

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Možnosti identifikace rostlin chráněných CITES
v přípravcích orientální medicíny

(bakalářská práce)

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně ocitovány.“

Vanda Neradilová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především panu Ing. Jaroslavu Andrlému za odbornou pomoc, trpělivost a veškerý čas, který mi při vypracování mé bakalářské práce věnoval.

Dále bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Haně Klusoňové, Ph.D. za vstřícnou pomoc a užitečné rady.

Obsah

Shrnutí.....	6
Summary	7
Seznam zkratk	8
1 Úvod.....	9
2 CITES a Tradiční čínská medicína.....	10
2.1 CITES	10
2.2 Tradiční čínská medicína.....	12
2.2.1 Čínská fytoterapie	13
3 Orchidej <i>Bletilla striata</i> – taxonomie a botanická charakteristika	14
3.1 Orchideje (<i>Orchidaceae</i> Juss.).....	14
3.2 <i>Bletilla striata</i> (<i>Hyacinth orchid</i>)	15
3.2.1 Synonyma a klasifikace	15
3.2.2 Botanická charakteristika	15
4 Obsahové látky <i>Bletilla striata</i>	17
4.1 Obsahové látky rostlin obecně.....	17
4.1.1 Alkaloidy	17
4.1.2 Aminokyseliny	17
4.1.3 Cukry	17
4.1.4 Fosfolipidy	18
4.1.5 Fytoncidy	18
4.1.6 Glykosidy.....	18
4.1.7 Hořčiny	18
4.1.8 Hydroxykyseliny.....	19
4.1.9 Mastné kyseliny	19
4.1.10 Saponiny	19
4.1.11 Silice	19
4.1.12 Steroidy	20
4.1.13 Třísloviny.....	20
4.2 <i>Bletilla striata</i> a její obsahové látky	20
4.2.1 <i>Bletilla</i> – glukomannan	20
4.2.2 Blespirol.....	21
4.2.3 Blestriarene A	21
4.2.4 Blestriarene B	22
4.2.5 Blestriarene C	22
4.2.6 Blestrin A.....	23
4.2.7 Blestrin B	23
4.2.8 Blestrianol A	24
4.2.9 Blestrianol B	24
4.2.10 Blestrianol C	25
4.2.11 1,8-bi(4-hydroxybenzyl)-4-methoxyfenanthren-2,7-diol	25
4.2.12 Blestrin C	26
4.2.13 Blestrin D	26

4.2.14 Bletilol A.....	27
4.2.15 Bletilol B.....	27
4.2.16 Bletilol C.....	28
4.2.17 Stilbenoidy.....	29
5 Farmakologický účinek <i>Bletilla striata</i>	31
6 Laboratorní postupy analýzy	33
6.1 <i>Laboratorní postupy analýzy rostlinného materiálu.....</i>	33
6.1.1 Příprava vzorku.....	33
6.1.1.1 Extrakce	33
6.1.1.2 Homogenizace.....	34
6.1.1.3 Odstředování (centrifugace)	34
6.1.1.4 Filtrace	34
6.1.2 Fáze analytická	34
6.1.2.1 Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction - SPE).....	34
6.1.2.2 Chromatografické metody.....	35
6.1.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	38
6.1.3 Izolace a identifikace	39
6.1.3.1 Sloupcová chromatografie (CC).....	39
6.1.3.2 Infračervená spektrometrie (IR)	40
6.1.3.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	40
6.2 <i>Laboratorní postupy analýzy přípravků TCM</i>	41
6.2.1 Přípravky obsahující orchidej <i>Bletilla striata</i>	42
7 Závěr.....	43
Seznam použité literatury a zdrojů	44

Shrnutí

Tradiční čínská medicína je využívána již tisíce let a přípravky pocházejí zejména z přírodních zdrojů, z nichž některé rostlinné i živočišné druhy jsou chráněny mezinárodní úmluvou CITES, což je úmluva, která upravuje pravidla pro mezinárodní obchod s ohroženými druhy rostlin a živočichů. Mezi rostliny používané v přípravech tradiční čínské medicíny patří i orchideje, které jsou všechny zahrnuty do druhé přílohy CITES.

Rostliny obsahují řadu látek rozličné chemické povahy a struktury a plní v rostlině řadu funkcí jako např. stavební, zásobní, ale patří sem i produkty metabolismu a odpadní látky. Řada těchto látek obsažených v rostlinách našla uplatnění v medicíně jako léčivé látky. Tyto látky jsou podrobeny analýze, kdy se zjišťuje chemická povaha látek a jejich přibližná struktura. K tomu se využívá řada analytických metod, zejména separačních, které slouží ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení. Jsou to hlavně chromatografické metody a jejich kombinace s hmotnostní spektrometrií. Potom následuje izolace těchto látek a potvrzení jejich přesné chemické struktury, k čemuž se využívá nukleární magnetické rezonance a infračervené spektrometrie. Jsou-li látky izolovány a je určena jejich přesná chemická struktura, následují studie a zkoumání jejich účinku nejprve na zvířatech a buněčných kulturách. Poté se vyberou látky s nejlepšími výsledky a zkouší se buď přímo, nebo po částečné úpravě jejich molekul jako lék vhodný pro lidi. Jakmile jsou účinky jednotlivých látek ověřeny studiemi, je díky znalosti jejich přesné chemické struktury možné je připravit chemicky v čistém stavu a využít je tak pro přípravu léčiv.

Pokud víme jaké specifické látky rostlina obsahuje, můžeme stejným způsobem získat látky z rostliny, která není chráněná, ale bývá s chráněnou zaměňována. Díky tomu zjistíme jak se tyto rostliny liší v přítomnosti obsahových látek. Po analýze konkrétního přípravku můžeme říci, zda chráněnou rostlinu skutečně obsahuje nebo jestli obsahuje rostlinu nechráněnou, případně jestli obsahuje obě. Rostlinné přípravky obsahují také řadu doplňujících látek, které je nutno před analýzou odstranit.

Summary

Traditional Chinese medicine has been used for thousands of years, and these products come mainly from natural sources. Some of these plant and animal species are protected by international convention CITES. These Conventions which govern the rules of the international trade of endangered species of flora and fauna. Plants used in traditional Chinese medicine include orchids, which are all included in the second CITES Appendix.

Plants contain a number of different chemical structures and perform many functions such as building stock and produce metabolism and waste products. Many of these substances in plants are used in medicine as a medicinal substance. These substances are analyzed, which identifies the chemical nature of each substance and its approximate structure. They are used in a number of analytical methods, including separation, which is also used for qualitative and quantitative determination.

They are mainly chromatographic methods and their combination with mass spectrometry. This is followed by the isolation of these substances and confirms their exact chemical structure, which uses nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy. They are isolated and if the substance is determined, their exact chemical structure is followed by a study examining the effect. The first on animals and cell cultures. Then the selected compound with the best results is used directly or after a partial revision of the molecule as a suitable drug for humans. Once the effect of an individual substance is verified there exact chemical structures can be chemically prepared in a clean condition and used for the preparation of pharmaceuticals.

When we know what specific substances the plant contains we can get substances the same way from the plant which is not protected but often is with protected plants interchanged. Thanks to this discovery of how these plants differ in the presence of content. After analysis of specific product, we can say whether the product actually contains a protected or unprotected plant or even both. Herbal preparations contain a number of additional substances which must be removed before analysis.

Seznam zkratek

CC	Sloupcová chromatografie
CITES	The convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora
EU	Evropská unie
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
IL	Interleukin
IR	Infračervená (infrared)
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
SPE	Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraktion)
TCM	Tradiční čínská medicína
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TNF	Tumor nekrotizující faktor
UV	ultrafialová (ultraviolet)
W.H.O.	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1 Úvod

Stále více se setkáváme s alternativními metodami používanými pro léčebné účely. Jednou z nejvýznamnějších oblastí, která tyto alternativní přístupy inspiruje, jsou léčebné tradice kultur Orientu, mezi nimiž zaujímá nejvýznamnější postavení Tradiční Čínská Medicína (TCM). Tisíciletá historie TCM dokazuje účelnost jejího používání nejen v Číně, ale i na celém světě (1). Podle výzkumu Světové zdravotnické organizace (W.H.O) přibližně 80% lidské populace spoléhá na tradiční medicínu založenou na využití živočichů a rostlin (2).

S nárůstem spotřeby produktů tradiční medicíny a získávání druhů fauny i flóry pro obchodní účely, vzniká problém možného vyhubení populací volně žijících živočišných i rostlinných druhů. Ochranou ohrožených druhů a kontrolou mezinárodního obchodu s těmito druhy se zabývá mezinárodní úmluva CITES.

2 CITES a Tradiční čínská medicína

2.1 CITES

CITES - the **C**onvention on **I**nternational **T**rade in **E**ndangered **S**pecies of Wild **F**auna and **F**lora, je oficiálně používaná zkratka pro Úmluvu o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (dále jen úmluva).

Úmluva upravuje pravidla pro mezinárodní obchod s ohroženými druhy fauny a flóry, který je jednou z hlavních příčin vymírání stále většího počtu volně žijících druhů. Je realizována v jednotlivých členských zemích, jejichž počet k dnešnímu dni činí celkem 172, prostřednictvím k tomu zmocněných úřadů, tzv. výkonných, vědeckých a kontrolních orgánů (3)

CITES v současné době zahrnuje asi 5 000 druhů živočichů a 28 000 druhů rostlin celého světa. Jsou zavedeny tři režimy ochrany, podle nichž rozdělujeme tři přílohy:

Příloha CITES I: obsahuje druhy, které jsou bezprostředně ohroženy vyhubením. Mezinárodní obchod s těmito druhy je zakázán (zákaz dovozu a vývozu) a je povolován jen výjimečně.

Příloha CITES II: obsahuje druhy, které by mohly být ohroženy vyhubením, pokud by obchod s nimi nebyl přísně regulován. Mezinárodní obchod je povolen pouze na základě zvláštních povolení (tzv. permity CITES), které musí být předloženy celním orgánům jak při vývozu tak i dovozu. V této příloze jsou zařazeny i celé skupiny živočichů a rostlin, jako např. primáti, papoušci, kaktusy či **orchideje** (3).

