

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Fytochemický výzkum nadzemní části magnolky čínské
(*Schizandra chinensis* (TURZ.) BAILL.)

Hradec Králové, 2007

Mgr. Petra Dadáková

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, CSc. za vedení, trpělivost a podporu při vypracování práce.

Děkuji dále těm, kteří byli nápomocni při řešení, jmenovitě Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Doc. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D. z katedry anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové, Asmitě Sautreau-Patel, MPharm, PhD ze School of Pharmacy and Biomedical Science, University of Portsmouth.

Petra Dadáková

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA.....	10
3.2. OBSAHOVÉ LÁTKY.....	10
3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA.....	18
3.3.1. Adaptogenní účinek.....	18
3.3.2. Účinky na játra.....	19
3.3.3. Imunostimulační efekt.....	21
3.3.4. Neurotropní aktivita.....	22
3.3.5. Antiulcerózní působení.....	22
3.3.6. Antitoxický účinek.....	22
3.3.7. Antineoplastický účinek.....	22
3.3.8. Antioxidační účinky.....	23
3.3.9. Vliv na PAF.....	24
3.3.10. Antiinvazní účinky.....	24
3.3.11. Účinky na krev.....	24
3.3.12. Účinky na pokožku.....	25
3.3.13. Vliv na různé enzymové systémy.....	25
3.3.14. Protizánětlivý účinek.....	25
3.3.15. Antihypertenzní aktivita.....	26
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	27
4.1. POUŽITÝ ROSTLINNÝ MATERIÁL.....	27
4.2. METODY A CHEMIKÁLIE.....	28
4.2.1. Obecné metody.....	28
4.2.1.1. Destilace rozpouštědel.....	28
4.2.1.2. Odpařování frakcí.....	28
4.2.1.3. Vysoušení vzorků.....	28
4.2.1.4. Sloupcová chromatografie (CC).....	28
4.2.1.4.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii.....	28
4.2.1.5. Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	29
4.2.1.6. Preparativní tenkovrstvá chromatografie (PTLC).....	29
4.2.1.6.1. PTLC na komerčním Silufolu.....	29
4.2.1.6.2. PTLC na litých vrstvách.....	29

4.2.1.7. Měření teploty tání.....	29
4.2.1.8. NMR spektroskopie.....	29
4.2.1.9. Ultrafialová spektroskopie.....	29
4.2.2. Rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla.....	30
4.2.2.1. Rozpouštědla.....	30
4.2.2.2. Chemikálie.....	30
4.2.2.3. Detekční činidla.....	31
4.2.3. Chromatografické adsorbenty a soustavy.....	33
4.2.3.1. Sypké adsorbenty.....	33
4.2.3.2. Komerční desky.....	34
4.2.3.3. Lité vrstvy.....	34
4.2.3.4. Vyvíjecí soustavy pro TLC.....	35
4.2.4. Příprava extraktu.....	36
4.2.4.1. Příprava extraktu z listů.....	36
4.2.4.2. Příprava extraktu z kaulomů (provedla Dr. M. Křenková).....	37
4.3. SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE VÝTŘEPKU CHCl ₃ -EtOH 2:1 (LISTY).....	39
4.3.1. Spojené frakce 6-8	40
4.3.2. Spojené frakce 9-14.....	41
4.3.3. Spojené frakce 29-33.....	41
4.3.3.1. Spojené frakce 29-33/11-14.....	42
4.3.3.2. Spojené frakce 29-33/41-72 a 29-33/73-88.....	43
4.3.4. Spojené frakce 34-35.....	45
4.3.5. Spojené frakce 36-45.....	46
4.3.5.1. Spojené frakce 36-45/1-4.....	46
4.3.6. Spojené frakce 46-51.....	47
4.3.6.1. Spojené frakce 46-51/13-20.....	47
4.3.6.1.1. Spojené frakce 46-51/13-20 – zóna 3 a 4.....	50
4.3.7. Spojené frakce 58-59.....	51
4.3.7.1. Spojené frakce 58-59/24-31.....	52
4.3.8. Spojené frakce 87-148.....	53
4.3.8.1. Spojené frakce 87-148/20-47.....	54
4.3.8.2. Spojené frakce 87-148/182-189.....	54
4.3.8.2.1. Dělení matečného louhu po rekrystalizaci (obr. 10. - C).....	55
4.3.8.2.2. Dělení matečného louhu frakce 87-148/182-189 (obr. 10. - A).....	55

4.3.8.2.3. Dělení krystalického výpadku z frakce 87-148/182-189 (obr. 10. - B).....	56
4.3.8.3. Spojené frakce 87-148/190-221.....	57
4.3.8.4. Spojené frakce 87-148/222-245.....	57
4.4. CHROMATOGRRAFIE VODNÉHO ZBYTKU PO VYTŘEPÁNÍ n-BUOH-EtOH 92:8 (LISTY).....	58
4.4.1. Spojené frakce 1-2.....	59
4.4.2. Spojené frakce 3-13.....	59
4.4.3. Spojené frakce 49-57.....	60
4.5. CHROMATOGRRAFIE n-BUTANOLOVÉHO VÝTŘEPKU (KAULOMY).....	62
4.5.1. Spojené frakce 1-5.....	62
4.5.1.1. Spojené frakce 1-5/1.....	63
4.5.1.1.1. Frakce 1-5/1/V3.....	63
5. DISKUSE.....	65
6. SOUHRN.....	72
7. LITERATURA.....	74

1. ÚVOD

V posledních 15 letech probíhá v Evropě velmi intenzivní studium prostředků tradiční medicíny neevropských národů, zejména z oblasti Číny (TCM), Japonska (Kampo) a Indie (Ayurveda). Velmi rozšířené je také etnobotanické studium dosud nepopsaných rostlin z oblasti Jižní Ameriky, zejména deštných pralesů. Intenzivní pozornost je věnována také mořským organismům. Tato výzkumná činnost je financována především farmaceutickými firmami, protože do výsledků vkládají určitou naději, že se podaří objevit látky, které by se mohly stát novými léčivými, s vlivem na některé patofyziologické procesy a z nich vyplývající onemocnění, která nejsou uspokojivě řešena.

Výzkum nových syntetických léčiv je na velmi vysoké úrovni. Umožňuje přiblížit se k optimální molekule podstatně rychleji než tomu bylo v 70. letech minulého století a to za použití úspěšných matematických predikčních modelů (QSAR), metod syntetické organické chemie, které jsou na vysoké úrovni a dále velmi efektivních farmakologických modelů, využívajících pro základní screening především enzymových systémů, specifických proteinů a izolovaných buněk. Moderní metody tedy umožňují přiblížit se k léčivu za podstatně kratší dobu, než tomu bylo před 25 lety, kdy syntézy látek byly prováděny zcela nahodile a bylo spotřebováváno neúčelně obrovské množství experimentálních zvířat, což je nyní zcela nepřijatelné. Ale cena za tento pokrok je vysoká. K realizaci jediného léčivého přípravku bylo před koncem 20. století potřeba zhruba 250-500 milionů amerických dolarů¹ (jedná se o široce užívaný přípravek, nikoliv orphan drug). Z tohoto důvodu se současný význam v oblasti léčiv začíná „vracet k poznanému“ - studuje stará známá léčiva, hledá u nich nové účinky.

Látky přírodního původu patří k těm, u kterých je nalézána řada využitelných biologických účinků. Z rostlin používaných v lidovém léčitelství bývají izolovány hlavní účinné látky, u kterých jsou objevovány nové účinky a zároveň tyto drogy obsahují zpravidla ještě další metabolity, jejichž biologická aktivita však dosud nebyla sledována a není známa ani z lidového léčitelství. Tyto nově izolované metabolity dokonce mohou být někdy v rostlinách obsažené i ve vyšších koncentracích než již dříve známé, hlavní biologicky aktivní látky.

Jednou z rostlin, která odpovídá tomuto historickému schématu je magnolka čínská (*Schizandra chinensis* (TURCZ.) BAILL., Schizandraceae), z níž jsou používány plody (semena) původně jako prostředek proti kašli. Obsahují asi 60 dibenzo[a,c]cyklooktadienových lignanů u nichž byla v 80. letech minulého století dále nalezena výrazná antioxidační, chemoprotektivní (hepatoprotektivní) a adaptogenní aktivita. Postupem doby se však ukázalo,

že velká část těchto lignanů vykazuje ještě další, velmi zajímavé (prakticky využitelné) biologické účinky². Dosud byly z fytochemického hlediska sledovány pouze plody (semena), v nichž je spektrum obsahových látek velmi úzké, kromě nezajímavého mastného oleje je v nich přítomna silice a lignany. Ostatní látky nelignanového charakteru prakticky izolovány nebyly (kromě thymochinolu) a v podstatě o to nebyl ani zájem. Protože je rostlina velmi perspektivní, vznikl na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové zájem o studium vegetativních částí rostliny a to na základě údaje literatury², že listy jsou používány jako náhražka čaje s příznivým účinkem na žaludek. Z diethyletherového extraktu z listů byla izolována kyselina (*E*)-skořicová, která tlumí růst *Helicobacter pylori* v žaludku. Při fytochemické analýze diethyletherového extraktu z kaulomů byl nalezen kromě látek již dříve známých (lignany, složky silice) nově 24-methylencykloartanol. Protože polární extrakt z listů (n-butanolový výtřepek) nebyl dosud sledován, vznikl zájem o zjištění jeho obsahových látek.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této fytochemické studie bylo:

- 1) příprava primárního ethanolového extraktu z listů magnolky čínské,
- 2) separace tohoto extraktu za účelem získání polárního n-butanolového výtřepku (diethyletherový podíl neanalyzován),
- 3) sloupcová chromatografie n-butanolového výtřepku,
- 4) zpracování části n-butanolového výtřepku z kaulomů (z práce Dr. M. Křenkové),
- 5) získání alespoň jedné obsahové látky v čistém stavu a určení jejich základních fyzikálně-chemických charakteristik.

Tab. 1. Seznam použitých zkratek

SNS	Společenství nezávislých států
HHN	system hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin
GPT	alaninaminotranferasa
DDB	dimethylester 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethoxybifenyl-2,2'-di- karboxylové kyseliny
GSH	glutathion
DCA	deoxycholová kyselina
3'-MeDAB	3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzen
GST-P	placentární glutathion-S-transferasa
GST	glutathion-S-transferasa
TPA	12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát
SOD	superoxiddismutasa
CAT	katalasa
FRSa	zhášení volných radikálů (free radical scavenging activity)
PAF	faktor aktivující destičky (platelet-activating factor)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
ACAT	acyl-CoA: cholesterol-acyltransferasa
CoA	koenzym A
5-LOX	5-lipoxygenasa
UV	ultrafialové záření
CC	sloupcová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
PTLC	preparativní tenkovrstvá chromatografie
NMR	nukleární magnetická resonance
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (reaktive oxygen species)
PGE ₂	prostaglandin E ₂
Th	lymfocyty T - pomocné buňky (T-helper cells)
CTLs	cytotoxické lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
COX-2	cyklooxygenasa 2
iNOS	indukovatelná forma syntetasy oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
EDRF	endotelium-derived relaxing factor = oxid dusnatý (NO)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ATPasa	adenosintrifosfatasa
GIT	gastrointestinální trakt

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

Magnolka čínská, *Schizandra chinensis* (TURZ.) BAILL., je vytrvalá opadavá liána se silnými lodyhami, které se monopodiálně větví a dosahují tloušťky 1-2 cm a délky až 12 m. Lodyhy vyrůstají z kořenového krčku v hloubce 10-15 cm, ze sympodiálních šedohnědých stolonů. Kůra mladých výhonů, vykonávajících v průběhu růstu levotočivý pohyb, je hnědočerná, hladká a odlupuje se.

Listy jsou střídavé, řapíkaté, na rubu světleji zelené než na lici, zakládají se ve spirále a tvoří lichopřeslen. Čepel je eliptická nebo opakvejitá, na špicí je zaostřená, délky 5-10 cm, šířky 3-5 cm. Listové řapíky jsou dlouhé 1-3 cm, červenohnědé barvy. Okraj listu je mělce zoubkatý.

Jedná se o rostlinu jednodomou s oddělenými květy obou pohlaví. Samčí i samičí květy jsou rozloženy po 2-7 v paždí pupenových zárodků na výhonech. Květní pupeny se zakládají v létě a na podzim se tyto zárodky diferencují v květy obou pohlaví. V dospělosti jsou stopěčky 1-4 cm dlouhé, nící a jsou zakončené aromatickými květy v průměru 1-1,5 cm. Okvětí je korunovité s bílými, uvnitř růžovými lístky, které jsou rozloženy na ose ve spirále. Květy samčí nesou 3-7 tyčinek, srostlých bazemi v sinandrium. Květy samičí mají 30-40 volných zelených plodolistů, cyklicky rozložených na češuli, ve formě šišky.

Plodenství je hroznovité a tvoří ho 4-40 šťavnatých bobulí, ostře červené barvy, o průměru 5-10 mm. Každá bobule uzavírá 1-2, zřídka 3 semena ledvinovitého tvaru, dlouhá přibližně 4 mm, 3 mm široká a tloušťky 2 mm, s lesklou okrovou testou³.

Tento japonsko-mandžuský endemit s disjunktivním východoasijským typem areálu je v SNS rozšířen především v Přímořském kraji, na jihu Chabarovského kraje, v oblasti Sachalinu a na jihozápadě Amurské oblasti³. Rostlina vystupuje až do nadmořských výšek 700 m avšak většina porostů se vyskytuje ve výšce 200-500 m^{4,5}. Dále je taxon rozšířen mimo areál v Japonsku, Koreji a severovýchodní Číně⁶.

3.2. OBSAHOVÉ LÁTKY

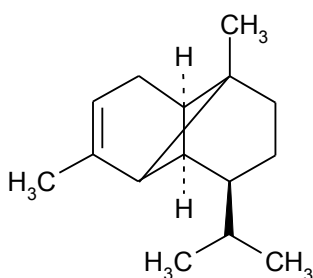
Ve šťávě oplodí byly nalezeny běžné látky: kyselina vinná, citrónová, jablečná, jantarová a šťavelová. Frakce kyselin tvoří asi 9 % oplodí⁷. Obsahem kyseliny citrónové a jablečné se blíží citrónu⁸. Dále byly zjištěny látky typu vitamínu P a vitamín C⁹, anthocyany a cukry⁷.

Ze semen byly kromě terpenů získány steroly^{10, 11}, vitamín E^{10, 11, 12} a volné mastné kyseliny^{10, 11}.

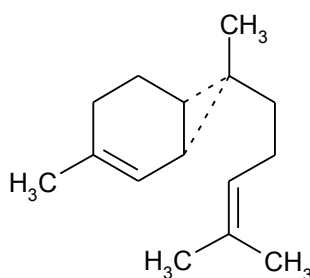
Z hlediska terapeutického jsou nejdůležitějšími obsahovými látkami lignany dibenzo[a,c]cyklooktadienového typu, kterých bylo ze semen magnolky čínské izolováno dosud kolem 50 a 5 jednoduchých terpenů jako součást silice². Z plodů byl nově izolován 6-O-benzoylgomisin O, dále 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd¹³, protokatechová¹⁴ a sorbová kyselina¹⁵, thymochinol 2-O-β-D-glukopyranosid¹⁴, thymochinol 5-O-β-D-glukopyranosid¹⁴, kemferol 3-O-β-rutinosid¹⁴ a anwulignan¹⁶. Z drogy původem z Ličuanu (provincie Hubei) byly izolovány β-sitosterol, schizandrolová kyselina, isoschizandrolová kyselina, 2,3-dihydroxypropyloktadekanoát¹⁷ a citrostadienol¹⁸.

Tab. 2. Terpeny izolované ze silice ze semen magnolky

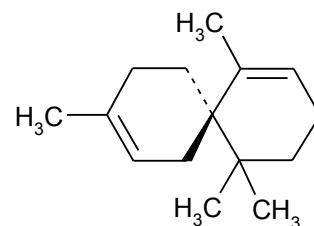
Vzorec	Název	Literatura
1	ylagen	19
2	seskvikareny	20
3	α-chamigren	21
4	β-chamigren	21
5	chamigrenal	21



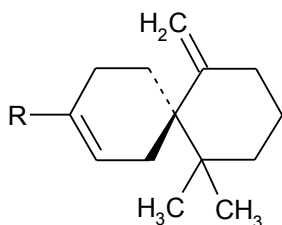
1



2



3



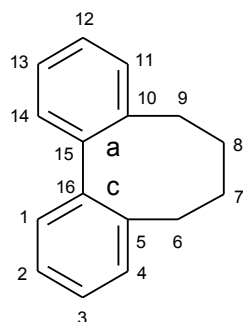
4,5

Vzorec	Název	R
4	β-chamigren	CH ₃
5	chamigrenal	CHO

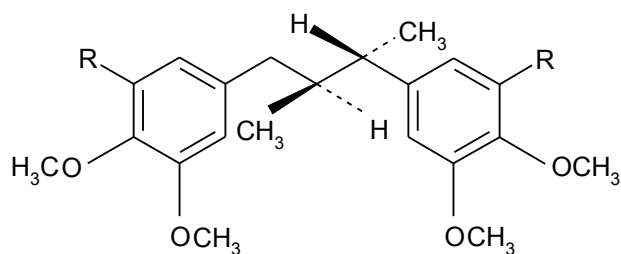
Tab. 3. Lignany izolované z plodů (semen) magnolky

Vzorec	Název	Literatura
6	pregomisin	22, 23
7	meso-dihydroguajaretová kys.	23
8	anwulignan	24
9	(+)-deoxyschizandrin	25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
10	(+)-gomisin K ₂	33
11	(+)-gomisin K ₃	33
12	schizandrin	26, 28, 29, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
13	gomisin H	32, 38, 41
14	angeloylgomisin H	38, 41
15	benzoylgomisin H	38, 41
16	tigloylgomisin H	38, 41
17	gomisin A	28, 32, 39, 42, 43
18	gomisin T	44
19	(+)-gomisin M ₁	45
20	(+)-gomisin M ₂	45
21	γ-schizandrin	27, 28, 30, 35, 46, 45, 47
22	gomisin S	44
23	gomisin J	23, 24, 29, 32, 39, 41, 48
24	(-)-gomisin K ₁	32, 33
25	(-)-gomisin L ₁	45
26	(-)-gomisin L ₁ -methylether	46
27	(-)-gomisin L ₂	45
28	gomisin N	29, 31, 32
29	wuweizisu C	28, 49
30	gomisin O	31, 32
31	angeloylgomisin O	50, 51, 52, 53
32	benzoylgomisin O	54
33	angeloylisogomisin O	50
34	benzoylisogomisin O	50
35	epigomisin O	31, 32, 51
36	angeloylgomisin Q	53
37	gomisin B	39, 42, 43, 55
38	deangeloylgomisin B	29
39	4-brombenzylester deangeloylgomisinu B	56
40	gomisin C	39, 42, 43, 57
41	gomisin F	39, 43
42	deangeloylgomisin F	39, 43
43	gomisin G	39, 43
44	schizantherin D	30, 49
45	angeloylgomisin P	29, 32, 55
46	tigloylgomisin P	29, 32, 55
47	gomisin D	48, 58
48	gomisin E	31, 51
49	gomisin R	49

Vzorce strukturně vycházejí z dibenzo[a,c]cyklooktadienu viz obr. 1.

