3:1 až 4:1 u rostlin rostoucích za optimálních podmínek (Ryplová, 2014) [56]. Jak ukazují Sarijeva et al. (2007) [57], 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) [55]. Je tedy reálně možné, že za nízkou hodnotou obsahu chlorofilů, zejména typu a, je odpovědné letošní chladné a relativně deštivé jaro.

Další mnou měřená složka fotosynteticky aktivních pigmentů jsou karotenoidy. Jak uvádí např. Demmig-Adams et al. (1996) [58], karotenoidy mají v rostlině nejen funkci světlosběrnou (jako doplňkové pigmenty), ale také ochrannou – chrání fotosyntetický aparát před nevratnou fotooxidací. Podle Špulák O. et al. (2011) [55] byl zjištěn vyšší relativní obsah karotenoidů na jaře, což souvisí s postupem tvorby pigmentů, kdy se nejdříve vytvářejí karotenoidy a poté až chlorofyl a a chlorofyl b (Kincl, Krpeš 2006) [59].

Poměr chlorofylů a karotenoidů (Chl_{a+b}/Car_{x+c}) by měl u dobře rostoucích rostlin dosahovat 5:1. Mnou naměřené výsledky jsou výrazně nižší a to zejména u vzorku č. 2, což jsou vrcholové listy rostliny. Příčinou tohoto výsledku jsou zřejmě dva faktory. Prvním je

růstová fáze rostliny. Vrcholové listy jsou v počáteční růstové fázi a v této době obecně převažuje v rostlinném pletivu chlorofyl. Teprve v další fázi narůstá obsah karotenoidů jako protektivního prvku. Druhým faktorem jsou již výše diskutované meteorologické poměry letošního jara. Očekávám, že z následných odběrů prováděných v měsíci květnu získám vyšší hodnoty tohoto typu fotosyntetických pigmentů – karotenoidů.

5. ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byl proveden literární průzkum rodu *Schisandra*, byly popsány adaptogeny obsažené v rostlině a jejich možnosti extrakce.

Pro vypracování experimentální části práce byly použity vzorky pocházející a pěstované v jihomoravském podnebním pásmu. 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.

Ze sušených plodů *Schisandra chinensis* z roku 2015 byly vyextrahovány tři roztoky lišící se extrakčním rozpouštědlem. Jako extrakční technika byla zvolena extrakce dle Soxhleta. Jako extrakční rozpouštědlo byla použita voda, 50% ethanol a 99,99% ethanol. Důvodem k použití právě ethanolu například oproti acetonu je zejména jeho toxicita. Vliv odlišných rozpouštědel na kvalitu a kvantitu obsažených účinných lignanů bude předmětem další analýzy.

Další extrakce dle Soxhleta byla provedena na čerstvých okvětních a vrcholových listech rostliny *S. chinensis*. Jako rozpouštědlo byl použit 99,99% ethanol pro UV spektroskopii a celková doba extrakce byla 6 hodin. Tyto extrakty byly podrobeny spektrofotometrické analýze na přístroji Specord 50 PLUS. Při vybraných vlnových délkách (470 nm, 647 nm, 663 nm a 750 nm) byly odečteny hodnoty k identifikování množství fotosynteticky aktivních pigmentů (Chl_a , Chl_b a Car_{x+c}). Celkově bylo identifikováno větší množství chlorofylů než karotenoidů.

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.