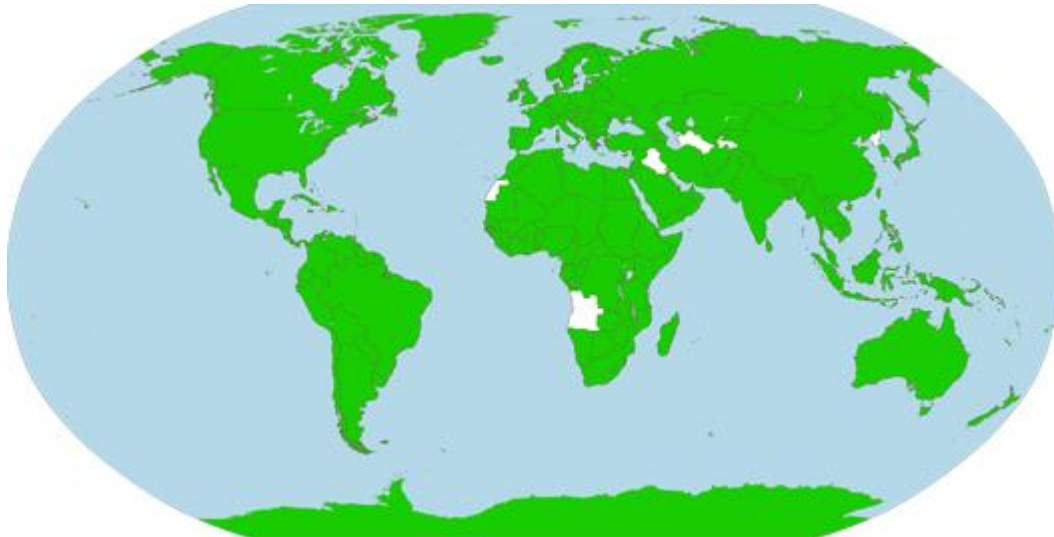
Příloha CITES III: obsahuje druhy, které jsou ohroženy mezinárodním obchodem pouze v určitých zemích a jsou chráněny na návrh těchto zemí. Pro exempláře pocházející z těchto zemí je třeba celním orgánům předložit exportní povolení výkonného orgánu vyvážející země. V ostatních případech musí obchodník předložit potvrzení o původu exempláře (3).

V praxi CITES funguje tak, že druhy chráněné úmluvou nemohou být převáženy přes hranice bez speciálního povolení („permity“), které vydávají výkonné orgány obou zemí (tedy země vývozu i dovozu) (4).

Vytvořená celosvětová síť kontroluje mezinárodní obchod ohroženými druhy CITES, a to zejména pomocí povolení, tzv. CITES permitů, která musí doprovázet každou mezinárodní zásilku exemplářů CITES - např. i dovoz a vývoz suvenýrů, výrobků - preparované aligátoří hlavy z USA, kabelky, pásky z krokodýlí kůže, výrobky tradiční čínské medicíny obsahující např. extrakty z částí těl živočichů či rostlin chráněných dle CITES (3).

V České republice je výkonným orgánem s vrcholnou působností Ministerstvo životního prostředí ČR a vědeckým orgánem CITES s celostátní působností Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Funkci kontrolního orgánu zastává Česká inspekce životního prostředí. Regionálními výkonnými orgány se staly po vstupu ČR do EU také krajské úřady, správy chráněných krajinných oblastí a správy národních parků (3).

Úmluva byla podepsána 3. března 1973 a vstoupila v platnost 1. 7. 1975. Česká republika přistoupila k této úmluvě 25. srpna 1992 ještě jako ČSFR. V platnost úmluva vstoupila 1. 1. 1993. Před vstupem do Evropské unie byla úmluva součástí zákona 114/1992 Sb. Po vstupu České republiky do EU se postupuje podle předpisů Evropského společenství, které do naší legislativy zavádí zákon č. 100/2004 Sb. (4).



Obr. 1: Zeleně jsou označeny členské státy úmluvy CITES.

Povolení k vývozu a dovozu exemplářů přes vnější hranice EU (CITES permity) vydává pro české subjekty Ministerstvo životního prostředí (s některými výjimkami, jako např. při vývozu uměle vypěstovaných rostlin, kdy lze namísto CITES permitů použít rostlinolékařská osvědčení vydávaná Státní rostlinolékařskou správou) (5).

Podle nařízení Rady ES č. 338/97 platí pro dovoz exemplářů z přílohy B přísnější ustanovení než podle CITES, a sice povinnost mít předem dovozní povolení příslušného výkonného orgánu EU. Nařízení Rady ES č. 338/97 zmocňuje Evropskou komisi k vyhlášení omezení dovozu exemplářů druhů z přílohy B buď obecně, anebo pro určitý typ exemplářů nebo z určitých zemí, a to v případech, kdy vědecké orgány EU usoudí, že by dovoz do EU mohl být v rozporu s ochranou přírody. Seznam druhů, pro něž platí tento dočasný zákaz dovozu do EU, se často mění a dnes je již značně rozsáhlý. Takové exempláře se nesmějí do EU dovážet ani v případě, že úmluva CITES takový obchod umožňuje a příslušné orgány třetích zemí vývoz povolí (5).

2.2 Tradiční čínská medicína

Tradiční čínská medicína provází lidstvo již několik tisíc let. Díky své geografické poloze se čínská civilizace vyvíjela po stovky generací izolovaně a vytvořila si v mnoha směrech naprosto unikátní pohled na člověka v kontextu s přírodou (6).

Teoretickým východiskem čínské medicíny je taoistické učení o yin a yang, které určovalo smýšlení starých Číňanů už od pradávných časů. Yin a yang jsou podstatou životní energie qi (čchi). Yang představuje mužský, aktivní princip vesmíru. Je vnitřní hybnou silou a funkcí věcí, oživuje je a uděluje jim dynamiku. Yin je ženským, pasivním principem světa. Je více hmotné povahy, zahušťováním dává věcem viditelnou podobu, vyživuje je a poskytuje jim stabilitu. Yang v sobě obsahuje neoddělitelný zárodek yin a naopak (7).



Obr. 2: Symbol yin a yang

Původně jednotná životní energie qi se začíná postupně diferencovat. Toto rozvrstvení představuje tzv. pět prvků. Jde o dřevo, oheň, zem, kov a vodu. V člověku ztělesněním pěti prvků je pět orgánů: játra, srdce, slezina, plíce a ledviny.

Podle tradičních čínských názorů jsou vztahy mezi vnitřními orgány a povrchem těla, lépe řečeno jeho určitými oblastmi, tzv. akupunkturními body. Pokud byla

jakýmkoli způsobem narušena funkce správného toku energie, a tím způsobena porucha funkce orgánu, lze ji upravit podrážděním odpovídajících akupunkturních bodů, a tím navodit znovu stav zdraví (8).

2.2.1 Čínská fytoterapie

Využívání rostlin v lékařství je patrně stejně staré jako lidstvo samo a léčivé rostliny pomáhají lidem různých kultur na celém světě. V Číně tvoří fytoterapie podstatnou část tradiční medicíny.

Herbální léčba v Číně nikdy nebyla založena pouze na prostém vztahu: poznání účinku – použití. Naopak, představuje již odedávna složitý a propracovaný systém, v němž jsou tisíce rostlin roztrženy podle určitých kritérií souvisejících s teoretickými základy čínské medicíny. Pochopení a zvládnutí základní teorie čínské medicíny je tudíž klíčem i k praktické aplikaci rostlinné léčby (7).

Čínská fytoterapie je založena na odlišných principech než fytoterapie západní. Je nutné sledovat kvalitu energie byliny. Podle povahy dělí rostlinná léčiva na horké, chladné, svěží a teplé. Dále se rozlišuje pět chutí kyselá, hořká, sladká, ostrá a slaná.

Podle směru pohybu rozlišujeme rostlinná léčiva s tendencí k stoupání vzhůru, poklesu, pohybu směrem k povrchu nebo do hloubky. Další významnou vlastností je vazba na určitý meridián (meridián = energetická duchovní dráha uvnitř těla živých tvorů), zvaná tropizmus nebo také přijímající meridián (7).

Problematika je mnohem složitější, ale její podrobný popis by byl nad rámec tohoto textu.

3 Orchidej *Bletilla striata* – taxonomie a botanická charakteristika

3.1 Orchideje (*Orchidaceae* Juss.)

Je čeleď jednoděložných rostlin z řádu vstavačotvaré (*Orchidales*). Některé systémy řadí čeleď vstavačovité (*Orchidaceae*) do řádu chřestotvaré (*Asparagales*). Vstavačovité jsou vytrvalé byliny původem především z vlhkých tropických oblastí, kde obývají hlavně stromová patra tropických pralesů. V mírném pásu jsou to běžně pozemní rostliny. Některé druhy jsou nezelené a vyživují se saprofytický, 2 druhy jsou dokonce podzemní (9) (10).

Orchideje jsou jednodomé s oboupohlavními květy. Květy orchidejí mohou být samostatné, ale obvykle to jsou klasovitá, latovitá či hroznovitá květenství. Okvětí tvoří zpravidla 6 okvětních lístků ve 2 přeslenech, rozlišeny na kalich a korunu, volné nebo na bázi srostlé (10) (11).

Tyčinky jsou 3, ale většinou bývají srostlé s čnělkou v 1 útvar, který se nazývá sloupek (*gynostemium*). Plod je zpravidla suchý, vzácně dužnatý, většinou pukavý, vzácně nepukavý, převážně tobolka, vzácně bobule. Embryo je slabě diferenciované, semena jsou nedokonalá. Rostlina se totiž v počátečním vývoji vyživuje heterotrofně s pomocí určitého druhu houby (9).

Listy jsou někdy nahromaděny na bázi, jsou jednoduché, řapíkaté nebo přisedlé, s listovými pochvami. Čepele listů jsou celokrajné, ploché či žlábkovité nebo svinuté, někdy jsou dokonce kožovité nebo dužnaté, kopinaté, podlouhlé až vejčité, žilnatina souběžná (9).

3.2 *Bletilla striata* (Hyacinth orchid)

Bletilla striata je uvedena, stejně jako všechny ostatní orchideje, ve druhé příloze úmluvy CITES (12). Rostlina pochází z Číny, ale je rozšířena také v Japonsku, na Taiwanu a ve Vietnamu. V dnešní době se pěstuje, jako okrasná rostlina, po celém světě.