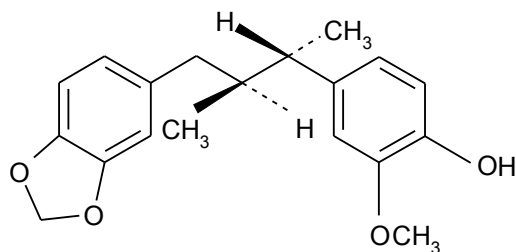


Obr. 1. Základní struktura dibenzo[a,c]cyklooktadienových lignanů

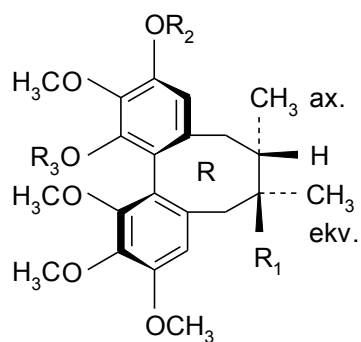


6, 7

Vzorec	Název	R
6	pregomisin	OH
7	meso-dihydroguajaretová kys.	H

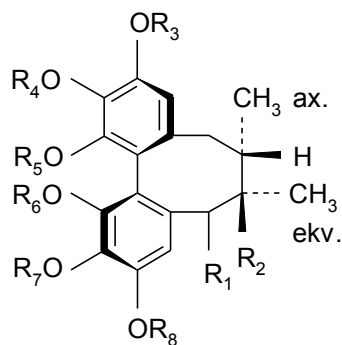


8



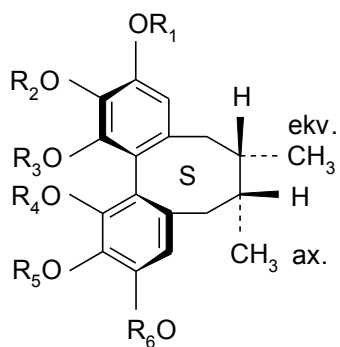
9-16

Vzorec	Název	R ₁	R ₂	R ₃
9	(+)-deoxyschizandrin	H	CH ₃	CH ₃
10	(+)-gomisin K ₂	H	H	CH ₃
11	(+)-gomisin K ₃	H	CH ₃	H
12	schizandrin	OH	CH ₃	CH ₃
13	gomisin H	OH	CH ₃	H
14	angeloylgomisin H	OH	CH ₃	angeloyl
15	benzoylgomisin H	OH	CH ₃	benzoyl
16	tigloylgomisin H	OH	CH ₃	tigloyl



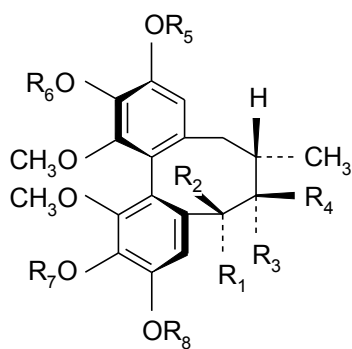
17-22

Vzorec	Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
17	gomisin A	H	OH	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
18	gomisin T	H	OH	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
19	(+)-gomisin M ₁	H	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	-CH ₂ -	
20	(+)-gomisin M ₂	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-CH ₂ -	
21	γ-schizandrin	H	H	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
22	gomisin S	OH	CH ₃	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃



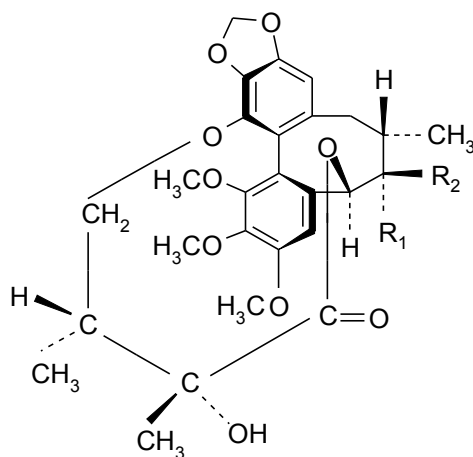
23-29

Vzorec	Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
23	gomisin J	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
24	(-)-gomisin K ₁	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
25	(-)-gomisin L ₁	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	-CH ₂ -	
26	(-)-gomisin L ₁ -methylether	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
27	(-)-gomisin L ₂	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
28	gomisin N	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
29	wuweizisu C	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	



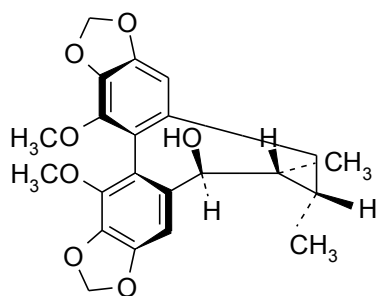
30-46

Vzorec	Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
30	gomisin O	H	OH	CH ₃	H	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
31	angeloylgomisin O	H	O-angeloyl	CH ₃	H	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
32	benzoylgomisin O	H	O-benzoyl	CH ₃	H	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
33	angeloylisogomisin O	H	O-angeloyl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
34	benzoylisogomisin O	H	O-benzoyl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
35	epigomisin O	OH	H	CH ₃	H	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
36	angeloylgomisin Q	H	O-angeloyl	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
37	gomisin B	H	O-angeloyl	OH	CH ₃	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
38	deangeloylgomisin B	H	OH	OH	CH ₃	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
39	4-brombenzoylester deangeloylgomisinu B	H	O-4- brom- benzoyl	OH	CH ₃	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
40	gomisin C	H	O-benzoyl	OH	CH ₃	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
41	gomisin F	H	O-angeloyl	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
42	deangeloylgomisin F	H	OH	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
43	gomisin G	H	O-benzoyl	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -	
44	schizantherin D	H	O-benzoyl	OH	CH ₃	-CH ₂ -		-CH ₂ -	
45	angeloylgomisin P	O- angeloyl	H	CH ₃	OH	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃
46	tigloylgomisin P	O-tigloyl	H	CH ₃	OH	-CH ₂ -		CH ₃	CH ₃



47, 48

Vzorec	Název	R ₁	R ₂
47	gomisin D	OH	CH ₃
48	gomisin E	CH ₃	H



49

Na studiu obsahových látek rodu pracovaly tři kolektivy: sovětský, japonský a čínský. Názvy izolovaných látek vycházejí proto z označení drogy jednotlivými národy. Z tohoto důvodu má řada důležitých látek více názvů. Pro přehled jsou jejich synonyma uvedena v tab. 4.

Tab. 4. Synonyma některých lignanů magnolky

Název	Synonyma
(+)-deoxyschizandrin	schizandrin A, wuweizisu A, dimethylgomisin J
gomisin K ₃	schizanhenol
gomisin A	wuweizichun B, schizandrol B, wuweizi alcohol B, besigomisin, TJN 101
gomisin P	schizandiol
angeloylgomisin P	schizantherin C
gomisin B	schizantherin B, wuweizi ester B, schizandrer B
gomisin C	schizantherin A, wuweizi ester A, schizandrer A
γ-schizandrin	wuweizisu B, schizandrin B, deoxygomisin A
schizandrin	wuweizichun A, wuweizi alkohol A, schizandrol A
gomisin H	norschizandrin
wuweizisu C	schizandrin C

3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA

3.3.1. Adaptogenní účinek

Adaptogeny jsou látky, které zvyšují nespecifickou odolnost organismu proti nepříznivým vlivům různého původu⁵⁹. Jejich působením dochází k ovlivnění stresové reakce. Za normálních okolností dochází na začátku stresové reakce k aktivaci systému hypothalamus-hypofýza-kůra nadledvin (HHN), vyplavení glukokortikoidů do krevního oběhu a zvýšení hladiny cukru. Při současném podání adaptogenu, je vzestup hladiny krevního cukru rychlejší, ale celkově mírnější. Dále dochází ve větší míře k vyplavování kortikoidů a útlumu hypoglykemického účinku inzulínu. V okamžiku, kdy se však stresová reakce rozvine, jsou účinky adaptogenu opačné. Ve srovnání s kontrolními skupinami, kterým není adaptogen podáván, je hladina glukózy nižší.

V druhé fázi zátěže organismu, kdy adreno-glukagonový efekt a HHN reakce přesahují optimální úroveň, vykazuje adaptogen účinky podobné inzulínu, avšak mírnější. V periferních tkáních způsobuje rychlejší průchod glukózy přes buněčné membrány a urychluje její fosforylaci. Bylo prokázáno, že vlivem různých stresových faktorů nabývají β -lipoproteiny krve schopnosti inhibovat metabolismus glukózy, podobně jako při cukrovce. Tomuto projevu dovede adaptogen do velké míry zabránit.

Ve stádiu stresového vyčerpání, kdy jsou v organismu minimální zásoby mobilizovatelné energie a dochází k atrofii nadledvin, udržuje adaptogen fungování systému HHN po delší časový úsek na optimální úrovni a zabraňuje úplnému vyčerpání energetických zdrojů⁶⁰.

Celkové zvýšení nespecifické odolnosti organismu vlivem adaptogenů není však možné vysvětlit pouze na základě jejich zásahu do stresové reakce. Mají jak stimulační, tak tonický účinek, zvyšují tedy výkonnost jak po jednorázové aplikaci, tak při dlouhodobém podávání⁵⁹. Jejich působení je považováno za komplexní, většina rostlinných extraktů s adaptogenním účinkem má i výrazně anabolické, imunostimulační, detoxikační, hepatoprotektivní, psychostimulační a jiné účinky⁵⁹. Nutno konstatovat, že mechanismus účinku rostlinných adaptogenů nebyl dosud plně objasněn.

Při studiu adaptogenního účinku magnolky byl podáván standardizovaný extrakt z plodů několika skupinám atletů v dvojité zaslepené placebem kontrolované studii. Nadměrná fyzická zátěž zvyšuje obsah oxidu dusnatého a hydrokortisonu v krvi a ve slinách. Na počátku testu zvyšoval extrakt koncentraci oxidu dusnatého a hydrokortisonu v krevní plazmě a ve slinách, podobně jako u atletů s nadměrnou fyzickou zátěží. Tyto výsledky korelovaly se zvýšenou fyzickou výkonností atletů užívajících adaptogen ve srovnání s atlety,

kteří dostávali placebo. Naproti tomu po podání adaptogenu nezvýšila nadměrná fyzická zátěž koncentraci oxidu dusnatého a hydrokortisonu ve slinách u těchto sportovců, zatímco u sportovců, kteří dostávali placebo, došlo po nadměrném fyzickém cvičení ke zvýšení koncentrace obou látek. Výsledky ukázaly, že test může být použit pro hodnocení ochranného účinku adaptogenu vůči stresu⁶¹.

3.3.2. Účinky na játra

Hlavní těžiště hepatoprotektivního účinku spočívá v lignanech. V průběhu posledních 20 let ukázala řada studií s izolovanými lignany snížení hladin jaterních proteinů a zvýšení syntézy glykogenu, prokázaly tak ochranný účinek na jaterní tkáň poškozenou tetrachlormethanem a thioacetamidem. Již v 70. letech byly celé plody používány ke snížení patologicky zvýšených hladin transaminas u pacientů postižených chronickou virovou hepatitidou. Mechanismus snížení hladin transaminas byl vysvětlován jako membrány stabilizující aktivita, ačkoliv zde může také existovat útlum jaterních GPT (ALT). Některé lignany mají indukční efekt na jaterní mikrosomální enzymový systém cytochrom P-450, který se podílí na metabolismu xenobiotik. Tímto lze vysvětlit i jejich antitoxické, antikancerogenní a antimutagenní působení. Nejaktivnější látka z hlediska výše jmenovaných účinků je DDB (dimethylester 4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethoxybifenyl-2,2'-dikarboxylové kyseliny), polosyntetický derivát schizandrinu, který výrazně normalizuje jaterní funkce, a má prakticky zanedbatelné vedlejší účinky, v Číně se široce používá jako účinné hepatoprotektivum⁶². Extrakt z plodů je pokládán za prostředek, který vyvolává regeneraci jaterní glutathionové kapacity (*in vitro* i *in vivo*)⁶³. Tento extrakt, obohacený lignany, má výrazné ochranné působení vůči intoxikaci jater potkana tetrachlormethanem a významně udržuje příznivou enzymovou úroveň GSH⁶⁴. Dá se o něm uvažovat jako o ochranné složce přípravku vůči hepatitidám navozeným některými inhalačními anestetiky⁶⁵. Premedikace lignanovou směsí zvyšuje odolnost organismu vůči aflatoxinu B₁ a poškození jaterních buněk, které je způsobené kadmiovými ionty, významný ochranný efekt na játra před toxicitou Cd²⁺ vykazuje gomisin A. Extrakt zvyšuje kapacitu jaterního detoxikačního systému, jak lze pozorovat na zvýšení hladin jaterního GSH, tak i na aktivitách glutathion reductasy a glutathion-S-transferasy⁶⁶. Jisté je, že lignany nemají specifický účinek vůči určitým toxinům poškozujícím játra, mohou však zvýšením antioxidačních a detoxikačních procesů organismu pomoci zlepšit funkční stav jaterní tkáně⁶⁷.

Velká pozornost byla věnována účinku gomisinu A. Tento lignan inhibuje experimentálně navozené jaterní poškození vyvolané použitím tepelně změněného

mikroorganismu. Dokonce i v případě cytotoxických látek stabilizuje buněčné membrány jaterního parenchymu a zabraňuje uvolňování cytotoxických faktorů z aktivovaných jaterních adherentních buněk; zdá se, že může inhibovat i akutní jaterní selhání⁶⁸. Kromě již zmíněných účinků, gomisin A zabraňuje tkáňovým změnám, jako je degenerace a nekróza hepatocytů, zánětlivá buněčná infiltrace a nadměrné ukládání lipidů ve funkční tkáni. Jeho opakované podání zvyšuje hmotnost jater, snižuje hladinu sérových triacylglycerolů a lipidů a významně zvyšuje aktivitu řady enzymových systémů (např. aminopyrin-N-demethylasy, 7-ethoxykumain-D-deethylasy aj.). Tyto změny jsou velmi podobné jako po podání fenobarbitalu. Gomisin A ovšem na rozdíl od fenobarbitalu nesnižuje poměr přežití u myši intoxikovaných tetrachlormethanem. Je tedy velmi doporučitelný jako hepatoprotektivum pro perorální aplikaci a jako látka s antitoxickými, antihyperlipidemickými (především antitriglycerolemickými) vlastnostmi, usnadňující jaterní syntézu proteinů⁶⁹. Gomisin A stimuluje regeneraci jater po částečné hepatektomii zvýšením aktivity ornithindekarboxylasy, což je významný chemický znak časných stádií jaterní regenerace⁷⁰. V pokusu u samců potkana byl v jejich játrech sledován vliv deoxycholové kyseliny (DCA) jako endogenního rizikového faktoru pro vznik jaterního karcinomu. Po dobu 5 týdnů byl aplikován hepatokarcinogen 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzen (3'-MeDAB). V séru byla nalezena několikanásobně zvýšená koncentrace DCA než u potkanů na začátku pokusu. Podáváním gomisinu A (30 mg/kg/den p. o.) byla významně snížena DCA, výskyt preneoplastických lézí a počet oblastí s glutathion-S-transferasou (GST-P) pozitivními ložisky⁷¹. Lignan také významně inhiboval výskyt změn ve stejně založeném pokusu, kdy potkanům byl opět podáván 3'-MeDAB. Při stejné koncentraci gomisinu A (30 mg/kg/den p. o.) se snížila koncentrace azobarviva v játrech a zvýšilo se jeho vylučování žlučí. Lignan zpožďoval navyšování poměru diploidních k tetraploidním jádrům v průběhu příjmu 3'MeDAB. Po eliminaci karcinogenu nebyly v játrech ani ve žluči detekovány karcinogenní štěpné produkty azobarviva, ale podíl zbývajících diploidních jader byl stále vysoký i při dalším podávání gomisinu (0,03 % v potravě). Z výsledků vyplývá, že účinky gomisinu A mají vztah ke zlepšení jaterních funkcí a brání zvratu k abnormální ploidizaci⁷². Po částečné hepatektomii lignan urychluje proliferaci hepatocytů a znovuoobnovení jaterních funkcí, zvyšuje se průtok krve játry⁷³. Má velmi pozitivní vliv na funkci jater v tom smyslu, že po perorálním podání se zvyšuje odtok žlučí (v závislosti na podání), koncentrace žlučových kyselin je v ní však snížena a zvyšuje se průtok krve játry⁷⁴. Základní farmakologie studie gomisinu A byla provedena japonskými autory⁷⁵.