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] PANOSSIAN, A a G WIKMAN. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail: An overview of Russian research and uses in medicine. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. b.r., **2008**(118), 183-212 [cit. 2017-05-10]. ISSN 0378-8741.
- [6] ŠAMLA, Jiří. *Subtropy - pěstitelské praktikum: Pěstitelské praktikum - B*. In: . Edice citrusář, 1994.
- [7] BAILLON, H a Marcus M HARTOG. *The natural history of plant*. London: L. Reeve & Co, 1871. DOI: 10.5962/bhl.title.41454.
- [8] HANCKE, J. L., R. A. BURGOS a F. AHUMADA. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia*. b.r., (5), 451-471. ISSN 0367-326x.
- [9] *Schisandra 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 gomisins A and B 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] MA, Chun-Hui, Ting-Ting LIU, Lei YANG, Yuan-Gang ZU, Shu-Ya WANG a Rong-Rui ZHANG. Study on ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of biphenyl cyclooctene lignans from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Analytica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2011, **689**(1), 110-116 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.aca.2011.01.012. ISSN 00032670.
- [16] WALTER, Vilém. *Rozmnožování okrasných stromů a keřů*. Vyd. 2. Praha: Brázda, 1997. ISBN 80-209-0268-6.
- [17] KRESÁNEK, Jaroslav. *Atlas léčivých rostlín a lesných plodov*. 3. vyd. Martin: Osveta, 1988.
- [18] PROTIVA, Miroslav. *Pokroky ve farmacii*. Vyd. 1. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1980. *Pokroky ve farmacii*.
- [19] LEE, Hyun Jeong, In Hee CHO, Kyung Eun LEE a Young-Suk KIM. The compositions of volatiles and aroma-active compounds in dried omija fruits (*Schisandra chinensis* Baillon) according to the cultivation areas. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2011, **59**(15), 8338 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/jf200762h.
- [20] ANDO, Vladimír. *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*. 1. vyd. Hradec Králové: Svítání, 1998. ISBN 80-861-9801-4.
- [21] BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1405189767.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] BAJAJ, Gaurav a Yoon YEO. Erratum to "Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors" [*Journal of Controlled Release* 158 (2012) 386–392]. *Journal of Controlled Release*. 2012, **162**(1). DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.05.012.

- [25] SHARAMON, Shalila a Bodo J. BAGINSKI. *Schizandra: plod pěti živlů : léčivá rostlina s povzbuzujícími účinky pro dobré zdraví*. Vyd. 1. Praha: Ikar, 2011. ISBN 978-80-249-1506-7.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] JABLONSKÝ, Ivan a Jiří BAJER. *Rostliny pro posílení organismu a zdraví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 80-247-1745-X.
- [29] 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.
- [30] 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>
- [31] 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>
- [32] SLANINA, Jiří, Eva TÁBORSKÁ a Lea LOJKOVÁ. Lignans in the seeds and fruits of Schisandra chinensis cultured in Europe. Planta Media. Stuttgart - New York: Thieme Medical Publishers, 1997, **63**(3), 277-280. ISSN 0032-0943.
- [33] 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.
- [34] SLANINA, Jiří. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2000, **1994**(2), 111-116. ISSN 0009-2770.
- [35] 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.
- [36] AYRES, D.C. a J.D. LOIKE. Lignans: chemical, biological and clinical properties. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. ISBN 978-052-1065-436.

- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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>
- [40] 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.
- [41] GARRETT, R. a Charles M. GRISHAM. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Centrage Learning, 2013. ISBN 978-1-133-10629-6.
- [42] CAMPBELL, Mary K. a Shawn O. FARRELL. *Biochemistry*. 8th ed. Stamford: Cengage Learning, 2015. ISBN 978-1-285-42910-6.
- [43] 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>
- [44] ČSN ISO 10260 (75 7575). *Jakost vod: Měření biochemických ukazatelů - Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a*. Český normalizační institut, 1996.
- [45] BROWN, William Henry a Thomas POON. *Introduction to organic chemistry: international student version*. 5th ed. Hoboken: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118-32176-8.
- [46] KOTLÍKOVÁ, Silvie. *Technologie extrakce účinných látek rostlin Schisandra chinensis a Hovenia Dulcis: Pojednání k disertační práci*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2015.
- [47] 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.