3.2.1 Synonyma a klasifikace

Synonyma

Latinský název:	<i>Limodorum striatum</i>
Farmaceutický název:	Rhizoma Bletillae (Striatae)
Čína:	BAI JI (baj ti), 白芨
Japonsko:	Byakukyu, シラン
Korea:	Paekkup,
Anglie:	Bletilla Rhizome, Hyacinth bletilla

Klasifikace

Oddělení:	Rostliny krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	Rostliny jednoděložné (<i>Liliopsida, monocots</i>)
Řád:	Chřestotvaré (<i>Asparagales</i>)
Čeleď:	Vstavačovité (<i>Orchidaceae</i>)
Podčeleď:	<i>Epidendroideae</i>
Rod:	<i>Arethuseae</i>
Podrod:	<i>Bletiinae</i>

3.2.2 Botanická charakteristika

Bletilla striata je nízká trvalka s pozemní hlízou. Dorůstá do výšky 20 až 60 cm, listy vyrůstající z pseudocibulí jsou dlouhé asi 40 cm, celokrajné, protáhle oválné a podélně rýhované. Květy výrazně fuchsiově purpurové až levandulově růžové, měří 4-5 cm a vyrůstají na krátkém stonku v množství 6-12 květů. Jejich tvar je typicky orchidejovitý s 5 zadními užšími plátkami a nápadně řaseným a vybarveným hrdlem uprostřed (13).



Obr. 3: *Bletilla striata*

B. striata, stejně jako všechny orchideje má složitý mechanismus pro opylení. U orchidejí nejsou pylová zrna samostatná, ale tvoří tzv. pollinium (tělísko tvořené slepenými pylovými zrny v prašníku). *B. striata* má čtyři pollinia na prašníku a u rodu *Arethuseae* jsou popsána jako měkká a těstovitá, na rozdíl od pevného pollinia nalézajícího se u většiny rodů. Orchideje se kdysi nazývaly *Microspermae*, protože mají tzv. mikro semena. Semena jsou tak malá, protože i embryo je velice malé. *B. striata* je zvláště zajímavá díky embryu se zárodečnou, vaskularizovanou dělohou. Je jedním z pouhých deseti druhů (mezi téměř 30 000 druhy orchidejí), které mají tuto vlastnost. Většině orchidejí chybí gymnosperm v semeni, ale v *Bletille* některé endospermální buňky přetrvávají. Má také zajímavou tobolku, která je rozdělena podélně na šest řádků (14) (15). Hlízy se podobají rohu nebo drápu, jsou šedavě bílé, mají tvrdou strukturu a jsou nesnadno zlomitelné (16).

4 Obsahové látky *Bletilla striata*

4.1 Obsahové látky rostlin obecně

V rostlinách můžeme najít různé látky, které plní rozličné úlohy. Rostliny vytváří obsahové látky proto, aby zajistily homeostázu svého vnitřního prostředí. Tyto látky mají zejména stavební funkci, funkci energetických rezerv, dále jsou to produkty metabolismu rostlin a odpadní látky. Obvykle jsou obsaženy v malém množství a nachází se v různých částech rostlin. Bývají také specifické pro různé rostlinné taxony, např. pro rostlinné čeledi. Některé z nich mají také význam pro lidský organismus jako léčiva. Jedná se například o následující skupiny látek.

4.1.1 Alkaloidy

Jejich molekuly mají značně různorodou strukturu, s jedním společným znakem, a tím je přítomnost dusíku, většinou heterocyklicky vázaného. Ten dodává alkaloidům zásaditý charakter, a proto tyto sloučeniny tvoří nejčastěji soli s organickými kyselinami. Alkaloidy jsou odpadním produktem metabolismu aminokyselin. Pro člověka jsou většinou jedovaté, proto se rostliny s vyšším obsahem alkaloidů ve fytoterapii nepoužívají (7) (17).

4.1.2 Aminokyseliny

Představují základní stavební jednotku bílkovin. Jsou přítomny ve všech rostlinách. Nejjednodušší aminokyselina je glycin. Některé aminokyseliny jsou pro člověka nepostradatelné a lidské tělo je nedokáže vytvořit, jedná se o esenciální aminokyseliny a jejich zdrojem jsou mnohé rostliny (7) (17).

4.1.3 Cukry

Jsou produkty fotosyntézy . Patří k běžným součástem rostlinného těla. Jednoduché cukry jsou zdroje energie a další, složitější, tzv. polysacharidy jsou stavební a zásobní látky. Pro člověka slouží cukry jako zdroj energie a polysacharid celulóza je

důležitý pro správnou funkci zažívacího traktu. Další polysacharidy, ve vodě bobtnající slizy a pektiny jsou již po staletí součástí léčebných prostředků (7) (17).

4.1.4 Fosfolipidy

Jsou to tukům podobné látky, které mají v molekule kyselinu fosforečnou. Nejznámější zástupci jsou lecitiny. Snižují hladinu cholesterolu a působí preventivně proti ateroskleróze (7) (17).

4.1.5 Fytoncidy

Chemicky značně nejednotná skupina látek. Společným znakem je zamezování růstu bakterií (7) (17).

4.1.6 Glykosidy

Patří k rostlinným stavebním látkám a vznikají vazbou cukerné složky se složkou necukernou (aglykonem). Aglykony zahrnují pestrou paletu látek, které se značně liší stavbou molekuly a účinkem na lidský organismus. Jedná se například o:

Glykosidy srdeční obsahující steroidní aglykony, které zvyšují srdeční výkon a ve větších dávkách jsou jedovaté.

Glykosidy flavonoidní i volné aglykony, které jsou v rostlinné říši značně rozšířeny a jsou často nazývány bioflavonoidy a příznivě ovlivňují zejména funkci cév. Flavonoidy bývají obvykle v květech a nadzemních částech rostlin.

Glykosidy kumarinové a kumarinové deriváty. Chemickou strukturu můžeme odvodit od chromanu. Kumarin se nachází v rostlinách ve formě glykosidicky vázaných kyselin, z nichž se uvolňuje během sušení.

Anthraglykosidy, jejich aglykony můžeme odvodit od antrachinonu. Slouží především jako projímadla (7) (17).

4.1.7 Hořčiny

Představují různorodé látky, které se vyznačují hořkou chutí. Problém je však v tom, že hořce chutnají také toxické alkaloidy. Proto se pojem hořčina zužuje většinou pouze na některé iridoidní látky. Hořčiny mají povzbuzující účinek na zažívací trakt, vyvolávají zvýšené vylučování žaludečních šťáv a žluči (7) (17).

4.1.8 Hydroxykyseliny

Patří mezi nejběžnější látky v rostlinách. Jsou obsaženy především v nezralém ovoci. V rostlinách jsou přítomny také jejich soli s kovy nebo alkaloidy. Vyrovnávají vnitřní tlak buněk a tím vlastně usměrňují propustnost vody buněčnými membránami rostlin. Terapeuticky působí různorodě a mají často mírně projímavý účinek (7) (17).

4.1.9 Mastné kyseliny

Patří mezi jednoduché organické kyseliny, běžně se vyskytující v rostlinách. Kyselina palmitová a stearová tvoří estery s glycerolem, které jsou základem většiny rostlinných tuků a olejů. V rostlinách se oleje vyskytují hlavně v semenech, kde tvoří energetickou rezervu. Na rozdíl od živočišných olejů, rostlinné neobsahují cholesterol. Léčebně se využívají jako maziva nebo pro rozpouštění jiných léčiv (7) (17).

4.1.10 Saponiny

Jsou významné látky patřící mezi glykosidy. Aglykony jsou tvořeny hlavně triterpenoidními látkami nebo steroidy. Od ostatních glykosidů se odlišují schopností snižovat povrchové napětí tekutin. Při mísení tekutin, které za běžných podmínek mísit nejde, vznikne v přítomnosti saponinu mléčně zbarvená emulze. Jsou-li saponiny přítomny ve vodě, po protřepání se projeví vznikem pěny. Pokud vniknou saponiny do krevního oběhu, způsobují poškození červených krvinek (hemolýzu). Varem se většina saponinů rozkládá a ztrácí tak toxické účinky. Na lidský organismus působí většinou příznivě. Některé usnadňují odkašlávání, jiné mají tonizační vlastnosti (7) (17).

4.1.11 Silice

Jsou to směsi těkavých látek, které se uvolňují z různých rostlinných částí a propůjčují rostlinám jejich charakteristickou vůni. Soustřeďují se hlavně v květu a lákají hmyzí opylovače. Obsahové látky silic patří především mezi terpeny a fenylypropany. Účinky jsou značně různorodé, dezinfikují, uvolňují střevní plyny, zvyšují vylučování trávicích šťáv (7) (17).

4.1.12 Steroidy

Odvozují se od uhlovodíku steranu. V rostlinách se vyskytují steroidní alkoholy velmi podobné cholesterolu. Bylo zjištěno, že omezují vstřebávání cholesterolu a zasahují do metabolismu steroidních látek. Zajímavými steroidními látkami jsou ekdysteroidy, vyznačující se tonizačními a adaptogenními účinky na člověka i zvířata (7) (17).

4.1.13 Třísloviny

Jsou častými obsahovými látkami rostlin. Jejich molekuly se skládají z několika fenolických jednotek. Chutnají trpce, ve vodě se rozpouštějí, ale s bílkovinami tvoří nerozpustné sloučeniny. V medicíně se využívají při krvácení, spáleninách, zánětech apod. (7) (17).

4.2 *Bletilla striata* a její obsahové látky

Obsahovými látkami z *Bletilla striata* se nejvíce zabývali Yamaki et al. a Bai et al. a tyto studie byly provedeny v letech 1989 - 1993. Z hlíz *B. striata* bylo izolováno několik základních látek patřících především do skupiny fenanthrenů se spirolaktonovým kruhem, stilbenoidů, bifenantrenů a etherů bifenantrenů. Jsou to např. blespirol, blestrianol A, B a C, blestriarene A, B a C, batatasin III, 3'-O-methyl batatasin III, blestrin A, B, C a D (18).

Obsahové látky jsou v této kapitole seřazeny podle roku, kdy byly izolovány.

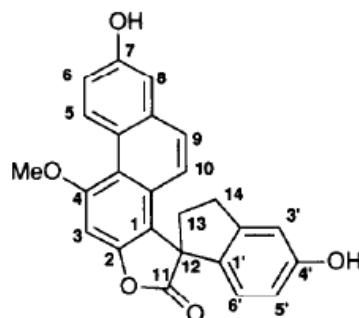
4.2.1 *Bletilla* – glukomannan

Je mukózní polysacharid získaný z hlíz *B. striata* v roce 1973 (Tomoda et al.). Hlízy byly extrahovány s horkým methanolem a část s horkou vodou. Surové muciny byly ve vodě sraženy přidáním methanolu. Roztok sraženiny byl poté aplikován na sloupec celulózy a mucinózní polysacharid byl získán z výluhu s vodou. Polysacharidy jeví negativní specifickou otáčivost $[\alpha]_D - 31,6^\circ$. Součásti cukru, manóza a glukóza, byly identifikovány pomocí tenkovrstvé chromatografie z vodného roztoku a pomocí plynové chromatografie z methanového roztoku. Kvantitativní stanovení udává poměr manózy a glukózy 3:1. Studie prokázaly, že *Bletilla* - glukomannan je složený

z aldohexózových zbytků spojených vazbou 1 → 4, což bylo potvrzeno výsledky kyselé hydrolyzy, při které nebyly zjištěny žádné vazby 1 → 3 ani 1 → 6 (19).