Velmi podobný účinek jako gomisin A vykazuje wuweizisu C, jeho užití je tedy opět při tukové degeneraci jater, nekróze jaterních buněk, buněčné infiltraci, při zánětlivých procesech v játrech a při hepatitidách⁷⁶. Další z lignanů, schizandrin B, má také ochranný účinek (po poškození tetrachlormethanem) působí na úrovni mitochondrií, kde zvyšuje u myši redoxní stav glutathionu v jaterní tkáni^{77, 78}. Při pokusu na diabetických potkanech (diabetes byl pokusně navozen streptozocinem) se zjistilo, že jsou citlivější k poškození jaterní tkáně tetrachlormethanem než jiné modely. Dochází k výraznému zhoršení jaterní glutathion antioxidantně-detoxikační odpovědi na účinek tetrachlormethanu, což bylo dokázáno na poklesu hladin GSH, glukóza-6-fosfát-dehydrogenasy a mikrosomálních GST aktivit při zvyšujících se dávkách tetrachlormethanu. Zatímco byla hladina jaterního GSH u diabetických zvířat zvýšena, hladiny jaterního mitochondriálního GSH a Se-dependentní glutathionperoxidasy byly významně sníženy. Po podání inzulínu byla normalizována většina biochemických procesů ve smyslu odstranění poškození způsobených diabetem. Premedikace inzulínem i schizandrinem B chránily zvířata před intoxikací tetrachlormethanem. Hepatoprotektivita je spojena se zvýšením redoxního stavu jaterního glutathionu jak v cytosolu, tak v mitochondriích, stejně tak jako se zvýšením obsahu jaterní askorbové kyseliny a zvýšením aktivity mikrosomální GST. Z pokusů tedy vyplynulo, že schizandrin B může být využit jako hepatoprotektivní prostředek snižující toxicitu způsobenou xenobiotiky v případě diabetického poškození organismu⁷⁹. Řada derivátů lignanů z magnolky byla zkoumána pro hepatoprotektivní (chemoprotektivní) účinky z hlediska ochrany jater⁸⁰. Výše zmiňovaný lignanový derivát DDB působí ochranu vůči jaterním poškozením způsobené aflatoxinem B₁⁸¹. Tato látka byla široce studována v Číně již před rokem 1990 a použita jako velmi účinné léčivo především pro snížení hladin transaminas⁸².

3.3.3. Imunostimulační efekt

Existuje úzká korelace mezi onemocněním jater a imunitou, což bylo prokázáno již dříve^{83, 84}. Prokázaly to i studie na modelu imunitního poškození jater a zásahu gomisinem A⁸⁵, výsledný hepatoprotektivní efekt je spíše blízký ochrannému účinku na membránu hepatocytů než na inhibici tvorby protilátek a na inhibici komplementové aktivity. Směs z látek obsažených v ženšenu (ginsenosidů R_b a R_g), *Ophiopogon japonicus* (ophiopogoninů B a D), seskvikarenu a chamigrenu z magnolky má schopnost zvyšovat kromě jiného také imunitu organismu⁸⁶.

3.3.4. Neurotropní aktivita

Studie prováděné se schizandrinem ukázaly, že látka tlumí činnost CNS. Z důvodů vysvětlení mechanismu účinku byla sledována koncentrace neurotransmiterů z řady monoaminů (a jejich metabolitů) v mozku potkana. Výsledky pokusů ukazují, že inhibice způsobená tímto lignanem v CNS se vztahuje k dopaminergnímu systému, zvýšení metabolického obratu dopaminu však nemá přímý vztah k dopaminovým receptorům. Koncentrace norepinefrinových metabolitů (MHPG) a metabolitů serotoninových (5-HIAA) vykazují změny v corpus striatum a hypothalamu po podání schizandrinu, avšak norepinefrinové a serotoninové hladiny nejsou ovlivněny⁸⁷.

3.3.5. Antiulcerózní působení

Po perorální aplikaci isoschizandrinu izolovaného z plodů byl u experimentálních zvířat pozorován antiulcerózní efekt na vředy způsobené stresem⁸⁸. Derivát schizandrinu, vzniklý dehydratací látky v pyridinu chloridem fosforylu, snížil rovněž index vředových lézí vznikajících v důsledku experimentálního stresu (potkan)⁸⁹.

3.3.6. Antitoxický účinek

Řada léčiv používaných v terapii zhoubného bujení vykazuje kardiotoxický účinek. Význam antitoxického účinku látek obsažených v magnolce spočívá v tom, že při současné aplikaci s antineoplastikem (např. adriamycin), snižuje magnolka jeho kardiotoxicitu^{90, 91}. Rovněž antitoxický účinek gomisinu A při léčbě látkami, které zhoršují funkční činnost ledvin (puromycinaminonukleotid), byl prokázán jako velmi dobrý⁹².

3.3.7. Antineoplastický účinek

Po navození karcinogeneze 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátem (TPA) a 7,12-dimethylbenz[a]anthracenem vykazovaly dibenzocyklooktadienové lignany, resp. gomisin A, antineoplastický účinek⁹³. Gomisin A, gomisin J a wuweizisu C tlumí schopnost kancerogenních látek, např. již zmíněného acetátu, vyvolávat zánět; nejvyšší aktivita byla zjištěna u gomisinu A, který velmi výrazně potlačoval vývoj tvorby kožních tumorů vlivem TPA u myši s následnou iniciací 7,12-dimethylbenz[a]anthracenem. Předpokládá se, že zabránění růstu tumorů gomisinem A je způsobeno také jeho protizánětlivou aktivitou⁹⁴.

3.3.8. Antioxidační účinky

Látky obsažené v magnolce vykazují, stejně jako jiné adaptogeny, antioxidační účinky, které byly měřeny za použití chemického luminiscenčního testu s Gly-Try, kde jako senzibilizátor sloužil riboflavin. Do studie byly kromě magnolky zařazeny další adaptogenní rostliny: *Eleutherococcus*, *Rhodiola*, *Aralia*, *Echinopanax* a *Panax ginseng*; magnolka byla na stupnici dle snižujícího se efektu až na 5. místě⁹⁵.

Extrakt z plodů podávaný perorálně myším může zvýšit aktivitu SOD a CAT v erythrocytech (20-50 $\mu\text{g/g}$ tělesné hmotnosti)⁹⁶. Řada lignanů z magnolky prokázala útlum lipidové peroxidace v membránách buněk a také zvyšující se schopnost organismu eliminovat aktivní volné kyslíkové radikály za pomoci zvýšení enzymové aktivity SOD a CAT⁹⁷. Na modelové ischemii králičího mozku byl prokázán ochranný efekt extraktu ze *Schizandrae fructus*. Pokusy dokázaly, že tento účinek byl spojen se schopností potlačit lipidovou peroxidaci⁹⁸. Skupina devíti lignanů: (+)-deoxyschizandrin, (+)-schizandrin B, R(+)-wuweizisu C, S(-)-wuweizisu C, schizanhenol, schizandroly A a B byla sledována z hlediska antioxidační aktivity (inhibice Fe/cystein indukované lipidové peroxidace), jejich aktivita se jevila vyšší než je antioxidační aktivita vitamínu E, působí preventivně proti snížení elasticity membrán jaterních mikrozomů, nejvyšší účinek prokázal schizanhenol⁹⁹. Antioxidační účinek gomisinu N, působícího preventivně proti lipidové peroxidaci a pro zlepšení funkčního stavu arterií, je součástí patentu, popisujícího přípravu lékové formy¹⁰⁰. Byla sledována scavengerová aktivita (FRSa) schizandrolu A a schizandrinu B na reaktivní kyslíkové radikály produkované lidskými polymorfonukleárními leukocyty, na hydroxylové radikály a superoxidové anionty a porovnávána s aktivitou vitamínu E a C (všechny látky v koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M). U obou látek byla naměřena vyšší scavengerová aktivita než u vitamínů, v případě superoxidových aniontů byla jejich aktivita vyšší než u vitamínu E, ale nižší než u vitamínu C¹⁰¹. Existují údaje o tom, že FRSa je v případě kyslíkových radikálů závislá na konfiguraci bifenyly; lignany s S – konfigurací mají tuto aktivitu vyšší než ty s konfigurací R¹⁰². Dále byl také studován rozdíl v antioxidační aktivitě některých schizandrinů a schizantherinu mezi modelovými biosystémy a chemosystémy. Antioxidační aktivita schizandrinů A a B a schizantherinu B byla stanovována na hemolýze myších erythrocytů a na autooxidaci linolové kyseliny (iniciační látkou byl 2,2'-azo-[bis(2-amidinopropan)]dihydrochlorid). U všech tří látek bylo prokázáno, že tlumí hemolýzu erythrocytů ale nepůsobí na peroxidaci linolové kyseliny v micelách. Chlorhexidin, který je inhibitorem demethylasy, výrazně tlumil antioxidační aktivitu všech tří látek vzhledem k hemolýze. Výsledky pokusů tedy ukázaly, že methoxyskupiny v lignanech mohou být

demethylovány enzymem demethylasou, který je obsažený v erythrocytech a metabolizovány na látky s fenolickými skupinami, které pak inhibují peroxidaci v membránách erythrocytů¹⁰³. Gomisin C inhibuje respirační vzplanutí v neutrofilech potkana¹⁰⁴. Obsahové látky z plodů magnolky mají tedy prokazatelné antioxidační účinky. Antioxidační účinek preparátu Sheng Mai San, který má působit jako ochrana myokardu proti volným radikálům¹⁰⁵, byl zjištěn jak *in vitro*¹⁰⁶, tak také *in vivo*^{106, 107} na játrech potkana poškozených experimentálně tetrachlormethanem. Antioxidační účinek lignanů ze *Schizandra chinensis* je velmi zajímavý (pro studium FRSA byl použit test s 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem), proto tato droga může být potencionálně zdrojem látek např. pro kosmetické přípravky¹⁰⁸.

3.3.9. Vliv na PAF

Pregomisin a chamigrenal izolované z plodů vykazovaly antagonistickou aktivitu vůči PAF (IC₅₀: pregomisin 4,8.10⁻⁵ M, chamigrenal 1,2.10⁻⁴ M)¹⁰⁹. Při sledování vztahu struktury a účinku lignanů a jejich derivátů jako antagonistů PAF, bylo zjištěno, že silnou aktivitu vykazovaly látky bez esterové skupiny na C-6 a hydroxyly na C-7 nebo bez methylenedioxysestavení, resp. látky s konfigurací bifenyly R. Nejvyšší aktivitu v tomto testu prokázal 6(7)-dehydroschizandrol A (IC₅₀ 2,1.10⁻⁶ M)¹⁶. Schizandrin, gomisin A a schizandrol C měly antagonistickou aktivitu vzhledem k vazbě PAF na receptory trombocytů u pokusných zvířat. Nejsilnějším antagonistou PAF receptorů se ukázal (+)-deoxyschizandrin s IC₅₀ 1,7.10⁻⁵ M (IC₅₀ ginkgolidu B je 1,9.10⁻⁷ M)¹¹⁰.

3.3.10. Antiinvazní účinky

Anthelmintický účinek na *Clonorchis sinensis* vykazoval extrakt z plodů připravený horkou vodou¹¹¹. Byla také pozorována insekticidní aktivita některých lignanů vůči *Drosophila melanogaster* (LC₅₀ pro gomisin B 0,031 M a 0,125 M pro gomisin N)¹¹². Gomisin N a wuweizisu C jako inhibitoři chitinsyntasy II mají slabý antifungální účinek vůči některým patogenům, parazitujícím na člověku¹¹³. Deriváty přírodních dibenzocyklooktadienových lignanů tlumí růst retroviru a jsou s nimi prováděny studie z hlediska potenciálních použití při léčbě HIV infekcí¹¹⁴.

3.3.11. Účinky na krev

Látka izolovaná z plodů – citrostadienol – vykazovala vysokou inhibiční aktivitu na komplementový test (IC₅₀ 4,6.10⁻⁸ M). Účinek je to velmi zajímavý, protože komplementový systém zahrnuje asi 20 sérových proteinů, které jsou aktivovány kaskádou

mechanizmů v tzv. klasické nebo alternativní cestě. Komplementový systém sehrává velmi důležitou roli při alergických a obranných reakcích, při zánětu i při transplantační rejekci¹⁸.

3.3.12. Účinky na pokožku

Při fotochemiluminiscenčním testu se magnolka, ale i další adaptogenní rostliny (*Aralia*, *Echinopanax*, *Eleutherococcus*, *Panax ginseng*) chovala v nízkých koncentracích jako protektor a ve vysokých jako senzibilizér vůči světlu určitých vlnových délek (bylo použito monochromatické světlo). Magnolka vykazovala ze skupiny rostlin druhou největší aktivitu¹¹⁵.

3.3.13. Vliv na různé enzymové systémy

System aldosaředuktasy

Lignany ze *Schizandra chinensis* jsou efektivní při ovlivňování diabetických onemocnění, působí inhibiči aldosaředuktasy¹¹⁶.

System cAMP-fosfodiesterasy

Tetramethylether nordihydroguajaretové kyseliny tlumí cAMP-fosfodiesterasu pravděpodobně podobným mechanismem jako papaverin, protože derivát kyseliny má podobně nízkou konformační energii¹¹⁷.

Metabolismus cholesterolu a lipidů

Některé gomisiny (A, B, J, K₃, L₂, N, benzoylisogomisin O, angeloylgomisin H, tigloylgomisin P), schizandrin, wuweizisu C a schizantherin byly sledovány z hlediska inhibice aktivity jaterní acyl-CoA: cholesterol-acyltransferasy (ACAT) na potkanech. Nejaktivnější z této skupiny látek byl gomisin N (IC₅₀ 25 mM), aktivita dalších se pohybovala v rozmezí IC₅₀ 25-200 mM¹¹⁸.

3.3.14. Protizánětlivý účinek

Lignany z magnolky mají schopnost inhibovat v terapeuticky využitelných dávkách 5-lipoxygenasu (5-LOX) a působí tak protizánětlivě^{119, 120, 121}. Gomisin A byl studován z hlediska zásahu do kaskády arachidonové kyseliny v makrofágu s cílem objasnit jeho inhibiční efekt na vývoj některých jaterních poškození. Látky produkované při metabolismu kyseliny arachidonové – leukotrieny – hrají významnou roli v zánětlivých procesech v jaterní tkáni. Inhibitory tvorby leukotrienů vykazují inhibiční efekt na experimentální poškození jater. Ukázalo se, že po podání gomisinu A byla snížena tvorba leukotrienu B₄, zatímco

aktivita 5-LOX se nezměnila. Uvolňování arachidonové kyseliny z makrofágu po stimulaci Met-Leu-Phe nebo Ca^{2+} ionoforem A23187 bylo sníženo po podání gomisinu A. Z těchto výsledků vyplývá, že lignan inhiboval biosyntézu leukotrienů zamezením uvolňování kyseliny arachidonové a tento efekt může být částečně spojen s inhibičním efektem látky na jaterní poškození¹²².

3.3.15. Antihypertenzní aktivita

Gomisiny H, J, N a G působily jako antagonisté vápníkového kanálu a měly tak schopnost snižovat patologicky zvýšený krevní tlak¹²³.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. POUŽITÝ ROSTLINNÝ MATERIÁL

Kultura magnolky čínské *Schizandra chinensis* (Schizandraceae) byla založena v soukromém arboretu v severních Čechách v podhůří Lužických hor (cca 270 m n. m.). Verifikaci taxonu provedl dr. L. Opletal, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (voucher No 00-26-03-01). Rostlinné části pro izolaci (jednoleté, zčásti zdřevnatělé výhony délky cca 30-60 cm) byly sbírány v průběhu července r. 1994. Tyto liánovité výhony byly rozděleny na část dřevní (kaulomy) a listovou a sušeny při normální teplotě. Po usušení byla droga rozdrobněna, listy na velikost částic 3-5 mm, kaulomy také rozdrobněny (síta II, ČsL 4).

4.2. METODY A CHEMIKÁLIE

4.2.1. Obecné metody

4.2.1.1. Destilace rozpouštědel

Všechna použitá rozpouštědla byla před použitím predestilována. Byly použity běžné metody destilace¹²⁴.

4.2.1.2. Odpařování frakcí

Získané frakce byly odpařovány vakuovou destilací při teplotě do 50 °C a tlaku 1,33 kPa v aparatuře s kapilárou při větších objemech frakcí. Menší objemy byly odpařovány na vakuové odparce za použití difúzní membránové vývěvy Vaccubrand MZ 2C.

4.2.1.3. Vysoušení vzorků

Vzorky byly vysoušeny ve vakuovém exikátoru nad vrstvou oxidu fosforečného za normální teploty a sníženého tlaku (0,66 kPa) po dobu 24 hodin. U vzorků pro analýzu bylo k vysoušení použito vysoušecí zařízení podle Abderhaldena¹²⁴, sušidlem byl oxid fosforečný za tlaku 0,66 kPa při teplotě do 70 °C. Doba sušení se pohybovala v rozmezí 2-5 hodin.