- [48] SHI, Peiying, 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.
- [49] 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.
- [50] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902-8961-4.
- [51] HRAZDIRA, Ivo, Vojtěch MORNSTEIN a Jiří LECHNER. *Biofyzikální principy lékařské přístrojové techniky*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1999. ISBN 80-210-2213-2.
- [52] 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.
- [53] 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>
- [54] DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [55] 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>
- [56] RYPLOVÁ, Renata. *Fyziologie rostlin*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2014. ISBN 978-80-7394-499-5.
- [57] SARIJEVA, Gulmira, Martin KNAPP a Hartmut K. LICHTENTHALER. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of Ginkgo and Fagus. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2007, **164**(7), 950-955 [cit. 2017-05-11]. DOI: 10.1016/j.jplph.2006.09.002. ISSN 01761617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161706002550>
- [58] 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].
- [59] KINCL, Miloslav a Václav KRPEŠ. *Základy fyziologie rostlin*. 2. dopl. vyd. Ostrava: Montanex, 2000. ISBN 80-722-5041-8.

[60] RICHTER, Bruce, Brian JONES, John EZZELL a Nathan PORTER. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry* [online]. Washington: American Chemical Society, 1996, **68**(6), 1033 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1021/ac9508199. ISSN 00032700.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

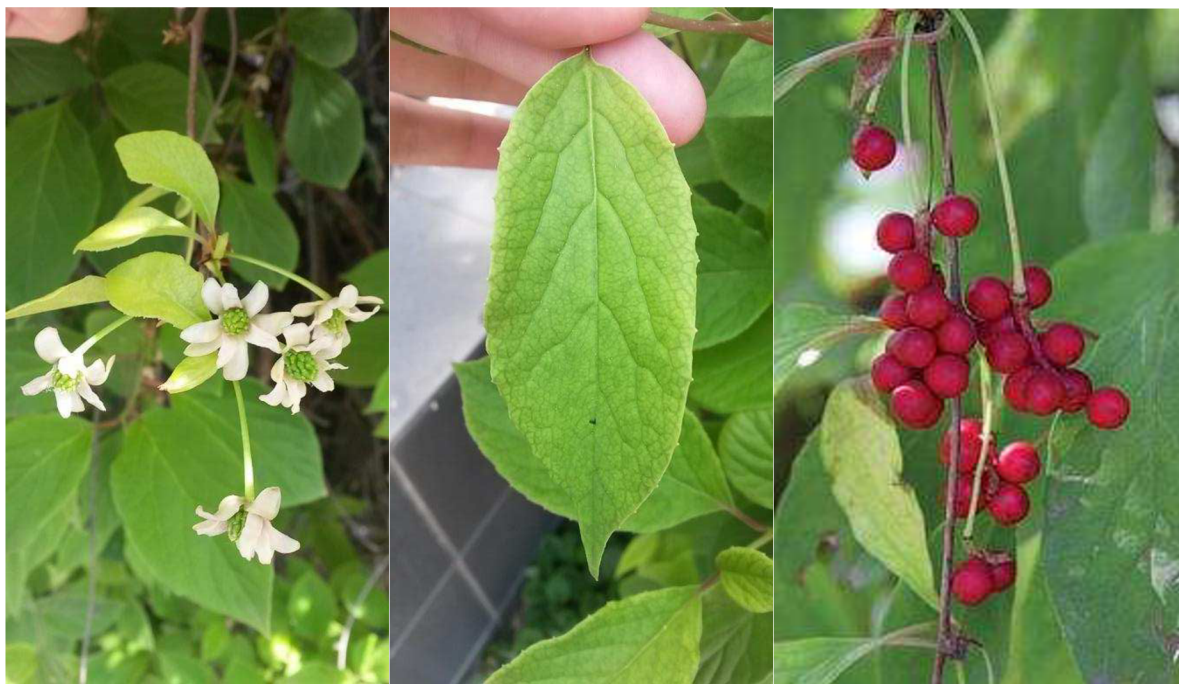
°C	stupně celsia
atd.	a tak dále
cm	centimetr
č.	číslo
d	průměr
DMAE	Dynamická mikrovlnná extrakce
g	gram
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IR	infra red, infra červený
l	výška, délka
MAE	Mikrovlnná 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 12: Fotografie celé rostliny *S. chinensis* (léto - Botanická zahrada Masarykovy univerzity, jaro – zahrada Ing. Josefa Kotlíka)



Obrázek 13: Fotografie rostliny *Schisandra chinensis* (květ, list, plody), Botanická zahrada Masarykovy univerzity