4.2.2 Blespirol

2,3-dihydro-5,7'-dihydroxy-10'-methoxyspiro[1H-inden-1,3'-(2'H)-fenantro[2,1-b]furan]-2'-on. Jako první tuto látku izoloval Yamaki et al. v roce 1989. Blespirol při infračervené spektroskopii (IR spektroskopii) jeví absorpci při 3250 cm⁻¹ (OH), 1770 cm⁻¹ (karbonyl), 1610 cm⁻¹, 1580 cm⁻¹ a 1450 cm⁻¹ (benzenoidy). Při hmotnostní spektrometrii byla získána data poměru hmotnosti *m* ku náboji *z* *m/z* 398 (C₂₅H₁₈O₅) a signifikantní pík o *m/z* 370 [M-CO]⁺. Struktura byla potvrzena nukleární magnetickou rezonancí (NMR). Samotná spektrální data nemohou přesně určit strukturu, proto byla provedena ještě X-paprsková analýza a tím struktura jednoznačně určena. Blespirol je díky C-12 racemát a nejeví tak optickou otáčivost (20).

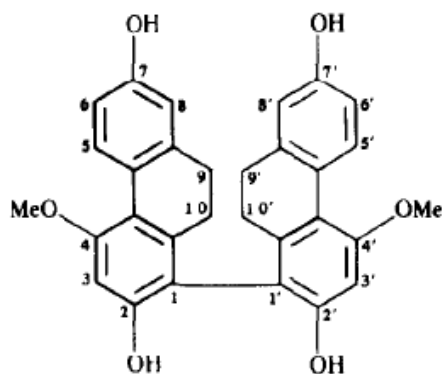


Obr. 4: blespirol

4.2.3 Blestriarene A

4,4'-dimethoxy-9,9',10,10'-tetrahydro-[1,1'-bifenanthren]-2,2',7,7'-tetrol.

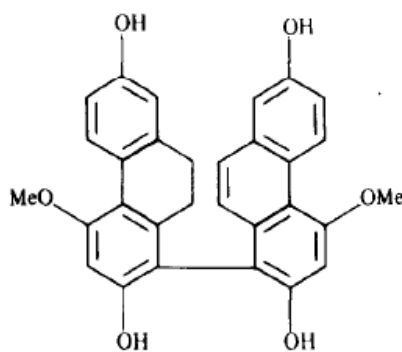
Byl izolován Yamaki et al. (1989) jako bezbarvé jehličky, bodu tání 194 – 195 °C, s úhlem optické otáčivosti [α]_D 5,1° a dává pozitivní reakci s chloridem železitým a zelenavě-modrou barvu s kyselinou sírovou. UV spektrum jeví absorpční maxima při 273 nm, 283 nm a 300 nm. IR spektrum dává absorpci 3200 cm⁻¹ (OH), 1570 cm⁻¹ a 1440 cm⁻¹ (benzenoidy). Hmotnostní spektrum dává signál *m/z* 482 a signifikantní pík při *m/z* 241 (C₁₅H₁₃O₃). NMR spektrum potvrzuje dimerickou strukturu se symetrickou vazbou dihydrofenantrenů (21).



Obr. 5: blestriarene A

4.2.4 Blestriarene B

4,4'-dimethoxy-9,10-dihydro-[1,1'-bifenantren]-2,2',7,7'-tetrol. Byl Yamaki et al. izolován v roce 1989 jako bezbarvý prášek, bodu tání 313 – 316 °C, s úhlem optické otáčivosti $[\alpha]_D 3,2^\circ$ a dává pozitivní reakci s chloridem železitým a zelenavě-modrou barvu s kyselinou sírovou. UV spektrum poskytuje absorpční maxima při 266 nm, 290 nm a 312 nm. IR spektrum jeví absorpci při 3280 cm^{-1} (OH), 1570 cm^{-1} a 1440 cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum dává m/z 480 ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_6$) a signifikantní pik m/z 240. Struktura blestriarene B byla potvrzena pomocí NMR (21).

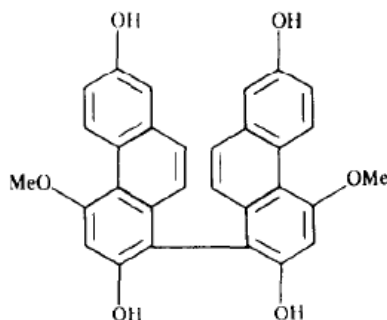


Obr. 6: blestriarene B

4.2.5 Blestriarene C

4,4'-dimethoxy-[1,1'-bifenantren]-2,2',7,7'-tetrol Izolovaný Yamaki et al. (1989) jako žluté jehličky, bodu tání 331 – 334 °C, s úhlem optické otáčivosti $[\alpha]_D 16,7^\circ$ a dává pozitivní reakci s chloridem železitým a fialovou barvu s kyselinou

sírovou. UV spektrum je velmi podobné s blestriarenem B, stejně tak i IR spektrum. Hmotnostní spektrum dává m/z 478 ($C_{30}H_{22}O_6$). NMR spektrum jeví signály založené na symetrické vazbě dimeru fenanthrenů a byla jím potvrzena konečná struktura (21).



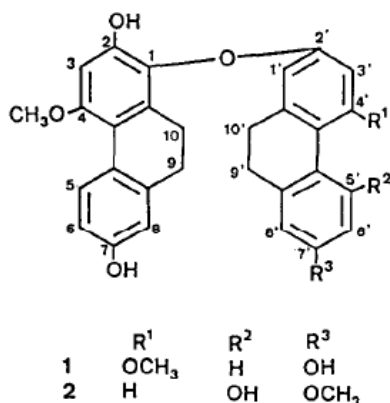
Obr. 7: blestriarene C

4.2.6 Blestrin A

Bai et al. jej izolovali v roce 1989. Jeví UV absorpční maxima při 272 nm, 281 nm a 299 nm. IR spektrum dává absorpci při 3200 cm^{-1} (OH), 1590 cm^{-1} a 1440 cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum poskytuje m/z 482 ($C_{30}H_{26}O_6$) a signifikantní píky při m/z 241 a 242. NMR spektrum dává signály pro 2 methoxylové skupiny a celkový počet methoxylových a hydroxylových skupin byl 5 a zbývající kyslík tak byl zjištěn jako součást etherové skupiny (22).

4.2.7 Blestrin B

Byl izolován Bai et al. (1989). Jeho spektrální data byla velmi podobná blestrinu A. Od blestrinu A se liší substituční strukturou a funkčními skupinami. NMR spektrum triacetátu jeví signály pro 9 aromatických protonů, 4 signály byly přiděleny na H-3, H-5, H-6 a H-8 (22).

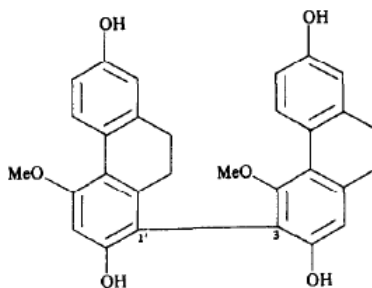


Obr. 8: 1 – blestrin A, 2 – blestrin B

4.2.8 Blestrianol A

4,4'-dimethoxy-9,9',10,10'-tetrahydro-[1',3-bifenanthren]-2,2',7,7'-tetrol.

Izoloval ho v roce 1990 Bai et al. při rozpouštění hlíz *B. striata* v ethylacetátovém rozpouštědle. Při UV spektroskopii jeví maxima při 276 nm a 285 nm a IR spektrum dává absorpci 3250 cm⁻¹ (OH), 1585 cm⁻¹ a 1420 cm⁻¹ (benzenoidy). Hmotnostní spektrometrii byly získány hodnoty *m/z* 482 (C₃₀H₂₆O₆) a signifikantní pík při *m/z* 241 (C₁₅H₁₃O₃), což značí, že blestrianol A je bisdihydrofenanthren. K potvrzení struktury byla provedena NMR (23).



Obr. 9: blestrianol A

4.2.9 Blestrianol B

4',5-dimethoxy-8-(4-hydroxybenzyl)-9,9',10,10'-tetrahydro-[1',3-

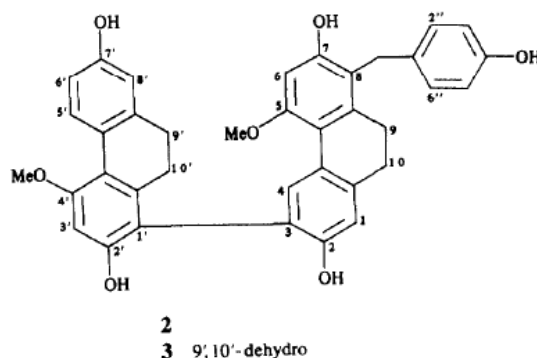
bifenanthren]-2,2',7,7'-tetraol. Byl izolován Bai et al. v roce 1990. UV maxima má při 283 nm a 304 nm. IR spektrum vykazuje absorpce 3200 cm⁻¹ (OH), 1590 cm⁻¹ a 1420

cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum dává m/z 588 ($\text{C}_{37}\text{H}_{32}\text{O}_7$) a signifikantní pík při m/z 482 vyplývající ze ztráty hydroxybenzylové skupiny a předpokládaná sloučenina může být bisdihydrofenanthren mající hydroxybenzylovou skupinu. NMR spektrum potvrdilo strukturu sloučeniny (23).

4.2.10 Blestrianol C

4',5-dimethoxy-8-(4-hydroxybenzyl)-9,10-dihydro-[1',3-bifenanthren]-

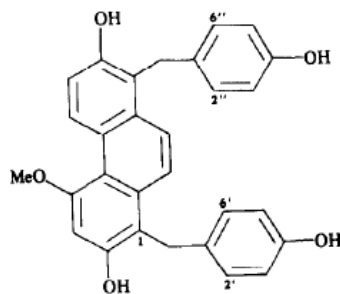
2,2',7,7'-tetraol. Byl izolován Bai et al.(1990) spolu s blestrianolem A a B. Blestrianol C jeví UV maxima při 266 nm a 312 nm. IR spektrum prokazuje absorpci 3200 cm^{-1} (OH), 1590 cm^{-1} a 1420 cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum má m/z 586 ($\text{C}_{37}\text{H}_{30}\text{O}_7$), navrhuje tak přítomnost fenanthrenu a dále má signifikantní pík m/z 107 ($\text{C}_7\text{H}_7\text{O}^+$), odpovídající hydroxytryptyllovému iontu. NMR bylo podobné blestrianolu B (23).