4.2.1.4. Sloupcová chromatografie (CC)

Do skleněné chromatografické kolony se smotkem vaty u výpusti byla nalita suspenze adsorbentu v rozpouštědle, odtokový kohout byl ponechán otevřený. Po usazení adsorbentu byl do vrstvy čistého rozpouštědla nanesen roztěr vzorku s použitým adsorbentem, v některých případech byl nalit přímo roztok vzorku.

Roztěr vzorku byl připraven za tepla, poměr vzorek – adsorbent ve většině případů 1:3. Na vodní lázni bylo odpařeno rozpouštědlo. Roztěr byl vysušen po dobu 24 hodin ve vakuovém exikátoru nad vrstvou oxidu fosforečného při tlaku 0,66 kPa, při laboratorní teplotě.

4.2.1.4.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii

Komerční silikagel byl přesítován na určitou frakci, vyčištěn chloroformem a methanolem a vysušen. Jeho aktivace proběhla v sušárně, za teploty 160 °C po dobu 4 hodin. Po zchladnutí byl přidavkem destilované vody (10 ml vody na 90 g silikagelu) dezaktivován a za stálého třepání ekvilibrován po dobu 1 hodiny.

4.2.1.5. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Byla prováděna na komerční vrstvách, Silufol® s UV indikátorem pro vlnové délky $\lambda = 254$ i 366 nm. Chromatogramy byly vyvíjeny vzestupně ve skleněných vyvíjecích nádobách. Nádoby byly ponechány před vlastní chromatografií uzavřené s eluční soustavou nejméně po dobu 1 hodiny, pro lepší nasycení komor parami mobilní fáze ponechán v komoře list filtračního papíru.

4.2.1.6. Preparativní tenkovrstvá chromatografie (PTLC)

4.2.1.6.1. PTLC na komerčním Silufolu

Desky Silufolu byly promyty 1x čistým rozpouštědlem pro odstranění nečistot a rozpouštědlo bylo odvětráno. Poté již mohlo dojít k nanesení vzorku.

4.2.1.6.2. PTLC na litých vrstvách

Desky s litými vrstvami nebyly již žádným způsobem upravovány, došlo již přímo k nanesení vzorku.

Desky se připravovaly následujícím způsobem. Suspenze silikagelu (5 g silikagelu LS 5/40 μm + 16 ml destilované vody) byla po 30 sekund homogenizována a poté nanesena skleněnou tyčinkou na skleněnou desku o rozměru 150x150 mm a nechána zaschnout při pokojové teplotě nejméně 16 hodin.

4.2.1.7. Měření teploty tání

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku Boetius.

4.2.1.8. NMR spektroskopie

Záznamy NMR spekter byly naměřeny na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300, 300 MHz na katedře anorganické a organické chemie, FaF UK v Hradci Králové a na přístroji Joel, 400 MHz, spektrální šíře 4 kHz ve School of Pharmacy and Biomedical Science, University of Portsmouth, Anglie.

4.2.1.9. Ultrafialová spektroskopie

Pro měření UV spekter jednotlivých skvrn na komerčních deskách pro TLC (např. Silufol® 254 nm) bylo použito přístroje TLC Scanner 3, Camag.

4.2.2. Rozpouštědla, chemikálie a detekční činidla

4.2.2.1. Rozpouštědla

aceton č. (Me_2CO)

n-butanol č. (n-BuOH)

diethylether č. (Et_2O)

ethyl-acetát č. (EtOAc)

ethyl-formiát č. (HCOOEt)

ethanol 95%, denaturovaný 5% methanolem (EtOH)

ethylmethylketon p.a. (EtMeCO)

hexan p. a. (C_6H_{14})

chloroform č., p .a. (CHCl_3)

methanol p. a. (MeOH)

propanol p. a. (PrOH)

pyridin (bezvodý) p. a.

toluen p. a. ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)

4.2.2.2. Chemikálie

β -aminoethylester kyseliny difenylborité č.

anilin č.

p-anisaldehyd č.

p-anisidin č.

bromkresolová zeleň č.

bromthymolová modř č.

difenylamin č.

dusičnan měďnatý č.

dusitan sodný č.

hexakynoželezitan draselný p.a.

hydroxid amonný 25% č. (NH_3OH)

hydroxid draselný č.

hydroxid sodný p.a.

hydroxylamonium chlorid č.

chlorid berberinu č.

chlorid železitý č.

s-kolidin p.a.

kyselina chlorovodíková č.
kyselina fosfomolybdenová č.
kyselina fosforečná č.
kyselina ftalová č.
kyselina mravenčí č. (HCOOH)
kyselina octová p.a. (AcOH)
kyselina sírová p.a.
kyselina sulfanilová č.
kyselina p-toluensulfonová č.
manganistan draselný č.
ninhydrin č.
oxid fosforečný č.
uhličitan sodný bezvodý č.
vanilin č.

4.2.2.3. Detekční činidla

D1¹²⁵ Vanilin-kyselina sírová

1 g vanilinu se rozpustí ve 100 ml 95% ethanolu. Roztok se smíchá před postříkem s konc. kyselinou sírovou v poměru 9:1. Chromatogram se zahřívá 7 minut na 100 °C. Pozitivní reakce se projeví vznikem různě zbarvených skvrn.

D2¹²⁶ Kyselina fosfomolybdenová

Postřík se provádí 10% roztokem kyseliny fosfomolybdenové v ethanolu. Chromatogram se zahřívá při 120 °C po dobu než se objeví modré nebo šedé skvrny na žlutém pozadí.

D3¹²⁷ Chlorid železitý-hexakynoželezitan draselný

1% vodný roztok hexakynoželezitanu draselného a 2% vodný roztok chloridu železitého se těsně před postříkem smíchá v poměru 1:1. Redukující látky reagují za vzniku tmavě modrého zbarvení.

D4¹²⁷ Bromthymolová modř

0,04 g bromthymolové modři se rozpustí v 100 ml 0,01 M hydroxidu sodného. Pozitivní reakce se projeví tvorbou světlých skvrn na tmavě modrém pozadí.

D5¹²⁷ Manganistan draselný neutrální

Detekce se provádí 0,05% vodným roztokem manganistanu draselného. Pozitivní reakce se projeví vznikem žlutých skvrn na bledě fialovém pozadí.

D6¹²⁷ Bromkresolová zeleň

0,04 g bromkresolové zeleně se rozpustí v 100 ml ethanolu a přidává se po kapkách 0,1 M hydroxid sodný do objevení modrého zbarvení. Po postřiku se pozitivní reakce projeví tvorbou žlutých skvrn na modrozeleném pozadí.

D7¹²⁷ Neuovo činidlo

Chromatogram se postříká 1% methanolickým roztokem β -aminoethylesteru kyseliny difenylborité. Látky se sledují v ultrafialovém světle (UV) vlnové délky $\lambda = 254$ a 366 nm, při UV $\lambda = 254$ nm vykazují žlutou, oranžovou či modrou fluorescenci.

D8¹²⁷ Kyselina p-toluensulfonová

Postřík se provádí 20% roztokem p-toluensulfonové kyseliny v chloroformu. Zahřívá se několik minut při 100 °C a vzniklé skvrny se pozorují pod UV $\lambda = 366$ nm.

D9¹²⁷ Paulyho činidlo

4,5 g kyseliny sulfanilové se za mírného zahřátí rozpustí v 45 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a roztok se zředí na 500 ml destilovanou vodou. Potřebné množství na detekci se v poměru 1:1 smísí s 4,5% vodným roztokem dusitanu sodného. Směs se ponechá stát na 15 minut při teplotě 0 °C a těsně před postřikem se přidá 10% vodný roztok uhličitánu sodného opět v poměru 1:1. Pozitivní reakce se projeví vznikem skvrn červeného a oranžového zbarvení.

D10¹²⁸ Berberin

10 mg chloridu berberinu se rozpustí v 100 ml ethanolu. Po postřiku se chromatogram pozoruje pod UV $\lambda = 245$ nm nebo $\lambda = 366$ nm. Pozitivní reakce se projeví vznikem žluté fluorescence.

D11¹²⁷ Anilin-difenylamin-kys. fosforečná

4 g difenylaminu, 4 ml anilinu a 20 ml 85% fosforečné kyseliny se rozpustí v 200 ml acetonu. Chromatogram se zahřívá 10 minut na 85 °C, redukující cukry poskytují různé zbarvení.

D12¹²⁶ Ninhydrin-kolidin

Roztok č. I se připraví smícháním 50 ml 0,2% ninhydrinu v absolutním ethanolu, 10 ml ledové kyseliny octové a 2 ml kolidinu. Těsně před postřikem se smíchá s 1% roztokem dusičnanu měďnatého v absolutním ethanolu (*roztok č. II*) v poměru 5:3. Po postřiku se chromatogram zahřívá 1-2 minuty na 105 °C. Pozitivní reakce se projeví vznikem různě zbarvených skvrn.

D13¹²⁷ Hydroxamátový test

Roztok a: 20 g chloridu hydroxylamonia se rozpustí v 50 ml vody a roztok se naředí do 200 ml ethanolu, uchovává se na chladném místě.

Roztok b: 50 g hydroxidu draselného se rozpustí v minimu destilované vody a roztok se zředí do 500 ml ethanolu.

Roztok a a *b* se smíchají v poměru 1:2 a vysrážený chlorid draselný se odfiltruje. Roztok je stabilní přibližně 2 týdny.

Chromatogram se postřiká činidlem, nechá se vysušit při pokojové teplotě a poté se zdetekuje detekčním činidlem č. II, které se připraví následovně: 10 g praškového chloridu železitého se rozpustí ve 20 ml 36% kyseliny chlorovodíkové a vytřepává s 200 ml diethyletheru dokud se nevytvoří homogenní roztok. Pozitivní reakce se projeví vznikem hnědých skvrn na žlutém pozadí.

D14¹²⁹ p-Anisidin fталát

0,1 M roztok p-anisidinu a 0,1 M roztok kyseliny fталové v ethanolu se smíchá v poměru 1:1. Chromatogram se po postřiku zahřívá při teplotě 100 °C. Cukry a kyseliny glukuronové dávají charakteristické zbarvení.

D15¹²⁹ p-Anisaldehyd-kys. sírová

0,5 ml p-anisaldehydu se smíchá s 10 ml kyseliny octové, 85 ml methanolu a 5 ml kyseliny sírové. Po detekci se chromatogram zahřívá 10 minut při 110 °C. Pozitivní reakce se projeví vznikem různě zbarvených skvrn.

4.2.3. Chromatografické adsorbenty a soustavy

4.2.3.1. Sypké adsorbenty

pro sloupcovou chromatografii:

Silikagel L 100-200 µm (Aldrich), dezaktivovaný 10 % vody

Polyamid N6 (Chemko Strážske, Slovenská republika)

Adsorbent byl upraven dle postupu uvedeného v literatuře¹³⁰. Byla použita frakce o velikosti agregátů 0,1-0,2 mm.

Silpearl® (Kavalier Votice), velmi čistý

Z komerčního preparátu byla použita frakce o velikosti zrna 0,063 mm připravená sítováním. Na suchém sloupci byl adsorbent promyt CHCl_3 , dále MeOH, až z kolony vytékalo bezbarvé rozpouštědlo. Po odstranění přebytečného MeOH odvětráním na bezprašném místě po dobu 4 dní byl adsorbent zahříván v sušárně při 120 °C po dobu 6 hodin.

Silpearl® s UV indikátorem pro $\lambda = 254 \text{ nm}$

pro preparativní účely:

Silikagel LS 5/40 μm

Silikagel L 5/40 μm (Lachema, Brno) byl upraven přidavkem hemihydrátu síranu vápenatého (87 g silikagelu L 5/40 a 13 g hemihydrátu síranu vápenatého). Hemihydrát síranu vápenatého byl připraven následně: rozetřený dihydrát síranu vápenatého byl zahříván v sušárně za občasného promíchání při teplotě 150 °C po dobu 6 hodin.

Silikagel LS 5/40 μm s UV indikátorem pro $\lambda = 254 \text{ nm}$

Silikagel byl připravený z 96,5 g Silikagelu LS 5/40 a 3,5 g indikátoru pro UV $\lambda = 254 \text{ nm}$.

4.2.3.2. Komerční desky

Silufol® 254 nm

Silufol® 254/366 nm

4.2.3.3. Lité vrstvy

Používaly se skleněné desky o rozměru 150x150 mm nebo 75x150 mm připravené výše uvedeným způsobem.

4.2.3.4. Vydíjecí soustavy pro TLC

- S1 CHCl₃-EtOH 98:2
- S2 CHCl₃-EtOH 95:5
- S3 CHCl₃-EtOH 92:8
- S4 CHCl₃-EtOH 9:1
- S5 CHCl₃-EtOH 8:2
- S6 CHCl₃-EtOH 7:3
- S7 CHCl₃-EtOH 2:1
- S8 C₆H₅CH₃-HCOOEt-HCOOH 50:40:10
- S9 CHCl₃-EtOAc-C₆H₅CH₃ 80:20:5
- S10 C₆H₅CH₃-Me₂CO 1:1
- S11 EtOAc-EtMeCO-HCOOH-H₂O 5:3:1:1
- S12 PrOH-H₂O 7:3
- S13 MeOH-CHCl₃-Me₂CO-konc. NH₃OH 42:16,5:25:16,5
- S14 C₆H₅CH₃-EtOAc 7:3
- S15 EtOAc-HCOOH-AcOH-H₂O 100:11:11:27
- S16 n-PrOH
- S17 Et₂O
- S18 CHCl₃
- S19 CHCl₃-EtOAc 9:1

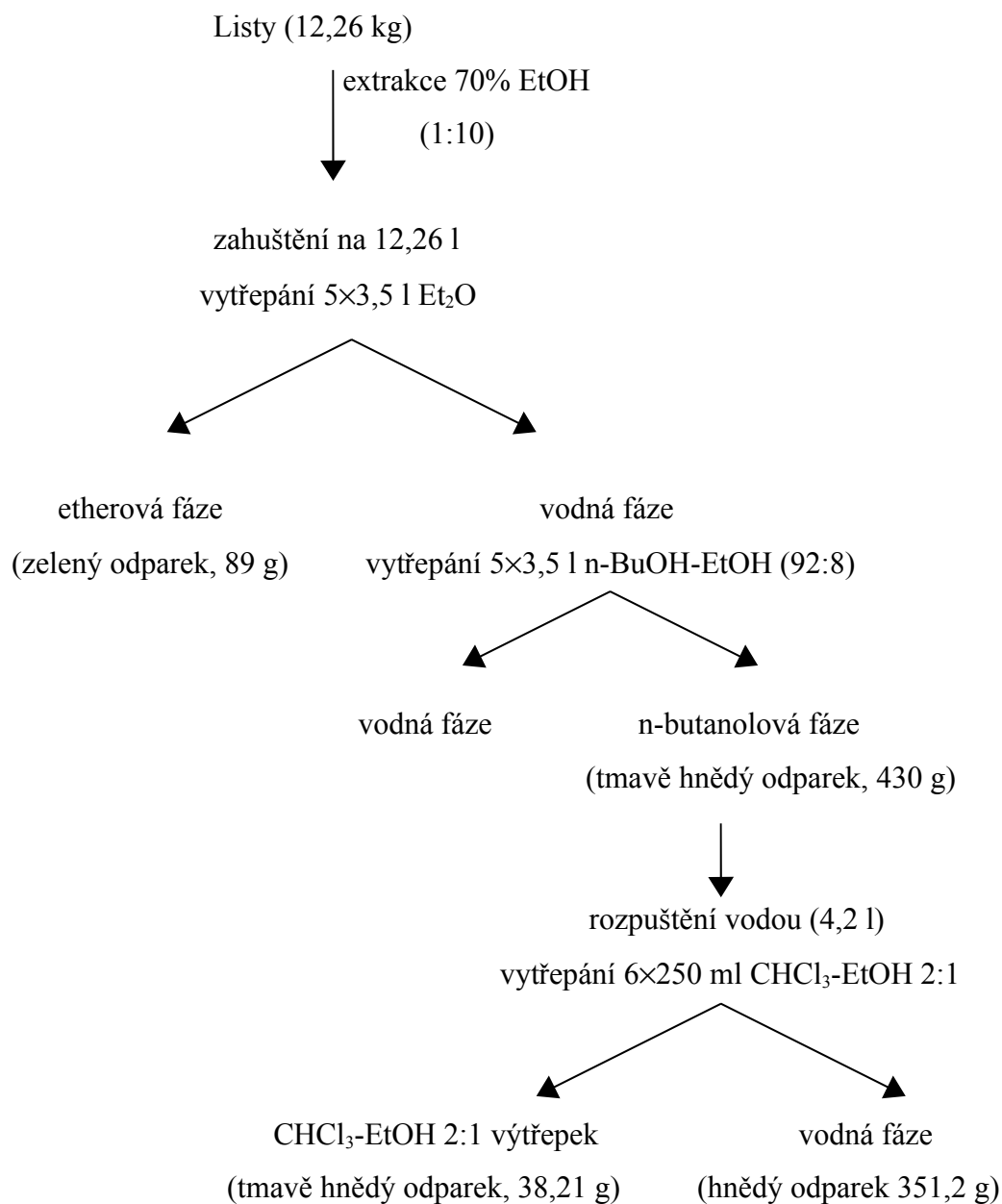
4.2.4. Příprava extraktu

4.2.4.1. Příprava extraktu z listů

12,26 kg na vzduchu usušených, rozdrobněných listů bylo provlhčeno 70% ethanolem (v/v) a následně zalito tímto rozpouštědlem a perkolováno v poměru droga : rozpouštědlo (1:10,3). K perkolaci bylo tedy použito 126 l ethanolu, perkolát byl zahuštěn na přibližně 12 l, zfiltrován a doplněn vodou na 12,26 l. Tento hnědý, kořenně páchnoucí roztok byl vytřepán 5×3,5 l diethyletheru. Vodný zbytek byl vytřepán 5× směsí 3,5 l n-BuOH-EtOH 92:8. Organická fáze byla odpařena a vzniklo 430 g tmavě hnědého, viskozního odparku.