Obr.10: **2** – blestrianol B, **3** - blestrianol C

4.2.11 1,8-bi(4-hydroxybenzyl)-4-methoxyfenanthren-2,7-diol

V roce 1990 Bai et al. dále izolovali z hlíz při ethylacetátovém rozpouštění za vzniku methanolického extraktu látku s UV maximy o 268 nm, 277 nm, 288 nm a 320 nm. IR absorpci 3200 cm^{-1} (OH), 1590 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} a 1420 cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum jeví m/z 452 ($\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{O}_5$) a signifikantní píky o m/z 346 a 240 (23).



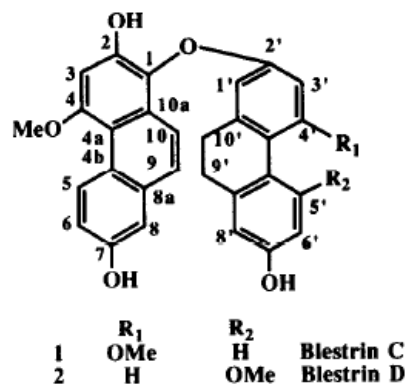
Obr. 11: 1,8-bi(4-hydroxybenzyl)-4-methoxyfenanthren-2,7-diol

4.2.12 Blestrin C

Byl izolován v roce 1992 Yamaki et al. jako žluté krystalky a jeví absorpční maxima při 235 nm a 263 nm. IR spektrum poskytuje píky o 3250 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} . Hmotnostní spektrum dává m/z 480 ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_6$) a signifikantní píky m/z 240 a 226 díky štěpení etherové vazby mezi fenanthrenovou a dihydrofenanthrenovou polovinou. NMR spektrum udává signály pro 2 methoxylové skupiny a celkový počet kyslíků v methoxylových a hydroxylových skupinách byl určen na 5 a zbývající kyslík, je v etherové skupině. K potvrzení struktury byl blestrin C podroben X-paprskové analýze a bylo tak potvrzeno, že etherová vazba je mezi C-1 a C-2'. Fenanthrenový a 9,10-dihydrofenanthrenový kruh jsou spojeny dohromady svisle, prostřednictvím kyslíku a dihedrální úhel mezi jejich rovinami je 83° (24).

4.2.13 Blestrin D

V roce 1992 byl izolován Yamaki et al. a získán jako žlutý prášek a vykazuje absorpční maxima při 235 nm a 263 nm, podobně jako u blestrinu C. IR spektrum dává píky při 3150 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} a 1210 cm^{-1} . Hmotnostní spektrum poskytuje data m/z 480 ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_6$) a signifikantní píky m/z 242 a 226 díky štěpení etherové vazby mezi fenanthrenovou a dihydrofenanthrenovou polovinou. NMR spektrum jeví signály díky 2 methoxylovým skupinám a 11 aromatickým protonům (24).



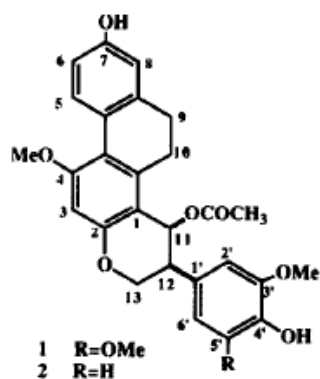
Obr. 12: 1 – blestrin C, 2 – Blestrin D

4.2.14 Bletilol A

4-acetoxy-11-methoxy-3(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-fenantro[2,1-b]-pyran-8-ol. Byl izolován Yamaki et al. (1992). UV absorbní maxima jsou 284 nm, 305 nm a 320 nm. IR spektrum vykazuje absorpci při 3300 cm⁻¹ (OH), 1710 cm⁻¹ (karbonyl), 1600 cm⁻¹ a 1420 cm⁻¹ (benzenoidy). Hmotnostní spektrum dává *m/z* 492 a signifikantní pík při *m/z* 432. Struktura byla potvrzena NMR (25).

4.2.15 Bletilol B

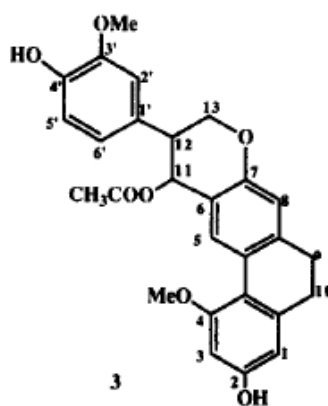
4-acetoxy-11-methoxy-3(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-fenantro[2,1-b]-pyran-8-ol. Izoloval ho Yamaki et al. v roce 1992. UV absorbní maxima má při 284 nm, 306 nm a 321 nm. IR spektrum dává absorpce při 3300 cm⁻¹ (hydroxyl), 1700 cm⁻¹ (karbonyl), 1600 cm⁻¹ a 1420 cm⁻¹ (benzenoidy). Hmotnostní spektrum dává *m/z* 462 a signifikantní pík *m/z* 402. Jeho struktura byla také potvrzena pomocí NMR (25).



Obr. 13: 1 – bletilol A, 2 – bletilol B

4.2.16 Bletilol C

4-acetoxy-6-methoxy-3(4'-hydroxy-3'-methoxyfenyl)-3,4,10,11-tetrahydro-2H-fenantro[2,3-b]-pyran-8-ol. Yamaki et al. jej izolovali roku 1992 spolu s bletilolem A a B. UV absorpční maxima jsou při 274 nm, 285nm a 302 nm. IR absorpce je 3300 cm^{-1} (hydroxyl), 1705 cm^{-1} (karbonyl), 1595 cm^{-1} a 1425 cm^{-1} (benzenoidy). Hmotnostní spektrum poskytuje hodnotu m/z 462 a signifikantní pík m/z 402. Konečná struktura byla určena NMR (25).

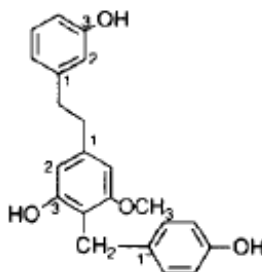


Obr. 14: bletilol C

4.2.17 Stilbenoidy

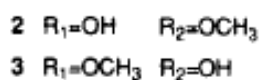
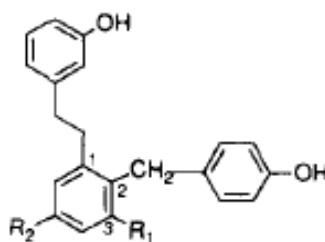
Byly izolovány z hlíz v roce 1993 z hlíz *Bletilla striata* (Bai et al.) (26).

- **3,3'-dihydroxy-4-(p-hydroxybenzyl)-5-methoxybibezylyl**



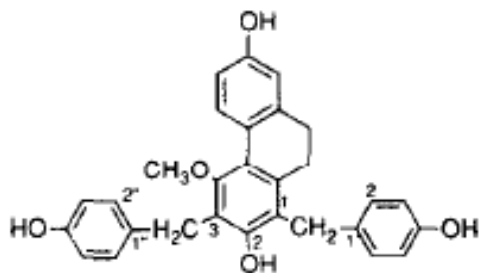
Obr. 15: 3,3'-dihydroxy-4-(p-hydroxybenzyl)-5-methoxybibezylyl

- **3,3'-dihydroxy-2-(p-hydroxybenzyl)-5-methoxybibezylyl**
- **3',5-dihydroxy-2-(p-hydroxybenzyl)-3-methoxybibezylyl**



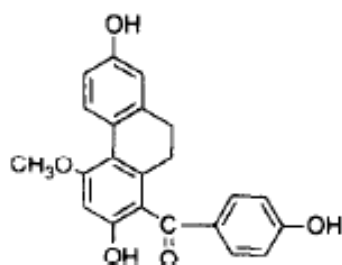
Obr. 16: 2 - 3,3'-dihydroxy-2-(p-hydroxybenzyl)-5-methoxybibezylyl, 3 - 3',5-dihydroxy-2-(p-hydroxybenzyl)-3-methoxybibezylyl

- **2,7-dihydroxy-1,3-bi(p-hydroxybenzyl)-4-methoxy-9,10-dihydrofenathren**



Obr. 17: 2,7-dihydroxy-1,3-bi(*p*-hydroxybenzyl)-4-methoxy-9,10-dihydrofenathren

- **2,7-dihydroxy-1-(*p*-hydroxybenzoyl)-4-methoxy-9,10-dihydrofenanthren**



Obr. 18: 2,7-dihydroxy-1-(*p*-hydroxybenzoyl)-4-methoxy-9,10-dihydrofenanthren

5 Farmakologický účinek *Bletilla striata*

Bletilla striata je v tradiční čínské medicíně používána jako **hemostatikum** (na zástavu krvácení). Především se jí využívá při **hemoptyse** (vykašlávání krve), **krvácení z žaludečních vředů, při úrazech, u popálenin a modřin**. Experimentální studie ukázaly, že hlavní substance v *B. striata* zkracuje koagulační čas a způsobuje inhibici degradace fibrinu a uzavírá rány. V dnešní době se velmi často *B. striata* využívá k **intraarteriální léčbě rakoviny jater, ledvin a dělohy**. Stimuluje nekrózu karcinomu v kombinaci s jinými proti rakovinovými léky (16).

Studiem bifenanthrenů (blestriarene A, B a C, batatacin III a 3'-methylbatatacin III), v roce 1989 Yamaki et al. *in vitro* zjistili jejich **antibakteriální aktivitu** především proti gram - pozitivním bakteriím, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans* (21).

V roce 2003 Qian et al. studovali kombinaci transarteriální chemoembolizace a arteriálního podávání léku z hlíz *B. striata* při **léčení nádoru jater** u krys. *B. striata* byla používána k embolizaci jaterní artérie a tím navodila ischemickou nekrózu a zmenšení nádoru. K mechanismu embolizace přispívají následující faktory: ovlivnění koagulačního a antikoagulačního systému, neabsorpční vlastnosti a celkové mechanické ucpání cévy. Bylo potvrzeno, že *B. striata* umí zpomalit difúzi do jaterního parenchymu kolem tumoru jako koloïdní forma, což vede k prodloužení proti rakovinového efektu a inhibici nádorových metastáz. Mucinózní součásti z *B. striata* mají široké spektrum protirakovinových prvků a může tak inhibovat výskyt a rozvoj nádorů. Tento postup chemoembolizace provedený u krys, má do budoucna nadějnou šanci na léčení pacientů s hepatocelulárním karcinomem (27).

V roce 2004 Morita et al. provedli studii, při které byly zkoumány účinky stilbenoidů získaných z hlíz *B. striata*. Bylo zjištěno, že mají **antimitotický účinek** a inhibují formaci mikrotubulů v buňkách a brání mitóze eukaryotních buněk, čehož lze **využít při léčbě rakoviny** (28).

Při studiu polysacharidů, získaných ze sušených hlíz *B. striata*, Wang et al. v roce 2005, *in vitro* zjistili, že tyto **polysacharidy stimulují proliferaci vaskulárních endoteliálních buněk z pupečníku**, díky zvýšení vaskulárního endoteliálního růstového faktoru až na 156%. Proliferace těchto endoteliálních buněk, hraje důležitou roli při

hojení ran a reparaci tkání. Některé z polysacharidů byly úspěšně použity při hojení žaludeční sliznice poškozené vředem (29).

V roce 2007 Diao et al. provedli další studii s polysacharidy z hlíz *B. striata* a zjistili, že polysacharidy jsou schopny vyvolat tvorbu oxidu dusnatého (NO) a prozánětlivých cytokinů v makrofázích. Makrofágy jsou nutné při procesu hojení ran a jimi produkováný NO zde hraje klíčovou roli. Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF - α) s interleukinem 1 beta (IL - β), které také produkují makrofágy, mají další specifické role v tomto procesu. Tato studie byla provedena *in vitro* na myších buňkách podobných makrofágům (30).

6 Laboratorní postupy analýzy

Při analýze rostlinného materiálu se vzorek zpracuje pomocí separačních metod, sledované látky se izolují a identifikuje se jejich přesná chemická struktura. Je důležité znát přesně, které látky rostlina obsahuje a vědět zda jsou tyto látky pro danou rostlinu specifické. Jakmile známe specifické látky obsažené v rostlině, která je chráněná, můžeme stejným způsobem získat látky z rostliny nechráněné, která bývá za chráněnou vydávána a za ni zaměňována. Tak lze zjistit, jak se co do obsahových látek tyto rostliny liší a kde existují významné rozdíly. Dále se zanalyzuje konkrétní přípravek, který by měl chráněnou rostlinu obsahovat a porovnájí se obsahové látky. Na základě výsledku této analýzy lze říci jestli v přípravku byla skutečně rostlina chráněná, nebo jen ta, se kterou bývá zaměňována nebo jsou tam přítomné obě.

6.1 Laboratorní postupy analýzy rostlinného materiálu

6.1.1 Příprava vzorku

Je nutné nejprve rostlinné vzorky připravit pro analýzu. Patří sem sušení rostlin, mletí, drcení, extrakce, homogenizace v ultrazvukové lázni, odstředování, případně filtrace. Jsou to metody, které slouží k tomu, aby se látky z pevné fáze vzorku dostaly do kapalně fáze rozpouštědla v co nejčistší formě.

6.1.1.1 Extrakce

Z hlediska fyzikální chemie chápeme proces extrakce jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Extrakční soustavy můžeme rozdělit podle skupenství fází, mezi kterými přechází složka:

- **Z pevné fáze do kapaliny** – z pevného materiálu se rozpouští ve vhodném rozpouštědle požadovaná složka, ostatní složky ne.
- **Z kapaliny do kapaliny** – extrakce založená na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin. Složka přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná.
- **Z kapaliny na pevnou fázi** – extrakce pevnou fází z roztoku selektivně zachycuje požadované složky.

- **Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi** – mikroextrakce pevnou fází je modifikace extrakce pevnou fází, ve které nastává zkoncentrování analytu adsorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno (31).

6.1.1.2 Homogenizace

Úprava emulze, při níž je mechanickým způsobem (např. protlačováním úzkým otvorem za vysokého tlaku) redukována polydisperzita systému (polydisperzní systém = systém s částicemi mnoha různých velikostí) a zmenšována velikost částic. Takto upravená emulze má větší stabilitu.

6.1.1.3 Odstředování (centrifugace)

Je jednoduchá základní laboratorní metoda sloužící zejména k oddělování pevných částic z roztoku. Přírozená sedimentace pevných částic způsobená gravitací je urychlena použitím odstředivky (centrifugy), ve které se zkumavky pohybují v tzv. rotoru po kruhové dráze. Působí tak na ně odstředivá síla, která je tím větší, čím větší rychlostí a po delší dráze se zkumavky pohybují. Běžné laboratorní centrifugy s pevnými tzv. úhlovými rotory dosahují odstředivé síly mezi 10-30 000 g, pro speciální techniky se používají ultracentrifugy, dosahující odstředivé síly až kolem 80 000 g (32).

6.1.1.4 Filtrace

Je metoda dělení pevné látky od kapaliny či plynu na porézní přepážce - filtru. Tekutina suspenze filtrem protéká, zatímco pevné částice filtr zachycuje.

6.1.2 Fáze analytická

Tato fáze zahrnuje především separační techniky. Nejdříve se zpravidla provádí TLC, abychom zjistili jaké látky můžeme ve vzorku očekávat, separace na SPE (Solid Phase Extraction), kde se oddělí látky na základě afinity k použitému sorbentu (může být polární i nepolární), pak následuje HPLC kapalinová chromatografie, GC, GCMS, LCMS. Všechny tyto metody směřují k tomu, abychom zjistili, jaké látky daná směs obsahuje a ve které frakci je můžeme očekávat.

6.1.2.1 Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction - SPE)

Je určena pro přípravu vzorků před chromatografickou analýzou. Jedná se o metodu, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou velice

podobné. Používají se chemicky vázané fáze na bázi silikagelu obrácené, normální a iontově výměnné, ale i adsorbenty jako je silikagel, alumina a syntetické pryskyřice (33).

Analyt se zachytí na sorbentu a interferující látky jsou postupným promýváním jedním typem rozpouštědla vyplaveny. Následně je analyt z kolony vyplaven rozpouštědlem o větší větší eluční síle (33).

6.1.2.2 Chromatografické metody

Chromatografie je separační analytická metoda, tedy metoda, při které se separují (oddělují) složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vznáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze.

- **Stacionární fáze** je nepohyblivá, má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti směsi. Stacionární fáze přitom může být tuhá (sorbent) nebo kapalná.
- **mobilní fáze** je pohyblivá, vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich rozdělení. Mobilní fáze může být kapalná (eluent) nebo plynná (nosný plyn).

Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, to znamená, že déle se zadrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Chromatografie slouží jak ke kvalitativní, tak ke kvantitativní analýze (31) (34).

a) Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Při TLC je stacionární fáze nejčastěji vrstva sorbentu (silikagel, oxid hlinitý) nanosená na hliníkovou nebo skleněnou destičku a mobilní fází jsou organická rozpouštědla. Testovaná látka se nanese pomocí kapiláry nebo mikropipety na start, který je blízko jednomu konci plochy destičky. Tímto koncem se ponoří destička do mobilní fáze ve vyvíjecí komoře a mobilní fáze vzlíná stacionární fází vzhůru a před dosažením konce destičky se vyjme a označí se vzdálenost, kam mobilní fáze doputovala (= čelo). Mobilní fáze se pohybuje přes start a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fází a čím jsou lépe rozpustné v mobilní fází. Pokud složky nejsou tvořeny barevnými látkami, provede se jejich zviditelnění – detekce. Použít můžeme nástřik aerosolu činidla, které se složkami reaguje na barevné sloučeniny nebo pozorování pod UV lampou. Např. redukující sacharidy lze detekovat

anilinem nebo difenylaminem, organické kyseliny a zásady je možné detekovat bromkresolovou zelení, aminokyseliny ninhydrinem, fosfolipidy oxidem molibdenovým atd. (31) (35).

Kvalitativní analýza – podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a čela od startu se nazývá retenční faktor R_F . V daném systému a za daných podmínek je retenční faktor pro určitou látku konstantou (31).

Kvantitativní analýza – přímé vyhodnocení skvrny se provádí většinou denzitometricky, kdy se zjišťuje stupeň ztmavnutí tenké vrstvy v místě skvrny. Čím více složky, tím je skvrna tmavší. Pokud je tenká vrstva napuštěna fluorescenčním činidlem, pak se fluorescence v místě skvrny snižuje (tzv. zhášení). V případě, že látka sama o sobě jeví fluorescenci a hodnotíme intenzitu fluorescence skvrny. Při nepřímém postupu se skvrna vystříhne, extrahuje do vhodného rozpouštědla a stanovuje vhodnou instrumentální metodou (31).

b) Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC - High Performance TLC)

Je modifikací TLC. Používají se stejné druhy stacionární fáze, avšak s velmi malou zrnitostí a velkou homogenitou zrnitosti. Mobilní fáze se dodávají na vrstvu pomocí mikročerpadel, pro zajištění rovnoměrného toku eluentu, což umožňuje dosažení vyšší separační účinnosti než u TLC. Využití probíhá ve vyvíjecích komorách s možností regulace složení plynné fáze, neboť průtok eluentu tenkou vrstvou závisí na tlaku a složení páry (plynné fáze) nad vrstvou. HPTLC dovoluje zpracovat i 20 vzorků na jedné desce současně (36).

c) Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Při vysokoučinné kapalinové chromatografii je stacionární fáze nanesena v koloně, což jsou ocelové nebo skleněné trubice 5 – 30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2 – 8 mm. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor, a proto je nutno pracovat při vysokém tlaku. Kapaliny se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly za tlaku 35 – 40 MPa (31).

Kvalitativní analýza – mobilní fáze protéká kolonou stálou rychlostí, a proto čas (retenční čas), který uplyne od vnesení vzorku na kolonu do okamžiku, kdy kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, je pro každou látku specifický a určuje tak o jakou látku se jedná. Práci usnadní standardy látek, dle nichž se lépe orientujeme ve

spektru. Používají se fotometrické detektory, které měří absorpenci eluentu vycházejícího z kolony. Refraktometrický detektor, který měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat UV záření, a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které měří fotonásobič kolmo na směr vstupujícího záření. Dále lze k detekci využít elektrochemické detektory vodivostní nebo voltmetrické (31).

Kvantitativní analýza – detektor na výstupu kolony je spojen se zapisovačem, který graficky registruje intenzitu odezvy v závislosti na čase (chromatogram) nebo se signál zpracovává digitálně pomocí počítače. Dostáváme tak grafické znázornění v podobě píků. Plocha píku je úměrná množství látky v zóně a určuje tak množství látky (31).

d) Plynová chromatografie (GC)

V plynové chromatografii je mobilní fází nosný plyn. Aby mohl být vzorek transportován na kolonu, musí se ihned přeměnit na plyn. Kvůli nutnosti přeměny analytu na plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a mnoha organokovových látek. Častým postupem je chemická změna analytů nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být v analýze GC použitelné (31).