Celé množství butanolového výtřepku bylo následně rozpuštěno ve vodě, na celkový objem 4,2 l (při rozpouštění bylo třeba zahřívát, protože se na dně tvořila za studena nerozpustná tmavě hnědá sraženina). Po částech byl vodný roztok vytřepáván vždy s 250 ml CHCl_3 -EtOH 2:1 (6×). Hmotnost výtřepku CHCl_3 -EtOH 2:1 po odpaření rozpouštědla byla 38,21 g. Vodná fáze byla taktéž odpařena na vakuové odparce, hmotnost odparku $m = 351,2$ g.

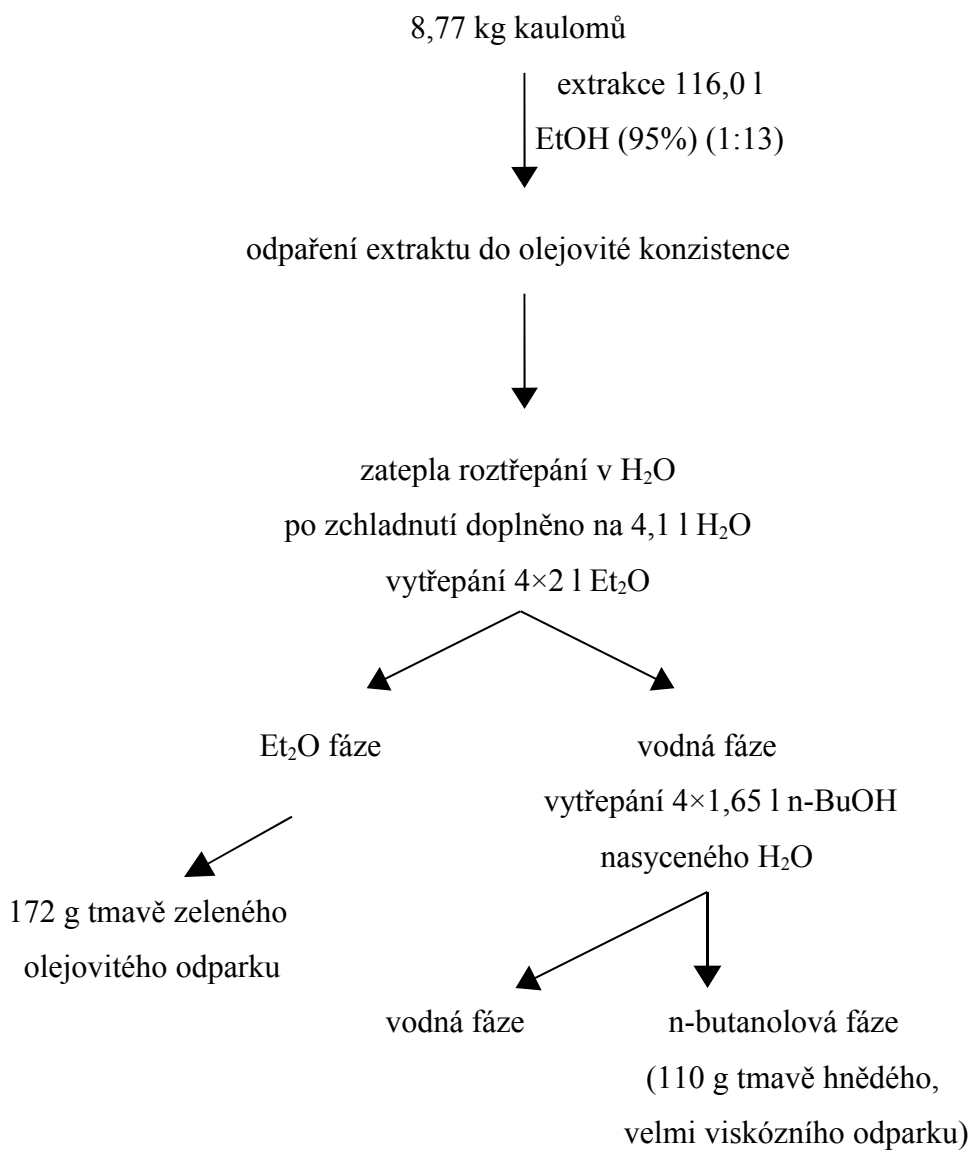
Schéma 1. Extrakce listů



4.2.4.2. Příprava extraktu z kaulomů (provedla Dr. M. Křenková)

Droga (kaulomy) o hmotnosti 8,77 kg byla navlhčena 95% EtOH, zalita rozpouštědlem a po dvou dnech perkolována celkem 116,0 l EtOH (t. j. poměr droga : rozpouštědlo 1:13). Extrakt byl odpařen do olejovité konzistence. Za tepla (80 °C) byl roztrpán v destilované vodě a po zchlazení byl objem doplněn na 4,1 l. Tento roztok byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny a vytřepán 4x2 l Et₂O, odpařením rozpouštědla vzniklo 172 g tmavě zeleného olejovitého odparku, vodná fáze byla vytřepána 4x1,65 l n-BuOH nasyceného H₂O, po odpaření rozpouštědla vzniklo 110 g tmavě hnědého velmi viskózního odparku.

Schéma 2. Extrakce kaulomů



4.3. SLOUPCOVÁ CHROMATOGRRAFIE VÝTŘEPKU CHCl₃-EtOH 2:1 (LISTY)

38,2 g CHCl₃-EtOH 2:1 výtřepku bylo děleno na sloupci za následujících podmínek:

Roztěr: 38,2 g odparku, 50 ml CHCl₃-EtOH 2:1, 60 g adsorbentu

Adsorbent: 300 g silikagel (0,1-0,2 mm, dezaktivovaný 10 % vody)

Vrstva s extraktem: 60x70 mm

Dělicí vrstva: 60x1270 mm

Frakce: 250 ml

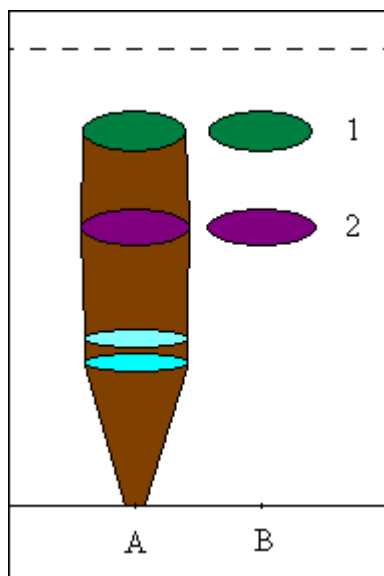
Kontrolní TLC: S4, S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$, 366 nm, D1

Tab. 5. Výsledky sloupcové chromatografie výtřepku CHCl₃-EtOH 2:1

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1-5	CHCl ₃	0,18	čirý, žlutozelený
6-8	CHCl ₃	0,11	čirý, hnědozelený (amorfní, nazelenalý výpadek)
9-14	CHCl ₃	0,28	čirý, slabě hnědozelený (amorfní nažloutlý výpadek)
15-22	CHCl ₃ -EtOH 98:2	0,16	sytě žlutý
23-28	CHCl ₃ -EtOH 95:5	0,06	slabě žlutý (menší světlé krystalky)
29-33	CHCl ₃ -EtOH 95:5	1,28	hnědozelený čirý
34-35	CHCl ₃ -EtOH 90:10	0,46	zelený
36-45	CHCl ₃ -EtOH 90:10	4,07	zelenohnědý (drobné krystalky)
46-51	CHCl ₃ -EtOH 90:10	4,28	zelenohnědý
52-57	CHCl ₃ -EtOH 90:10	2,7	hnědý
58-59	CHCl ₃ -EtOH 90:10	0,67	hnědooranžový (světlé krystalky)
60-74	CHCl ₃ -EtOH 90:10	4,21	oranžovohnědý
75-87	CHCl ₃ -EtOH 85:15	1,19	oranžovohnědý
87-148	CHCl ₃ -EtOH 80:20 (75:25;50:50)	11,83	hnědý

4.3.1. Spojené frakce 6-8

Se silně znečištěnými nazelenalými krystalky ($m = 12$ mg) byla provedena srovnávací TLC s odparkem matečného louhu (S3, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1, obr. 2.).



Obr. 2. Chromatografie spojených frakcí 6-8 (D1)

A - matečný louh frakce 6-8

B - krystalický podíl z frakce 6-8

1 – R_f 0,82 (zelená)

2 – R_f 0,58 (fialová)

114 mg odparku matečného louhu děleno na PTLC pro získání další látky (2 – R_f 0,58) za následujících podmínek:

Adsorbent: Silufol bez indikátoru 5x7,5 cm

Počet desek: 47

Dráha, počet vyvíjení: 60 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S3

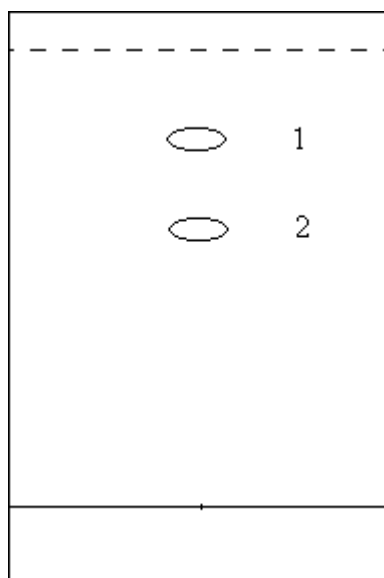
Detekce: na proužku D1

Získána zóna s látkou, eluce 50 ml CHCl_3 -EtOH 1:1. Z roztoku vypadly nazelenalé krystalky, výpadek promyt vychlazeným MeOH. Kontrolní TLC (S3, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1) prokázala, že tento krystalický výpadek ($m = 4$ mg, označen PD-1) je totožný s krystalickým podílem z frakce 6-8 (skvrna 1 – R_f 0,58, opět znečištěná chlorofylem:

zelená skvrna 2 – R_f 0,82). Skvrna 1 – R_f 0,58 není detekovatelná pod UV, reaguje s D3 negativně a pozitivně s D2 (šedomodrá barva) a s D1 (fialová barva).

4.3.2. Spojené frakce 9-14

Krystalický podíl z frakce mechanicky separován, nažloutlé krystalky ($m = 2,2$ mg, označeny PD-2) podrobena TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D2, D3, D4, D5, D9, obr. 3.).



Obr. 3. Chromatografie krystalického podílu spojených frakcí 9-14 (detekce tab. 6.)

1 – R_f 0,71

2 – R_f 0,56

Tab. 6. Tabulka detekčních reakcí krystalického podílu spojených frakcí 9-14

Detekce	Popis reakce	
	1 (R_f 0,71)	2 (R_f 0,56)
UV $\lambda = 254$ nm	zháší	nereaguje
UV $\lambda = 366$ nm	nereaguje	modrá fluorescence
D1	oranžová skvrna	fialová skvrna
D2	modrá skvrna	šedomodrá skvrna
D3	modrá skvrna	modrá skvrna
D4	světlá skvrna	světlá skvrna
D5	nereaguje	nereaguje
D9	nereaguje	nereaguje

4.3.3. Spojené frakce 29-33

1,28 g odparku bylo podrobena sloupcové chromatografii za následujících podmínek:

Roztěr: 1,28 g odparku, 10 ml CHCl₃, 2,5 g adsorbentu

Adsorbent: 133 g silikagelu (0,1-0,2 mm, dezaktivovaný 10 % vody)

Vrstva s extraktem: 25x15 mm

Dělicí vrstva: 25x655 mm

Frakce: 15 ml

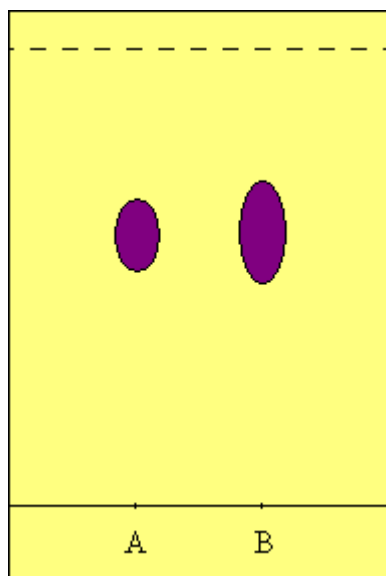
Kontrolní TLC: S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1

Tab. 7. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 29-33

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1-4	CHCl ₃	0,0025	světle hnědý
5-10	CHCl ₃	0,0150	světle hnědý
11-14	CHCl ₃	0,0312	žlutozelený (světlé krystalky)
15-40	CHCl ₃ (CHCl ₃ -EtOH 99:1)	0,3304	zelenohnědý
41-72	CHCl ₃ -EtOH 98:2 (95:5)	0,7127	zelenohnědý (větší množství jehličkovitých krystalků)
73-88	CHCl ₃ -EtOH 90:10	0,0272	zelenohnědý

4.3.3.1. Spojené frakce 29-33/11-14

Krystalky (bílé, m = 8 mg, označené PD-3) vyloučené z frakce byly separovány a podrobeny TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D2, D3, D6). Při UV $\lambda = 254$ nm 1 skvrna (R_f 0,66) zhášející fluorescenci. Po postřiku činidlem D6 se reakce projevila vznikem modrozelené skvrny. Pro podezření na kyselinu provedena srovnávací TLC (S9, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 2x, detekce UV $\lambda = 254$, obr. 4.) se standardem kyseliny skořicové. Přístrojem TLC Scanner 3 byla proměřena UV spektra skvrny (R_f 0,58) látky PD-3 a standardu kyseliny skořicové (R_f 0,58) a spektra byla identická, t. tání 132-133 °C.

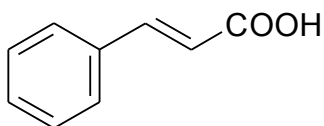


Obr. 4. Chromatografie krystalické látky PD-3 a standardu kys. skořicové (UV $\lambda = 254$ nm)

A – PD-3 (1 fialová skvrna R_f 0,58)

B – kyselina skořicová (1 fialová skvrna R_f 0,58)

Dá se proto předpokládat, že se jedná o (*E*)-skořicovou kyselinu (**50**).



50

4.3.3.2. Spojené frakce 29-33/41-72 a 29-33/73-88

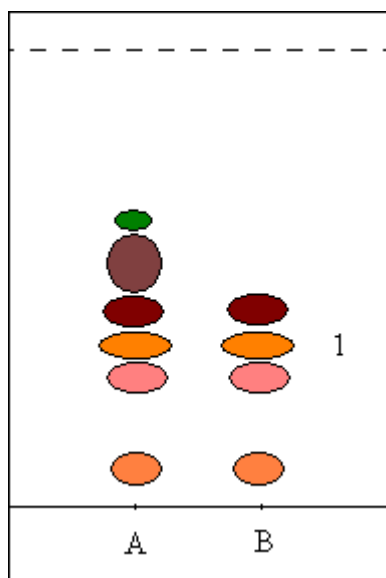
Krystaly ($m = 119,9$ mg, označeny PD-4) z frakce 29-33/41-72 byly separovány. Byla provedena kontrolní TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D2, D3, D5), skvrna měla R_f 0,43.

Tab. 8. Tabulka detekčních reakcí látky PD-4 (skvrna R_f 0,43)

Detekce	Popis reakce
D1	nereaguje
D2	tmavě modrá skvrna na žlutém pozadí
D3	nereaguje
D5	okrová skvrna na růžovém pozadí

Matečný louh 29-33/41-72 spojen s odparkem frakce 29-33/73-88 dle srovnávací TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce D1, obr. 5.)

Po jejich zahuštění v proudu dusíku následoval opětovný výpadek krystalů (47,6 mg), jedná se o látku identickou s látkou PD-4 dle TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D2, D3, D5 – skvrna o $R_f 0,43$). Obě krystalické látky spojeny, celková $m = 167,5$ mg, t. tání $256-276$ °C, pozorovány 2 typy krystalů – shluky t. tání $256-266$ °C a tyčky t. tání $257-276$ °C).



Obr. 5. Srovnávací TLC matečného louhu z frakce 29-33/41-72 a odparku frakce 29-33/73-88 (D1)

A – matečný louh 29-33/41-72

B – 29-33/73-88

1 – $R_f 0,36$ (skořicová)

Dle TLC dále přítomna skvrna 1 ($R_f 0,36$, skořicová barva, viz. obr. 5.) a pro její získání bylo 464 mg spojeného odparku (matečného louhu z frakce 29-33/41-72 a odparku frakcí 29-33/73-88) děleno PTLC za těchto podmínek:

Adsorbent: silikagel LS 5/40 μm (150x150mm) bez indikátoru

Počet desek: 20

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

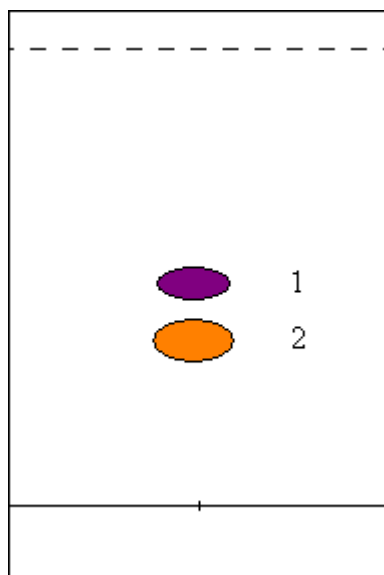
Vyvíjecí soustava: S4

Detekce: UV $\lambda = 254$ nm, okraj zakryté desky D1

Získána 1 zóna, promyta směsí 50 ml CHCl_3 -EtOH 1:1, odpařena, $m = 33$ mg, označena PD-5. Po provedení srovnávací TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1) je patrné, že dochází k rychlému rozkladu látky nebo směsi látek, TLC obsahovalo několik skvrn. Látka PD-5 nebyla dále čištěna.