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Používají se dva typy kolon.

- Náplňové - jsou trubice naplněné sorbetem nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Vnitřní průměr kolony je 2 – 3 mm, délka 1 – 3 m.
- Kapilární - využívají jako nosiče stacionární fáze své vnitřní stěny. Vnitřní průměr kolon je 0,1 - 0,6 mm a délka 15 – 60 m (31).

Kvalitativní a kvantitativní analýza jsou stejné jako u HPLC. Využívá se několik druhů detektorů. Tepelně – vodivostní detektor, v němž nosný plyn proudí přes vlákno žhavené stálým elektrickým proudem a ochlazuje je na určitou teplotu. Přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna, a tím změní i jeho teplotu a elektrický odpor. Funkce ionizačních detektorů je založena na vedení elektřiny v plynech. Základem aparatury je izolovaná nádoba, kterou proudí plyn přes dvě kovové desky (elektrody), mezi nimiž je elektrické pole. Mezi ionizační detektory patří – plamenový ionizační detektor, plamenový detektor s alkalickým

kovem, bezplamenový detektor s alkalickým kovem, fotoionizační detektor, detektor elektronového záchytu (31).

6.1.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty poměru hmotnosti ku náboji (m/z) čímž dává záznam relativních intenzit jednotlivých iontů (31).

Používá se několik základních ionizačních technik pro převedení molekul analytu na ionty. Je to např. elektronová ionizace, ionizace za atmosférického tlaku, ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku, ionizace laserem za účasti matrice (37).

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle jejich m/z . Separace iontů, lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů, pomocí řady analyzátorů, jako je např. magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů, magnetický analyzátor s dvojitou fokusací iontů, kvadrupólový analyzátor, iontová past, analyzátor doby letu (37).

K detekci iontů slouží elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec (37).

Výsledným záznamem jsou hmotnostní spektra kde na ose x je poměr m/z a na ose y relativní intenzita v % (37).

a) Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS nebo LC/MS)

Při spojení hmotnostní spektrometrie se separační metodou můžeme v jedné analýze zároveň separovat i identifikovat složitou směs látek, což poskytuje detailnější informaci o molekulové hmotnosti a struktuře látek (38).

Dříve bylo spojení HPLC/MS problémem hlavně z důvodu rozdílu tlaků mezi hmotnostním analyzátozem (10^{-3} Pa) a analyzovanými látkami vstupujícími do iontového zdroje za atmosférického tlaku (10^5 Pa). Technické řešení bylo obtížné, ale dnes je již vyřešeno rutinním použitím ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku a dále ionizace desorpcí laserem za účasti matrice a elektronová ionizace s nutností použít Particle Beam převodník. Dalším problémem bylo, že analyzované látky jsou nesené v toku kapaliny, která je v obrovském nadbytku a musí být před vstupem do vakuové části přístroje odstraněna. Mobilní fáze se obvykle přímo účastní ionizačního procesu, proto není možné bez výhrad použít klasické mobilní fáze,

obvykle se používá vodný methanol nebo acetonitril, lze použít i ethanol, nevhodná jsou halogenová rozpouštědla a hexan (38).

Výsledkem je opět hmotnostní spektrum.

b) Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

Je v současnosti zcela rutinní metoda téměř výhradně se používají kapilární kolony ve spojení s konvenční elektronovou ionizací nebo chemickou ionizací. Pro současné vakuové pumpy není problém odčerpát nosný plyn (38).

Použití elektronové ionizace umožňuje přímé softwarové porovnání naměřených spekter s databází v počítači. Výsledkem porovnání neznámého spektra s knihovnou jsou nejpravděpodobnější možnosti seřazené podle klesající podobnosti spekter s vyjádřením koeficientu shody v procentech (38).

6.1.3 Izolace a identifikace

Je fáze, kdy už víme jaké látky vzorek asi tak obsahuje a jaké mají vlastnosti. Pro izolaci se používá sloupcová chromatografie (CC). Tato technika nám umožní chytat určitou frakci extraktu a tak dostat koncentrovanější podíl hledané látky, kterou pak můžeme čistit. Nakonec se provede analýza pomocí NMR a IR spektrometrie, které nám potvrdí přesnou strukturu.

6.1.3.1 Sloupcová chromatografie (CC)

U sloupcové chromatografie je rozdělení látek založeno na jejich schopnosti adsorpce na stacionární fázi. Do chromatografické trubice se po naplnění adsorbentem vnese roztok směsi. Nejdůležitější způsob vyvíjení v analytické chemii a pro získání jednotlivých složek je eluční technika, při které se dělené složky vymývají přidávaným rozpouštědlem. Přitom nejdříve vychází ze sloupce složka nejslaběji adsorbovaná a postupně složky silněji adsorbované (34).

Eluční způsob vyvíjení je možné realizovat v několika variantách.

- Jednoduchá eluce, kdy se kolona promývá stále stejnou mobilní fází.
- Vícestupňová eluce, při eluci méně polárním rozpouštědlem se eluují dobře některé složky, jiné jsou příliš sorbovány a pro jejich eluci se zvolí polárnější rozpouštědlo.
- Gradientová eluce, při eluci se postupně plynule mění pH mobilní fáze nebo koncentrace polárnější složky v mobilní fázi.

Kontinuální detekce oddělených složek se provádí mimo kolonu v eluátu, čímž se získá koncentrační profil oddělených složek (34).

6.1.3.2 Infračervená spektrometrie (IR)

Principem IR spektrometrie je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Infračervené záření pokrývá část elektromagnetického spektra v intervalu mezi 0,78 a 1000 μm . V infračervené spektrometrii se běžně místo vlnové délky užívá vlnčet. Nejdůležitější oblast je 4000 – 670 cm^{-1} . Energie infračerveného záření způsobuje změny vibračních a rotačních stavů molekul. Proto IR spektra jsou vibračně – rotační (31).

V infračervených spektrech sledujeme závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu absorbovaného záření. Spektrum je pásové a pásy ve spektru odpovídají různým typům vibračních přechodů. Absorbovat se může jen záření, jehož energie odpovídá příslušným vibračním a rotačním přechodům. Tyto jsou u různých skupin atomů různé. Tím z vlnočtu absorbovaného záření získáváme informace pro kvalitativní analýzu (31).

IR spektrum rozdělujeme na dvě oblasti. Oblast skupinových vibrací (charakteristických vibrací) - mezi vlnočty 4000 – 1500 cm^{-1} nacházíme vlnočty různých funkčních skupin, což slouží k identifikaci těchto skupin. Oblast otisku prstů – mezi vlnočty 1500 – 670 cm^{-1} nacházíme pásy deformačních vibrací skupin, které jsou velmi silně ovlivněny okolními vazbami a celkovou strukturou molekuly. Nenajdeme dvě látky, které by měly svá spektra v oblasti otisku prstů shodná. Identifikace látky je možná porovnáním spektra s elektronickou knihovnou spekter (31).

6.1.3.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR je fyzikálně-chemická metoda využívající interakce atomových jader (s nenulovým jaderným spinem) s magnetickým polem. Atomová jádra některých prvků mají magnetický moment a ve vnějším magnetickém poli se orientují do poloh, kterým odpovídají určité energetické hladiny. Absorpcí elektromagnetického záření v oblasti krátkých radiových vln dochází k přechodu jádra na vyšší energetické hladiny (31).

Rozdíl energií obou stavů daného jádra není konstantou, ale roste s magnetickou indukcí vnějšího magnetického pole. Zkoumá se, kdy nastává rezonance. Při sledování absorpce magnetického záření vynášíme na osu x ne hodnoty magnetické indukce nebo frekvence, ale chemický posun δ , což je relativní vyjádření rozdílu mezi polohou signálu standardu a měřené látky v ppm. Na osu y vynášíme intenzitu naměřeného

signálu. Rezonanční frekvence není u všech protonů stejná, ale je vždy ovlivněna nejbližším okolím sledovaného protonu v molekule, protože vliv na daný proton mají i další blízká jádra v molekule, která mají nenulový magnetický moment (31).

Na základě NMR spektroskopie lze určit složení a strukturu molekul zkoumané látky i jejich množství.

6.2 Laboratorní postupy analýzy přípravků TCM

Analýzy obsahových látek z rostlin zpracovaných podle metod popsanych v předchozí kapitole, nám dává informace o přesné chemické struktuře těchto látek. Díky znalosti přesné struktury látek, je možné po zanalyzování přípravku určit, zda skutečně obsahoval rostlinu s danými léčebnými účinky nebo do jaké míry byla tato rostlina nahrazena rostlinou jinou, která se liší obsahem charakteristických látek.

Přípravky obsahují kromě konkrétních obsahových látek z rostlinné části také řadu látek pomocných, kterých je třeba se před analýzou zbavit, aby nerušily stanovení obsahových látek.

6.2.1 Pomocné látky

Pomocné látky pouze doplňují účinnou látku. Zlepšují některé mechanické vlastnosti přípravku a zlepšují zpracování léku při výrobě (lepší lisování tablet, zlepšují uvolňování léčivé látky z přípravku aj.).

K často používaným látkám patří:

- celulóza
- sacharóza
- monohydrát laktózy
- kukuřičný škrob
- sodná sůl karmelózy
- mastek
- stearin
- pryskyřice
- želatina
- oxid titaničitý
- oxid křemičitý

- bílý vosk
- karnaubský vosk
- tuk z ovčí vlny
- polyvinilacetát
- barviva
- atd.

Pro každou pomocnou látku se podle jejího charakteru volí různá kombinace metod uvedených v předchozí kapitole tak, aby se odstranila a bylo možné stanovit obsahové látky dané rostliny.

6.2.2 Přípravek obsahující orchidej *Bletilla striata*

Bletilla Rhizome (*Bletilla striata*; Bai Ji) 5:1 Extract Powder 100 gm

Je práškový extrakt získaný ze sušené rostliny *B. striata*. 5:1 znamená, že z 5 gramů rostliny se získá 1 gram práškového extraktu. V tomto přípravku nejsou obsaženy žádné další doplňkové látky jako laktóza, celulóza a škroby (39).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat metody, kterými lze identifikovat obsahové látky rostlin v přípravcích používaných TCM.

Řada přípravků obsahuje také rostliny, které jsou chráněny úmluvou CITES. V této rešeršní práci je zpracována orchidej *Bletilla striata*, která patří do CITES a je zde popsána její botanická charakteristika, obsahové látky a farmakologický účinek. Důležitou částí této práce je kapitola o laboratorní analýze obsahových látek, kde jsou podrobně popsány používané metody, díky kterým zjistíme přesnou strukturu látek. Znalost struktury látek pak slouží k identifikaci rostlin v léčivém přípravku.

Věřím, že jsem v rámci možností své bakalářské práce poskytla přehled metod používaných při identifikaci rostlin z přípravků TCM.

Seznam použité literatury a zdrojů

- (1). FOHOW. *Tradiční čínská medicína*. [online]. (cit. 14.6.2009). Dostupné z <http://www.fohowcz.cz/Vychodni-medicina-a-srovnani-se-zapadni/>
- (2). *Tradiční čínská medicína*. [online]. (cit. 14.6.2009). Dostupné z <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/kbd/Special.%20zboziznalstvi/7.%20Trad%20icni%20cinska%20medicina.pdf>
- (3). AGENTURA OCHRANY PŘÍRODY A KRAJINY ČR. *CITES*. [online]. (cit. 13.6.2009). Dostupné z <http://www.ochranaprirody.cz/index.php?cmd=page&id=1349>
- (4). BOTANY.CZ. *Mezinárodní obchod s volně žijícími druhy CITES*. [online]. (cit. 13.6.2009). Dostupné z <http://botany.cz/cs/cites/>
- (5). KUČERA, J. *CITES – základní informace*. [online]. Publikováno 24.3.2009 (cit. 13.6.2009). Dostupné z [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/umluva_o_mezinarodnim_obchodu/\\$FILE/OMOB-co_je_cites-20090324.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/umluva_o_mezinarodnim_obchodu/$FILE/OMOB-co_je_cites-20090324.pdf)
- (6). TCMBOHEMIA. *Produktové informace*. [online]. (cit. 15.6.2009). Dostupné z http://eshop.tcmbohemia.cz/vlastni_c?soubor=uvod.html
- (7). VALÍČEK, P. – ANDO, V. – ČÍŽEK, H. – POTUŽÁK, M. *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*. 1. vydání. Hradec Králové : Svítání, 1998. 321 s. ISBN 80-86198-01-4
- (8). RŮŽIČKA, R. – SOSÍK, R. – YINGWU, W. *Tradiční čínská medicína v denním životě*. 1. vydání. Olomouc: Poznání, 2002. 398 s. ISBN 80-86606-06-6
- (9). WIKIPEDIE. *Vstavačovitě*. [online] (cit. 14.7.2009). Dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Vstava%C4%8Dovit%C3%A9>
- (10). Nash, N. – la Croix, I. *ORCHIDEJE*. 1. vydání. Brno Štýřice: Computer Press, 2007. 368 s. ISBN 978-80-251-1459-9
- (11). Svět kolem nás. *Orchideje*. [online]. Publikováno 30.4.2008 (cit. 14.7.2009). Dostupné z <http://www.sience.estranky.cz/clanky/flora/orchideje>
- (12). BOTANY.CZ. *Bletilla striata (Thunb.) Rchb.f.* [online]. (cit. 1.7.2009). Dostupné z <http://botany.cz/cs/bletilla-striata/>

- (13). safro milan havlis. *Bletilla striata*. [online]. Publikováno 26.12.2007. (cit. 1.7.2009). Dostupné z <http://havlis.cz/karta.php?kytkaid=492>
- (14). Orchidmania. *Bletilla striata*. [online]. (cit. 2.7.2009). Dostupné z <http://www.orchids.org/species/genera/B/Bletilla/striata/>
- (15). TAN, K. W. THE SYSTEMATIC STATUS OF THE GENUS BLETILLA (ORCHIDACEAE). *BRITTONIA*, červenec – srpen 1969, no. 21, s. 202 – 214.
- (16). Wikipedia. *Bletilla*. [online]. (cit. 1.7.2009). Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Bletilla>
- (17). *Základní látky obsažené v drogách*. [online] (cit. 14.7.2009). Dostupné z <http://ajaxx.sweb.cz/latky.htm>
- (18). BULPITT, CH. J. – LI, J. – BULPITT, P.F. – WANG, J. . The use of orchids in Chinese medicine. *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE*, prosinec 2007, vol. 100, s. 560 - 561.
- (19). TOMODA, M. – NAKATSUKA, S. – TAMAI, M. – NAGATA, M. .Plant Mucilages. VIII. Isolation and Characterization of a Mucous Polysaccharide, „Bletilla – glucomannan“, from *Bletilla striata* Tubers. *Pharmaceutica Society of Japan*, 11. dubna 1973, no. 12, s. 2667 – 2668.
- (20). YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K – TAKAGI, S – YAMAGATA, Y. – TOMITA, K. . BLESPIROL, A PHENANTHRENE WITH A SPIROLACTONE RING FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 33, no. 6, s. 1497 – 1498.
- (21). YAMAKI, M. – BAI, L. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . BIPHENANTHRENES FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1989, vol. 28, no. 12, s. 3503 – 3504.
- (22). BAI, L. – YAMAKI, M. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . BLESTRIN A AND B, BIS(DIHYDROPHENANTHRENE)ETHERS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1990, vol. 29, no. 4, s. 1259.
- (23). BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – YAMAKI, M. – TAKAGI, S. . BLESTRIANOL A, B AND C, BIPHENANTHRENENES FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1991, vol. 30, no. 8, s. 2733 – 2735.

- (24). YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – TAKAGI, S. – YAMAGATA, Y. – TOMITA, K. . BISPHENANTHRENE ETHERS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, no. 11, s. 3985 – 3986.
- (25). YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . THREE DIHYDROPHENANTHROPYRANS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 32, no. 2, s. 427- 430.
- (26). BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – YAMAKI, M. – TAKAGI, S. . STILBENOIDS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 33, no. 6, s. 1481 – 1483.
- (27). QIAN, J. – VOSSOUGH, D. – WOITASCHEK, D. – OPPERMAN, E. – BECHSTEIN, W. O. – LI, W. – Y. – FENG, G. – S. – VOGL, T. . Combined transarterial chemoembolization and arterial administration of *Bletilla striata* in treatment of liver tumor in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, vol. 9, no. 12, s. 2676 – 2680.
- (28). MORITA, H. – KOYAMA, K. – SUGIMOTO, Y. – KABAYASHI, J. Antimitotic activity and reversal of Brest cancer resistance protein – mediate drug resistance by stilbenoid from *Bletilla striata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, no. 15, s. 1051 – 1054.
- (29). WANG, CH. – SUN, J. – LUO, Y. – XUE, W. – DIAO, H. – DONG, L. – CHEN, J. – ZHANG, J. . A polysaccharide isolated from the medicinal herb *Bletilla striata* induces endothelial cells proliferation and vascular endothelial growth factor expression *in vitro*. *Biotechnology Letters*, 2006, no. 28, s. 539.
- (30). DIAO, H. – LI, X. – CHEN, J. – LOU, Y. – CHEN, X. – DONG, L. – WANG, CH. – ZHANG, CH. – ZHANG, J. .*Bletilla striata* Polysaccharide Stimulates Inducible Nitric Oxide Synthase and Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 2008, vol. 105, no. 2, s. 85 – 89.
- (31). KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vydání. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- (32). *Odstředování (centrifugace)*. [online] (cit. 23.7.2009) Dostupné z <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Odstredovani.htm>

- (33). SIGMA – ALDRICH. *SPE*. [online] (cit. 23.7.2009) Dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic/informace-o-produktech/chromatografie/spe.html>
- (34). KARLÍČEK, R. a kol. *ANALYTICKÁ CHEMIE PRO FARMACEUTY*. 2. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. 281 s. ISBN 80-246-0348-9
- (35). Wikipedie. *Chromatografie na tenké vrstvě*. [online] (cit. 20.7.2009). Dostupné z http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie_na_tenk%C3%A9_vrstv%C4%9B
- (36). *CHROMATOGRAFIE*. [online] (cit. 20.7.2009). Dostupné z http://www.natur.cuni.cz/~suchan/PC_TLC.pdf
- (37). HOLČAPEK, M. *Experimentální metody strukturálního výzkumu*. [online] (cit. 21.7.2009). Dostupné z http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast1.pdf
- (38). HOLČAPEK, M. *Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik*. [online] (cit. 21.7.2009) Dostupné z http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast3.pdf
- (39). KTBotanical.com. *Bletilla rhizoma (Bletilla striata, Baj Ji) 5:1 Extract Poder 100 mg*. [online] (cit. 30.7.2009) Dostupné z <http://www.ktbotanicals.com/bletilla-rhizome-bletilla-striata-baj-ji-51-extract-powder-1-p-3616.html>

Původ obrázků:

- Obr. 1: CITES. *National contacts & informations*. [online]. Dostupné z http://www.cites.org/common/directy/e_directy.html
- Obr. 2: TradičníMedicína.cz. *Čínská tradiční medicína*. [online]. Dostupné z <http://tradicnimedicina.cz/cinska-tradicni-medicina.php>
- Obr. 3: Urtekildens planteleksikon. *Bletilla*. [online]. Dostupné z http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/blet_str.htm
- Obr. 4. YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K – TAKAGI, S – YAMAGATA, Y. – TOMITA, K. . BLESPIROL, A PHENANTHRENE WITH A SPIROLACTONE RING FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 33, no. 6, s. 1498.
- Obr. 5 – Obr. 7. YAMAKI, M. – BAI, L. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . BIPHENANTHRENES FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, vol. 28, no. 12, s. 3503.
- Obr. 8. BAI, L. – YAMAKI, M. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . BLESTRIN A AND B, BIS(DIHYDROPHENANTHRENE)ETHERS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1990, vol. 29, no. 4, s. 1259.
- Obr. 9. – Obr. 11 BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – YAMAKI, M. – TAKAGI, S. . BLESTRINOL A, B AND C, BIPHENANTHRENENES FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, vol. 30, no. 8, s. 2734.
- Obr. 12. YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – TAKAGI, S. – YAMAGATA, Y. – TOMITA, K. . BISPHENANTHRENE ETHERS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, no. 11, s. 3985.
- Obr. 13 – Obr. 14. YAMAKI, M. – BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – TAKAGI, S. . THREE DIHYDROPHENANTHROPYRANS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 32, no. 2, s. 427- 430.
- Obr. 15 – Obr. 18. BAI, L. – KATO, T. – INOUE, K. – YAMAKI, M. – TAKAGI, S. . STILBENOIDS FROM BLETILLA STRIATA. *Phytochemistry*, 1993, vol. 33, no. 6, s. 1481.