4.3.4. Spojené frakce 34-35

Na kontrolním TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1, obr. 6.) spojených frakcí 34-35 přítomna stejná skořicová skvrna (R_f 0,36) jako ve spojených frakcích 29-33/41-72 a 29-33/73-88 a jedna další (R_f 0,54), provedena opět PTLC na litých deskách, použit celý odparek $m = 46$ mg.



Obr. 6. Kontrolní TLC spojených frakcí 34-35 (D1)

1 – R_f 0,54 (fialová)

2 – R_f 0,36 (skořicová)

Adsorbent: silikagel LS 5/40 μm (150x150mm) bez indikátoru

Počet desek: 40

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S4

Detekce: UV $\lambda = 366$ nm, okraj zakryté desky D1

Tab. 9. Výsledky PTLC spojených frakcí 34-35

Zóna	R _f	Detekce UV λ = 366 nm	Detekce D1	Eluce	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku
1	0,36	-	skořicová skvrna	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,064	viskózní, oranžový
2	0,54	žlutá skvrna	fialová skvrna	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,046	hnědo- oranžový

Získáno další množství látky (zóna 1, R_f 0,36), ale i v tomto případě docházelo k rychlému rozkladu a látka nebyla dále čištěna. Zóna 2 se dle malého množství odparku a přítomností 2 a více látek nejevila jako perspektivní, dále nezpracována.

4.3.5. Spojené frakce 36-45

4,07 g odparku spojených frakcí 36-45 bylo nanášeno na sloupec polyamidu v roztoku CHCl₃ a chromatografováno za následujících podmínek:

Adsorbent: 130 g polyamidu 0,1-0,2 mm

Vrstva s extraktem: 40x35 mm

Dělicí vrstva: 40x520 mm

Frakce: 25 ml

Kontrolní TLC: S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV λ = 254, 366 nm, D1

Tab. 10. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 36-45

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1-4	CHCl ₃	0,24	žlutý (bílé krystalky)
5-8	CHCl ₃	0,84	zelenohnědý
9-34	CHCl ₃ , CHCl ₃ -EtOH 99:1 (98:2)	1,58	zelenohnědý
35-42	CHCl ₃ -EtOH 98:2 (95:5)	0,12	zelenožlutý
43-52	CHCl ₃ -EtOH 90:10	0,16	žlutý

4.3.5.1. Spojené frakce 36-45/1-4

Výpadek krystalků (jemné bílé, m = 91,7 mg, označeny PD-6) separován, při měření t. tání pozorováno více typů krystalů tajících postupně v rozmezí 205–240 °C. Provedena TLC (S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV λ = 254, 366 nm, D1, D2, D3, D4,

D6, D10). Patrná pouze 1 skvrna (R_f 0,38), která reagovala pozitivně pouze s D2 (tmavě šedá skvrna) a D4 (bílá skvrna na modrém pozadí).

4.3.6. Spojené frakce 46-51

Roztěr odparku spojených frakcí 46-51 nanesen na sloupec silikagelu a dělen za těchto podmínek:

Roztěr: 4,28 g odparku, 15 ml CHCl_3 -EtOH 92:8, 10 g adsorbentu

Adsorbent: 310 g silikagelu (0,1-0,2 mm, dezaktivovaný 10 % vody)

Vrstva s extraktem: 39x18 mm

Dělicí vrstva: 39x690 mm

Frakce: 50 ml

Kontrolní TLC: S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1

Tab. 11. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 46-51

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,12	hnědožlutý (bezbarvé krystaly)
2	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,23	hnědý
3-7	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,18	hnědý (bílé krystaly)
8-10	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,07	žlutohnědý
11-12	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,17	žlutohnědý
13-20	CHCl_3 -EtOH 92:8	1,56	žlutohnědý
21-28	CHCl_3 -EtOH 92:8	0,82	hnědý
29-44	CHCl_3 -EtOH 90:10	0,94	oranžovohnědý
45-55	CHCl_3 -EtOH 80:20	0,12	hnědý

4.3.6.1. Spojené frakce 46-51/13-20

Spojené frakce 46-51/13-20 děleny PTLC na litých vrstvách za účelem získání 5 zón.

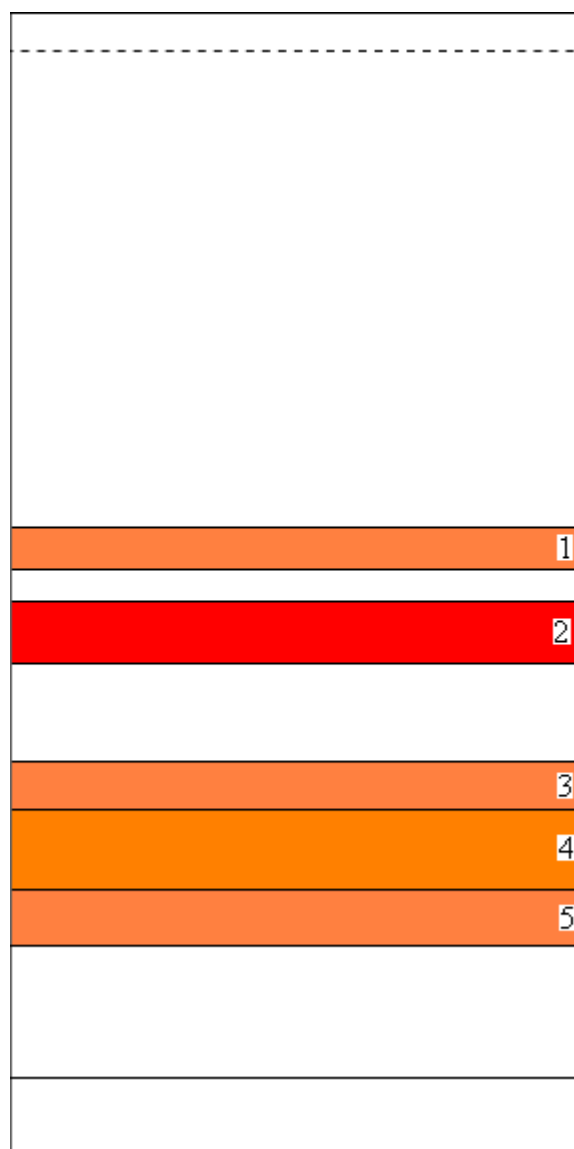
Adsorbent: silikagel LS 5/40 (150x150 mm), bez UV indikátoru

Počet desek: 83

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S10

Detekce: na úzkém proužku desky D9



Obr. 7. PTLC spojené frakce 46-51/13-20 (D9)

1 – zóna 1 (R_f 0,55)

2 – zóna 2 (R_f 0,45)

3 – zóna 3 (R_f 0,29)

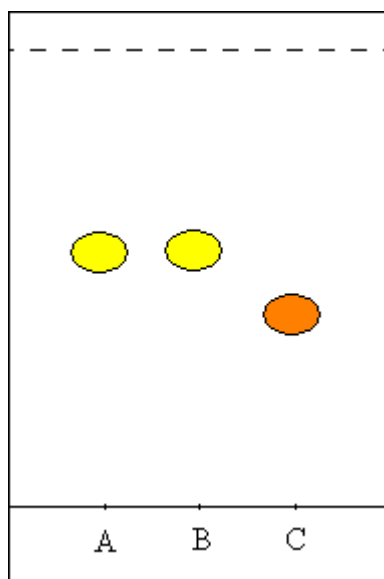
4 – zóna 4 (R_f 0,23)

5 – zóna 5 (R_f 0,15)

Tab. 12. Výsledky PTLC spojených frakcí 46-51/13-20 na litých deskách

Zóna	R _f	Detekce UV λ = 254 nm	Detekce D9	Eluce	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku
1	0,55	žlutá skvrna	oranžová skvrna	MeOH	0,0090	žlutohnědý prášek
2	0,45	-	červená skvrna	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,3208	žlutý
3	0,29	-	oranžová	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,4121	žlutý
4	0,23	-	sytě oranžová	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,0015	žlutý
5	0,15	-	oranžová	CHCl ₃ -EtOH 1:1	0,0045	hnědožlutý

U zóny 1 (R_f 0,55) provedena srovnávací TLC (S10, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1, D2, D3, D7, D9, obr. 8.) s 2 standardy flavonoidů, kemferolem a kvercetinem. Látka (žlutohnědý krystalický prášek, označena PD-7, m = 9 mg) reaguje pozitivně s činidly D1 (oranžová skvrna), D2 (šedá skvrna), D3 (modrá skvrna), D7 (žlutá skvrna) a D9 (žlutá skvrna).



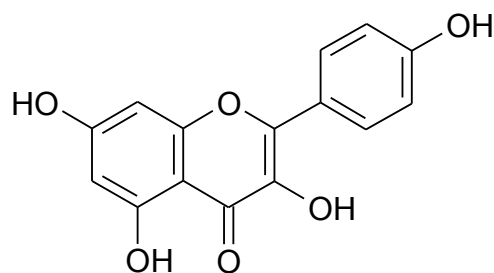
Obr. 8. Srovnávací TLC látky PD-7 se standardy flavonoidů (D9)

A – PD-7 (R_f 0,55)

B – kemferol (R_f 0,55)

C – kvercetin (R_f 0,38)

Dle TLC se dá předpokládat, že by se mohlo jednat o flavonoid kemferol (**51**).



51

4.3.6.1.1. Spojené frakce 46-51/13-20 – zóna 3 a 4

Zóny 3 a 4 (viz. kapitola 4.3.6.1) z PTLC spojených frakcí 46-51/13-20 spojeny, celé množství $m = 0,7329$ g chromatografováno na sloupci polyamidu za uvedených podmínek, pro oddělení skvrny zhášejíci pod UV $\lambda = 366$ nm a fenolické látky reagující s činidlem D9 dle TLC (S10, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 366$ nm, D9).

Roztěr: 0,7329 g odparku, 5 ml CHCl_3 , 3 g adsorbentu

Adsorbent: 20 g polyamidu 0,1-0,2 mm

Vrstva s extraktem: 25x30 mm

Dělicí vrstva: 25x210 mm

Frakce: 5 ml

Kontrolní TLC: S4, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 366$ nm, D9

Tab. 13. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 46-51/13-20 – zóna 3 a 4

Spojené frakce	Eluční soustava	Popis odparku (výpadek)
1-15	hexan- CHCl_3 25:75	žlutooranžový (drobné krystalky)
16-27	hexan- CHCl_3 20:80	žlutý
28-44	hexan- CHCl_3 10:90 (čistý CHCl_3)	světle žlutý

Získané frakce dále již nezpracovány a ponechány ke krystalizaci. Pouze z frakce 46-51/13-20/1-15 odděleny mechanicky krystaly (o hmotnosti $m = 0,2312$ g) a provedena kontrolní TLC (S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D2, D3, D5, D9), dle které je zřejmé se jedná o směs nejméně 4 látek, které nebyly již dále děleny.

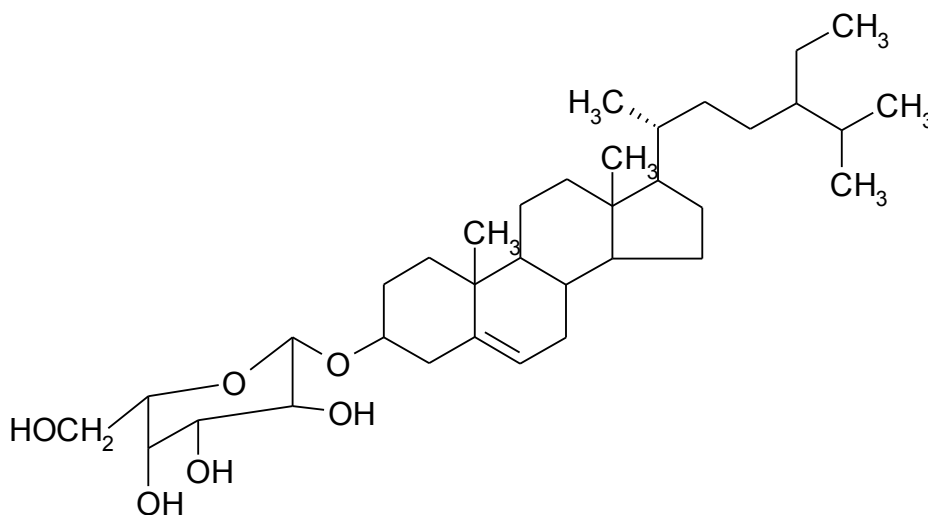
4.3.7. Spojené frakce 58-59

Z frakcí mechanicky oddělena bílá krystalická látka, označená PD-8, o hmotnosti $m = 35$ mg, t. tání 303–306 °C.

Byla proměřena NMR spektra látky PD-8:

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 140.4, 122.3, 101.2, 82.1, 79.3, 76.3, 73.8, 73.7, 70.3, 50.9, 46.0, 42.5, 39.9, 38.9, 37.4, 36.8, 36.3, 36.2, 34.1, 32.1, 32.0, 30.3, 29.8, 29.3, 28.3, 26.3, 24.4, 23.2, 21.1, 19.9, 19.4, 19.1, 18.9, 12.0, 11.9

Vzhledem ke shodě ^{13}C NMR spektra látky PD-8 a spektra glukosid stigmasterolu, lze konstatovat, že se jedná o glukosid stigmasterolu (**52**).



52

Odparek matečného louhu spojených frakcí 58-59 byl dělen na sloupci silikagelu za těchto podmínek:

Roztěr: 0,63 g odparku, 3 ml CHCl_3 -EtOH 1:1, 2 g adsorbentu

Adsorbent: 25 g silikagelu (0,1-0,2 mm, dezaktivovaný 10 % vody)

Vrstva s extraktem: 20x13 mm

Dělicí vrstva: 20x153 mm

Frakce: 3 ml

Kontrolní TLC: S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm

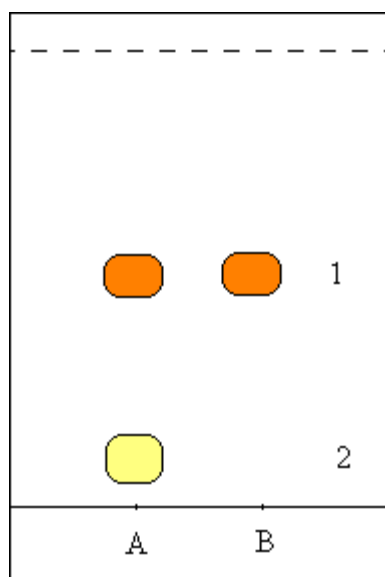
D1

Tab. 14. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 58-59

Spojené frakce	Eluční soustava	Popis odparku (výpadek)
1-2	CHCl ₃ -EtOH 92:8	hnědooranžový
3-8	CHCl ₃ -EtOH 92:8	hnědooranžový
9-20	CHCl ₃ -EtOH 92:8	oranžový (jehličkovité krystalky)
21-23	CHCl ₃ -EtOH 92:8	oranžový (žlutooranžové krystalky)
24-31	CHCl ₃ -EtOH 92:8	oranžový (drobné jemné krystalky)
32-54	CHCl ₃ -EtOH 92:8	žlutooranžový (světlé krystalky)

4.3.7.1. Spojené frakce 58-59/24-31

Vyloučily se krystalky (m = 54 mg), označeny PD-9, z frakce odděleny, matečný louh dále nezpracován. Kontrolní TLC (S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366 \text{ nm}$, D1, D2, D3, D7) ukázala 3 skvrny zřetelné již při detekci UV $\lambda = 254 \text{ nm}$, pozitivně reagují i s činidlem D7. Pro lepší rozdělení byla použita jiná mobilní fáze a provedena srovnávací TLC (S10, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254 \text{ nm}$, D7, obr. 9.) se standardem flavonoidu kvercetin. UV spektra skvrny o $R_f 0,55$ (PD-9) a standardu kvercetin proměřena přístrojem TLC Scanner 3 a jevila se jako identická.



Obr. 9. Srovnávací TLC PD-9 a flavonoidu kvercetin (D7)

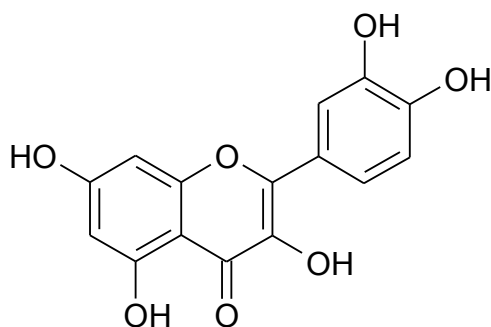
A – PD-9

B – kvercetin

1 – oranžová skvrna ($R_f 0,55$)

2 – žlutá skvrna ($R_f 0,13$)

Dá se předpokládat, že frakce 58-59/24-31 obsahuje kromě dalších látek flavonoid kvercetin (53).



53

4.3.8. Spojené frakce 87-148

Spojené frakce děleny na sloupci polyamidu. V průběhu chromatografie se objevily komplikace, docházelo k rozpouštění adsorbentu a jeho vysrážení v jednotlivých frakcích, což komplikovalo další dělení.

Roztěr: 11,83 g odparku, 15 ml CHCl_3 -EtOH 8:2, 20 g adsorbentu

Adsorbent: 350 g polyamidu 0,1-0,2 mm

Vrstva s extraktem: 60x40 mm

Dělicí vrstva: 60x600 mm

Frakce: 120 ml

Kontrolní TLC: S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366 \text{ nm}$, D7

Tab. 15. Výsledky sloupcové chromatografie spojených frakcí 87-148

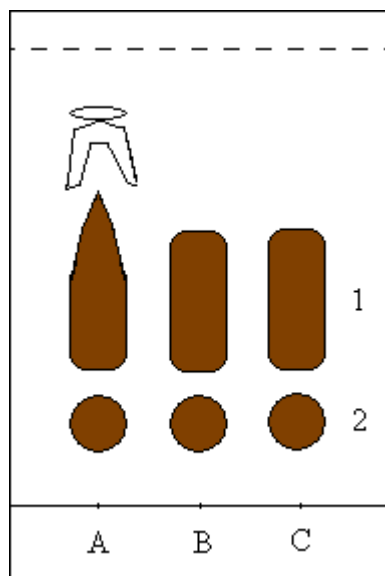
Spojené frakce	Eluční soustava	Popis odparku (výpadek)
1-15	CHCl ₃ -EtOH 99:1	žlutohnědý (jemné krystalky)
16-19	CHCl ₃ -EtOH 98:2	žlutohnědý (jemné krystalky)
20-47	CHCl ₃ -EtOH 98:2 (95:5)	zelenohnědý (drobné krystalky)
48-54	CHCl ₃ -EtOH 90:10	zelenožlutohnědý (jemné krystalky)
55-57	CHCl ₃ -EtOH 90:10	hnědý (hnědožluté krystalky)
58-59	CHCl ₃ -EtOH 90:10	hnědý
60-73	CHCl ₃ -EtOH 90:10	tmavě hnědý (jemné krystalky)
74-103	CHCl ₃ -EtOH 90:10	hnědý (jemné krystalky)
104-149	CHCl ₃ -EtOH 90:10 (80:20, 70:30)	hnědý (jemné krystalky)
150-171	CHCl ₃ -EtOH 70:30	tmavě hnědý (jemné krystalky)
172-173	CHCl ₃ -EtOH 70:30	tmavě hnědý (amorfní výpadek)
174-181	CHCl ₃ -EtOH 70:30	tmavě hnědý (amorfní výpadek)
182-189	CHCl ₃ -EtOH 70:30	tmavě hnědý (jemné krystalky)
190-221	CHCl ₃ -EtOH 70:30 (50:50)	tmavě hnědý (jemné krystalky)
222-245	EtOH	tmavě hnědý (jemné krystalky)

4.3.8.1. Spojené frakce 87-148/20-47

Z frakce byly mechanicky separovány krystalky (drobné bílé, m = 2,3 mg, t. tání 248 – 257 °C - rozvleklá), označeny PD-10, provedena TLC (S5, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D1, D2, D3), látka není detekovatelná žádným z použitých detekčních činidel ani není viditelná při UV $\lambda = 254, 366 \text{ nm}$.

4.3.8.2. Spojené frakce 87-148/182-189

Krystalický výpadek ze spojených frakcí oddělen a přečištěn rekrystalizací. Provedena kontrolní TLC (S6, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366 \text{ nm}$, D1, obr. 10.) a dále byl přečištěný výpadek krystalů, matečný loup a matečný loup po rekrystalizaci dělen na PTLC.



Obr. 10. Kontrolní TLC spojených frakcí 87-148/182-189 (UV $\lambda = 366$ nm)

A – matečný louh 87-148/182-189

B – krystalický výpadek z frakce 87-148/182-189

C – matečný louh po rekrystalizaci

1 – R_f 0,4 (hnědá)

2 – R_f 0,12 (hnědá)

4.3.8.2.1. Dělení matečného louhu po rekrystalizaci (obr. 10. - C)

Matečný louh ($m = 0,1491$ g) po rekrystalizaci dělen na PTLC pro získání skvrny č.1 (R_f 0,4) a skvrny č.2 (R_f 0,12) za těchto podmínek:

Adsorbent: silikagel LS 5/40 (150x150 mm), s UV indikátorem

Počet desek: 15

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S6

Detekce: UV $\lambda = 254$ nm

Získáno $m = 9,4$ mg krystalické látky, ze zóny 2 o R_f 0,12 (označena PD-11, sírově žluté, jemné krystalky, t. tání 169-185 °C) a $m = 20$ mg látky ze zóny 1 o R_f 0,4 (označena PD-12, žlutohnědé ostré krystalky, t. tání 172-190 °C).

4.3.8.2.2. Dělení matečného louhu frakce 87-148/182-189 (obr. 10. - A)

Matečný louh ($m = 0,3588$ g) dělen na PTLC za těchto podmínek:

Adsorbent: silikagel LS 5/40 (95x150 mm), bez UV indikátoru

Počet desek: 35

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S6

Detekce: UV $\lambda = 254$ nm

Získáno $m = 18,5$ mg látky PD-11 (t. tání 172-179 °C) a $m = 55,9$ mg látky PD-12 (t. tání 172-176 °C).

4.3.8.2.3. Dělení krystalického výpadku z frakce 87-148/182-189 (obr. 10. - B)

Krystalický výpadek z frakce ($m = 0,1223$ g) dělen na PTLC za těchto podmínek:

Adsorbent: silikagel LS 5/40 (95x150 mm), bez UV indikátoru

Počet desek: 17

Dráha, počet vyvíjení: 130 mm, 1x

Vyvíjecí soustava: S6

Detekce: UV $\lambda = 254$ nm

Získáno $m = 6,5$ mg látky PD-11 (t. tání 172-185 °C) a $m = 22,6$ mg látky PD-12 (t. tání 164-184 °C).

Provedena kontrolní TLC (S6, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm, D1, D7, D9, tab. 16.).

Tab. 16. Tabulka detekčních reakcí PD-11 a PD-12

Detekce	Popis reakce	
	PD-11	PD-12
UV $\lambda = 254$ nm	zháší	zháší
UV $\lambda = 366$ nm	hnědá skvrna	hnědá skvrna
D1	žlutá skvrna	žlutá skvrna
D7	žlutá skvrna	žlutá skvrna
D9	žlutá skvrna	oranžová skvrna

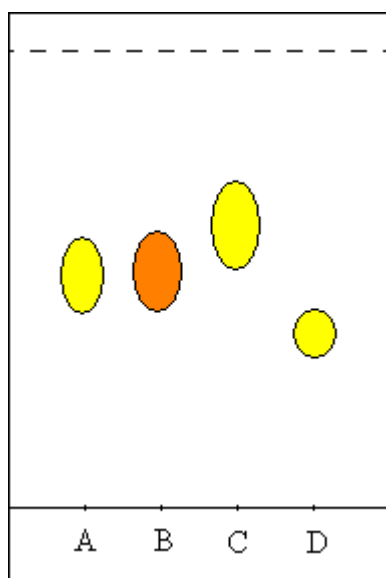
Dle detekčních reakcí se specifickými činidly se dá usuzovat, že PD-11 a PD-12 jsou látky flavonoidní struktury. Vzhledem k naměřeným t. tání jsou vhodné pro další analýzu krystaly separované z matečného louhu (viz. kap. 4.3.8.2.2).

4.3.8.3. Spojené frakce 87-148/190-221

Z frakce byla separována krystalická látka, označena PD-13, $m = 3,4$ mg, tmavě žluté krystalky, t. tání 222-233 °C (rozvleklá). Dle TLC (S11, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D7, obr. 11.) se jedná opět o flavonoidní sloučeninu.

4.3.8.4. Spojené frakce 87-148/222-245

Z frakce byla separována krystalická látka, označena PD-14, $m = 8,6$ mg, světle žluté krystalky. Dle TLC (S11, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D7, obr. 11.) se jedná o flavonoidní látku.



Obr. 11. Srovnávací TLC látek PD-13, PD-14, PD-12 a PD-11 (D7)

A – PD-13 R_f 0,5 (žlutá)

B – PD-14 R_f 0,5 (oranžová)

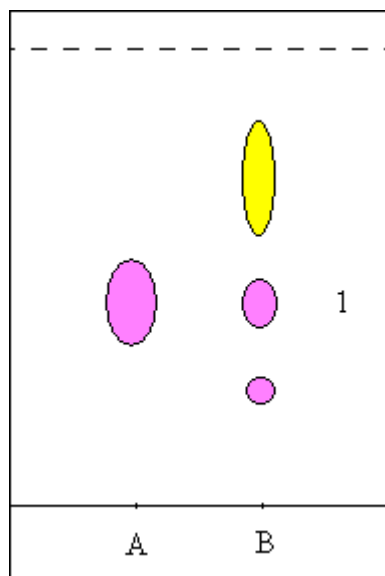
C – PD-12 R_f 0,58 (žlutá)

D – PD-11 R_f 0,36 (žlutá)

4.4. CHROMATOGRRAFIE VODNÉHO ZBYTKU PO VYTŘEPÁNÍ n-BuOH-EtOH 92:8 (LISTY)

Dle TLC (S12, Silufol UV 254, dráha 130 mm, vyvíjeno 1x, D11 – hnědá skvrna R_f 0,41) obsahuje vodný odparek cukry.

Další srovnávací TLC vodného odparku a standardu isoleucinu (S12, Silufol UV 254, dráha 130 mm, vyvíjeno 1x, D12, obr. 12.) poukázala na možnou přítomnost aminokyseliny isoleucinu.



Obr. 12. Srovnávací TLC vodného odparku a standardu isoleucinu (D12)

A – standard isoleucinu

B – vodný zbytek

1 – R_f 0,48

351,2 g tmavě hnědého, velmi viskózního odparku bylo rozpuštěno ve studené vodě, vznikl zakalený roztok, z něj odfiltrována tmavě hnědá sraženina kondenzačních produktů, za vzniku 5350 ml hnědého matečného louhu. Tento roztok byl nanesen na sloupec polyamidu a chromatografován za následujících podmínek:

Adsorbent: 1540 g polyamidu 0,1-0,2 mm

Dělicí vrstva: 140x330 mm

Frakce: 500 ml

Kontrolní TLC: S13, Silufol UV 254 nm, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$, 366 nm, D1

Tab. 17. Výsledky sloupcové chromatografie vodného zbytku (na polyamidu)

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1-2	voda	17,91	světle žlutý, konzistence medu
3-13	voda	32,28	světle oranžový, konzistence medu
14-17	voda	6,69	světle hnědý, konzistence medu
18-25	voda	7,21	tmavě hnědý
26-48	voda	16,66	tmavě hnědý
49-57	ethanol-voda 1:1	58,78	tmavě hnědý (zelenožluté krystaly)

4.4.1. Spojené frakce 1-2

Dle orientační TLC (S12, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D11) frakce pravděpodobně obsahuje cukry, provedena acetylace.

4 g odparku byly acetylovány v 40 ml pyridinu acetanhydridem (10 ml), po dobu 6 hodin při 90 °C, po oddestilování rozpouštědla byl sklovitý zbytek rozpuštěn v CHCl₃, promyt 0,2M HCl, 0,5M uhličitanem sodným, vodou a odpařen. Odparek (2,45 g) byl pro přečištění dělen na sloupci silikagelu, nanesen v roztoku (rozpuštědlo i eluční soustava: CHCl₃).

Adsorbent: 125 g silikagelu (0,1-0,2 mm, dezaktivován 10 % vody)

Dělicí vrstva: 25x610 mm

Frakce: 40 ml

Kontrolní TLC: S18, Silufol UV 254 nm, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D13

Jímané frakce odpařeny, z odparku 2 g bylo po krystalizaci z chloroformu získáno 90,8 mg, bílých krystalků, t. tání = 114-193 °C, pozorováno více typů krystalů, které tály postupně v tomto velkém teplotním rozmezí. Látka označena PD-15.

4.4.2. Spojené frakce 3-13

Dle orientační TLC (S12, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D11) frakce také obsahuje cukry, provedena acetylace.

4 g odparku byly acetylovány v 40 ml pyridinu acetanhydridem (10 ml), po dobu 6 hodin při 90 °C, po oddestilování rozpouštědla byl sklovitý zbytek rozpuštěn v EtOAc, promyt 0,2M HCl, 0,5M uhličitanem sodným, vodou a odpařen. Odparek (1,3 g) byl pro přečištění dělen na sloupci silikagelu, nanesen v roztoku (rozpuštědlo i eluční soustava: toluen-EtOAc 7:3).

Adsorbent: 65 g silikagelu (0,1-0,2 mm, dezaktivován 10 % vody)

Dělicí vrstva: 25x290 mm

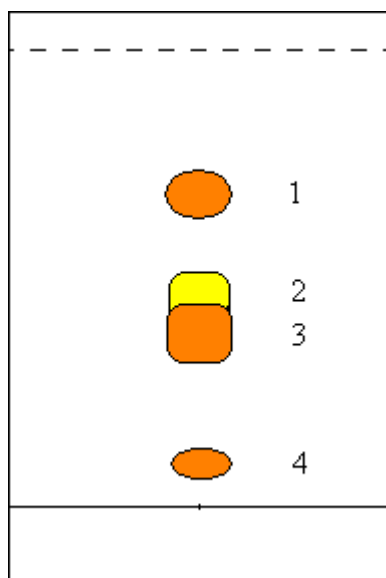
Frakce: 20 ml

Kontrolní TLC: S14, Silufol UV 254 nm, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D13

Jímané frakce odpařeny, z odparku 730,4 mg bylo po krystalizaci z chloroformu získáno 57,7 mg bílých krystalků, t. tání = 102-209 °C, opět pozorováno více typů krystalů, které tály v tomto teplotním rozmezí, látka označena PD-16.

4.4.3. Spojené frakce 49-57

Zelenožlutý krystalický podíl, který se z frakce vyloučil, obsahoval dle TLC (S15, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D7, obr. 13.) minimálně 4 flavonoidní látky.



Obr. 13. Chromatografie krystalického podílu spojených frakcí 49-57 (D7)

1 – R_f 0,63 (oranžová)

2 – R_f 0,45 (žlutá)

3 – R_f 0,36 (oranžová)

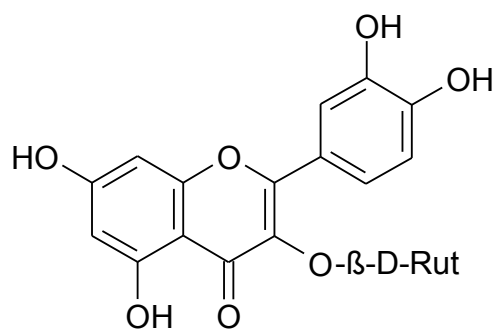
4 – R_f 0,08 (oranžová)

Soustava S15 nemohla být použita za účelem PTLC, způsobovala polymerizaci.

500 mg této směsi bylo acetylováno při 40 °C po dobu 3 hodin, poté ponecháno při pokojové teplotě 16 hodin a následně zpracováno obvyklým způsobem. Vzniklá směs acetylderivátů byla chromatografována TLC (S19, Silufol UV 254, dráha 60 mm,

vyvíjeno 3x, detekce UV $\lambda = 254, 366$ nm). Ukázalo se však, že směs obsahuje mnoho látek, patrně v důsledku částečného rozkladu při zpracování, a proto bylo od jejího dalšího čištění upuštěno.

Odparek spojených frakcí 49-57 byl dále dělen za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), dělení se však nedařilo, největší podíl byl zahuštěn a vyloučily se krystaly. Výpadek krystalů byl překrystalizován ve vodě. Bylo získáno 40 mg žlutozelených krystalků, t. tání 184-192 °C (rozvleklá), látka označena PD-17. Byla provedena srovnávací TLC (S15, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, D7) se standardem rutinu, R_f standardu i látky 0,4. Dá se tedy předpokládat, že by se mohlo jednat o flavonoid rutin (**54**).



54

Rut = rutinosa (6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glukopyranosyl-)

4.5. CHROMATOGRRAFIE n-BUTANOLOVÉHO VÝTŘEPKU (KAULOMY)

Z n-BuOH výtřepku byly odebrány 3 g a provedena zkušební chromatografie, pro její úspěšnost byl následně celý zbývající podíl o hmotnosti $m = 107,0$ g podroben chromatografii za již odzkoušených podmínek.

Roztěr: 107 g odparku, 200 ml EtOH, 125 g adsorbentu

Adsorbent: 700 g polyamidu 0,1-0,2 mm

Vrstva s extraktem: 75x115 mm

Dělicí vrstva: 75x550 mm

Frakce: 500 ml

Kontrolní TLC: S11, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$, 366 nm, D1

Tab. 18. Výsledky sloupcové chromatografie n-BuOH výtřepku

Spojené frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1-5	voda	47,81	tmavě hnědý
6	EtOH	9,51	tmavě hnědý
7-8	EtOH	6,94	tmavě hnědý
9-12	EtOH	3,05	tmavě hnědý
13-23	EtOH	2,56	tmavě hnědý

4.5.1. Spojené frakce 1–5

Dle TLC (S16, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 3x, D14, D15) frakce obsahuje cukry, frakce 1-5 dělena na suchém sloupci za následujících podmínek:

Roztěr: 20 g odparku, 40 ml destilované vody, 50 g adsorbentu

Adsorbent: 400 g silpearlu s UV indikátorem

Vrstva s extraktem: 75x45 mm

Dělicí vrstva: 75x250 mm

Frakce: jímány dle TLC

Kontrolní TLC: S16, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$, 366 nm, D14

Následně provedena chromatografie na suchém sloupci za stejných podmínek se zbývajícím množstvím frakce 1-5, tj. $m = 27,81$ g. Získány 4 podíly (viz. tab. 19.).

Tab. 19. Výsledky dělení spojených frakcí 1-5 na suchém sloupci

Frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
1	propanol	3,84	tmavě hnědý
2	propanol	4,46	tmavě hnědý
3	propanol	5,2	tmavě hnědý
4	propanol	9,83	tmavě hnědý

4.5.1.1. Spojené frakce 1-5/1

Frakce 1-5/1 dělena na sloupci silpearlu za těchto podmínek:

Roztěr: 3,84 g odparku, 6 ml EtOH, 10 g adsorbentu

Adsorbent: 200 g silpearlu

Frakce: jímány dle TLC

Kontrolní TLC: S16, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$, 366 nm, D14

Tab. 20. Výsledky dělení frakce 1-5/1 na suchém sloupci

Frakce	Eluční soustava	Hmotnost odparku (g)	Popis odparku (výpadek)
V1	propanol	0,22	hnědý
V2	propanol	0,77	tmavě hnědý
V3	propanol	0,56	hnědý (světle hnědé krystalky)
V4	propanol	0,42	tmavě hnědý
V5	propanol	0,33	tmavě hnědý

4.5.1.1.1. Frakce 1-5/1/V3

Z podílu V3 vypadly světle hnědé krystalky, promyty EtOAc, odseparovány, hmotnost $m = 330$ mg.

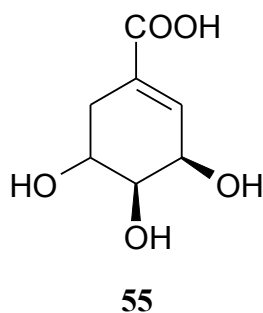
Při TLC (S11, Silufol UV 254, dráha 60 mm, vyvíjeno 1x, detekce UV $\lambda = 254$ nm) viditelná 1 skvrna o R_f 0,06 (světle modrá), při další kontrolní TLC ale přítomny již 2 skvrny (R_f 0,06 – světle modrá skvrna a R_f 0,58 – fialově fluoreskující skvrna), z čeho je patrné, že látka se rozkládá.

Byla proměřena NMR spektra látky z frakce 1-5/1/V3, označena PD-18:

^1H NMR (300MHz, CD_3OD) δ 6.81-6.77 (1H, m CH), 4.41-4.32 (1H, m, OCH), 4.04-3.93 (1H, m, OCH), 3.67 (1H, dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 4.1$ Hz, OCH), 2.75-2.62 (1H, m, CH_2), 2.25-2.12 (1H, m, CH_2)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 170.4, 138.5, 131.1, 72.8, 68.4, 67.4, 31.7

Na základě shody ^{13}C NMR spektra látky PD-18 se spektrem kyseliny šikimové, lze konstatovat, že vzorek V3 je kyselina šikimová (**55**).



5. DISKUSE

Magnolka čínská patří mezi prvních dvacet nejčastěji používaných léčivých rostlin v asijské medicíně; hlavní používanou drogou jsou plody (*Schizandrae fructus*), kterou lze najít v ruském, japonském a čínském lékopise. Za hlavní obsahové látky jsou pokládány lignany a do jisté míry také silice. Ačkoliv bylo o obou skupinách látek publikováno za posledních 50 let poměrně velké množství vědeckých studií (minimálně 200 prací), bývá tato léčivá droga používána v souladu se zvyklostmi tradiční lokální terapeutické praxe (např. v čínském lékopise je doporučována ke snížení vylučování potu, je uvedeno, že působí adstringentně (*shoulian guse*), posiluje *qi* a napomáhá zvýšení aktivního flegmatu (*yiqi shengjin*), přivádí energii k dráze orbis renalis a má uklidňující účinky (*xinji shimian*)¹³¹.

Používání plodů (případně semen) magnolky je známé a nesporné; dosud však nebyla věnována významná pozornost vegetativním částem rostliny (kaulomům a listům). Existují pouze stručné údaje o tom, že „dřevo“ (kaulomy) mohou sloužit jako surovina pro průmyslovou izolaci významných lignanů¹³². Jednorázovým stanovením 6 hlavních lignanů (sběr vzorků z pěstovaných rostlin v roce 1994) se zabývala M. Křenková¹²⁵:

Tab. 21. Souhrnná tabulka s výsledky stanovení 6 hlavních lignanů v drogách *S. chinensis* (1994)

Droga	Průměrný obsah lignanů v droze v %					
	schizandrin	gomisin A	deoxyschizandrin	γ -schizandrin	gomisin N	wuweizisu C
kaulomy	0,216 ± 0,036	0,153 ± 0,016	0,04 ± 0,006	0,042 ± 0,006	0,026 ± 0,003	0,005 ± 0,001
listy	0,084 ± 0,004	0,034 ± 0,003	0,029 ± 0,005	0,023 ± 0,003	0,024 ± 0,001	0,007 ± 0,001
semena	1,102 ± 0,073	0,345 ± 0,023	0,249 ± 0,015	0,541 ± 0,039	0,054 ± 0,006	0,003 ± 0,001

V dalším studiu (porovnání s obsahem lignanů v následujících letech, resp. souvislost s klimatickými podmínkami) nebylo dosud pokračováno. Z tabulky je patrné, že celkový obsah lignanů se pohyboval v roce 1994 v kaulomech na hranici 0,482 %, v listech 0,201 % a v semenech 2,294 %, tj. přibližně v poměru kaulomy : listy : semena = 2,4 : 1 : 11,4. Je tedy zřejmé, že optimální hlavní surovinou jsou semena (plody), kaulomy a zejména listy mohou sloužit jako surovina náhradní. Z praktického hlediska je však nutno vzít v úvahu, že plody magnolky čínské jsou dovozním materiálem (jehož kvalita neodpovídá ve všech případech lékopisným parametrům např. čínského lékopisu) a z antiimportního hlediska tedy stojí za úvahu se vegetativními částmi zabývat. Prozatím to nikdo neprovedl a tak zůstává otázka, zda produkce vegetativních částí by nebyla nakonec v podmínkách ČR finančně nákladnější než jejich dovoz z Číny nebo některých oblastí SNS.

Hlavním důvodem fytochemického studia kaulomů a listů byla však v mém případě snaha o izolaci látek, které dosud v taxonu popsány nebyly a mohly by disponovat zajímavými biologickými účinky. Polární extrakty z kaulomů ani listů nebyly dosud z fytochemického hlediska sledovány (diethyletherové výtřepků z listů sledoval M. Jirkovský¹³³, z kaulomů M. Křenková¹²⁵). Nebylo vůbec zřejmé, jaké látky lze při tomto studiu očekávat. Je škoda, že řada izolovaných látek nemohla být z hlediska strukturního určena, nebyla pro to nalezena vhodná spektroskopická pracoviště a dostatek finančních prostředků. Celkově byly izolovány následující látky:

Tab. 22. Látky izolované z vegetativních částí magnolky čínské

Označení	Droga	Původ (spojené frakce)	Hmotnost (mg)	Struktura
PD-1	listy	6-8	4,0	neurčena
PD-2	listy	9-14	2,2	neurčena
PD-3	listy	29-33/11-14	8,0	(<i>E</i>)-skořicová kyselina
PD-4	listy	29-33/41-72, 29-33/73-88	167,5	neurčena**
PD-5	listy	29-33/41-72, 29-33/73-88	33,0	neurčena*
PD-6	listy	36-45/1-4	91,7	neurčena**
PD-7	listy	46-51/13-20	9,0	kemferol
PD-8	listy	58-59	35,0	stigmasterol-glukosid
PD-9	listy	58-59/24-31	54,0	kvercetin
PD-10	listy	87-148/20-47	2,3	neurčena
PD-11	listy	87-148/182-189	34,4	neurčena (flavonoid)
PD-12	listy	87-148/182-189	98,5	neurčena (flavonoid)
PD-13	listy	87-148/190-221	3,4	neurčena (flavonoid)
PD-14	listy	87-148/222-245	8,6	neurčena (flavonoid)
PD-15	listy	1-2	90,8	neurčena**
PD-16	listy	3-13	57,7	neurčena**
PD-17	listy	49-57	40,0	rutin
PD-18	kaulomy	1-5/1/V3	330,0	šikimová kyselina

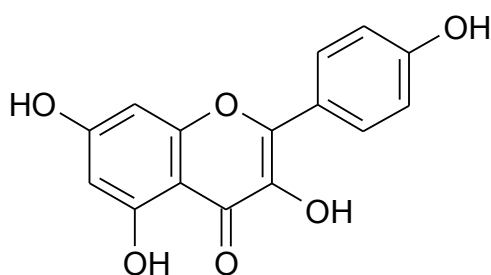
* při čištění docházelo k poměrně rychlému rozkladu

** krystalická směs

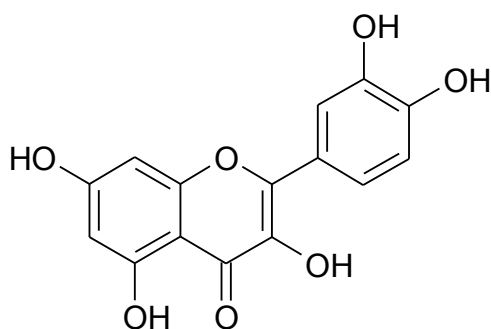
Některé z těchto izolovaných látek byly identifikovány na základě porovnání s dostupnými standardy (skořicová kyselina, flavonoidy), jiné byly podrobeny bližší strukturní analýze (stigmasterol-glukosid, šikimová kyselina).

Při zhodnocení této fytochemické studie je nutné konstatovat, že nebyly nalezeny žádné metabolity, které by posunuly významným způsobem poznání v oblasti biologické aktivity vegetativních částí magnolky čínské.

U polárních extraktů z listů bylo možné už dříve předpokládat, že budou obsahovat nemalé množství flavonoidních látek a z mé práce se zdá, že i sacharidů. Výskyt flavonoidních aglykonů ve vegetativních částech magnolky publikovali ve svých diplomových pracech už I. Tichý a Z. Graja^{134, 135}, kteří izolovali kemferol (**56**) a kvercetin (**57**). Oba aglykony (zde PD-7 a PD-9) jsou strukturně blízké látky, které jsou nejběžnějšími aglykony, nalézány v rostlinném materiálu.



56



57

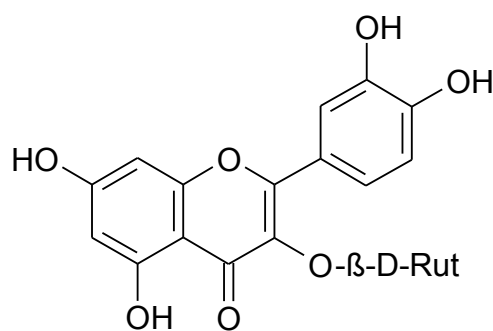
To, že se vyskytly zde, v polárním extraktu z listů, je spíše náhoda; tyto látky byly v předchozích pokusech vytřepány do ethyl-acetátu, je však jisté, že vyjmutí do tohoto rozpouštědla nebylo kvantitativní, a proto byly izolovány zde, ovšem už ve velmi malém množství.

Kemferol se běžně (a v nemalém obsahu) vyskytuje v ovoci, zelenině a čaji. Vykazuje protizánětlivé a zejména výrazné antioxidační vlastnosti v makrofágu a neuronech (chrání

např. kryší kortikální neurony před toxicitou amyloidního β -proteinu minimalizací produkce ROS a inhibicí kaspasové aktivity). Snižuje produkci PGE_2 a nitritu v myším makrofágu supresí induktabilní COX-2 a i-NOS. Má také určité imunoregulační vlastnosti, působí přímo na T-buňky inhibicí produkce Th1 cytokinu a snížením tvorby nebo expanze CD8^+ CTLs. Konzumace zeleniny s vysokým obsahem této látky (česnek) může přispět k ochraně před osteoporózou u starší žen (uvádí se, že to může být způsobeno určitým vlivem na estrogení β -receptor).¹³⁶

Kvercetin je kromě svého antioxidačního (antiradikálového) účinku poměrně silným inhibítorem TNF- β , který kontroluje expresi genů kódujících tvorbu prozánětlivých cytokinů, chemokinů, adhezních molekul a indukčních enzymů (COX-2, i-NOS), růstových faktorů a receptorů uplatňujících se v imunitních reakcích. Byl u něj popsán také výrazný antiproliferační účinek vůči různým typům nádorových buněk (karcinom prostaty), antibakteriální aktivita (tlumí růst *Salmonella* sp.). Také kvercetin (podobně jako kemferol) působí protektivně na cévní systém, inhibuje trombocytární agregaci, může stimulovat osteoblastickou aktivitu, působit proti osteoporóze a podílet se na prevenci kolorektálního karcinomu. Zajímavé jsou účinky obou látek (některých jejich glykosidů a methyletherů) na růst kolonií *Helicobacter pylori*: kvercetin má slabou aktivitu, aktivita jeho 3-methyletheru je však výrazně vyšší, stejně tak jako některých složených rhamnopyranosidů. Kemferol výrazně potlačuje růst kolonií bakterie, oba aglykony (a jejich glykosidy) se na potlačení růstu *H. pylori* podílejí.

Rutin [3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on] (**58**) je antioxidant, zhášec volných radikálů a chelátor železa. Byl u něj nalezen pozitivní vliv na snížení kapilární fragility a permeability, ačkoliv provedené studie jsou v tomto ohledu nepřesvědčivé. Působí vazokonstrikčně, antiedematózně a protizánětlivě. V novějších studiích je popsána inhibice neenzymové lipidové peroxidace, antiradikálový účinek (snížení koncentrace superoxidového aniontu) a tlumení aktivity myeloperoxidasy. Snižuje také aktivitu 5-LOX, 12-LOX, COX, fosfolipasy A_2 , nepřímo snižuje trombocytární agregaci stimulací syntézy prostacyklinů a EDRF v endotelu cév.



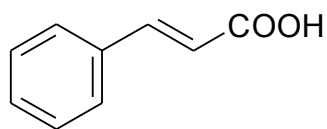
58

Rut = rutinosa (6-O- α -L-rhamnopyranosyl-D-glukopyranosyl-)

Působí velmi příznivě v případě střevních zánětů. Jako aditivum do potravy vykázal aditivní účinek proti poškození DNA způsobeném hepatokarcinogeny. In vitro vykazuje rutosid četné další biologické účinky jejichž terapeutická relevantnost je však nejistá; tlumí aktivitu aldosa reductasy a neenzymovou glykosylaci proteinů (Maillard). Dalšími účinky jsou brždění účinku Na^+/K^+ -ATPasy na myokard a skeletární svaly, tlumení účinku cAMP-dependentní fosfodiesterasy a ovlivnění aktivity myosin-ATPasy. Rutin se váže na benzodiazepinový receptor, má analgetické vlastnosti, které jsou vysvětlitelné na základě interference s prostacykliny. Vykazuje také antimutagenní účinek a působení proti aflatoxinu B₁.

Po p. o. aplikaci je rutin hydrolyzován v GIT za vzniku kvercetinu, zodpovědného údajně za řadu účinků rutinu. Ukazuje se, že kvercetin vzniklý z rutinu je absorbován lépe u žen než u mužů; rozdíly v biologické dostupnosti u obou pohlaví nejsou ještě uzavřeny. Resorbováno je až 50 % perorálně podané dávky; po bakteriální hydrolýze se ve střevě uvolňuje aglykon, který je detekovatelný ve volné a konjugované formě (látka podléhá patrně enterohepatálnímu oběhu). V krvi se nacházejí 4 hlavní metabolity. Rutin je používán jako ochranný prostředek vaskulárního systému, pro snížení kapilární permeability a fragility, žilních varixech, posttrombotickém syndromu, ulcus cruris, vnitřnímu krvácení, hemoroidům, prevenci iktu a prevenci mukositózy spojené s léčbou nádorů. V kombinaci s trypsinem a bromelainem je používán perorálně při osteoartritidě.

(*E*)-Skořicová kyselina (**59**) se v přírodních zdrojích vyskytuje relativně běžně (podobně jako ostatní aromatické kyseliny), její koncentrace však bývá nízká (kromě hlavních zdrojů jako je např. styraxová pryskyřice, peruánský balzám a další klejopryskyřice) – vyšší koncentrace je všude tam, kde se výrazně uplatňuje metabolismus fenyylpropanoidů.

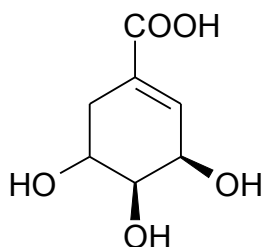


59

Zdá se, že čeleď Schizandraceae tvoří výjimku, ve vegetativních částech magnolky čínské (a je kuriózní, že v listech) je přítomna pouze volná kyselina skořicová (v silici nebyl nalezen cinnamaldehyd, ani se v tkáních nevyskytují estery, tak jak je to běžné u taxonů, poskytujících výše uvedené klejoprskyřice). Její výskyt v tomto sekvenčně získaném, polárním extraktu, je spíše náhodný, tato látka je vytřepávána už diethyletherem, případně rozpouštědly podobné polaritě a ve vodných zbytcích se nevyskytuje. Její nízká koncentrace, zjištěná v tomto extraktu svědčí o tom, že v předchozím postupu nebyly méně polárně látky dostatečně odděleny.

U této sloučeniny byly nalezeny anestetické, anthelmintické účinky a tlumí také radikaci *Helicobacter pylori*.

Šikimová kyselina (**60**) je interadiátním produktem, ve velkém počtu rostlin (a mikroorganismů) se běžně vyskytující. Poprvé byla izolována z plodů shikimi (*Illicium anisatum* L.).



60

Šikimátová (chorismátová, isochorismátová) cesta vede biosynteticky ke vzniku důležitých primárních a sekundárních metabolitů (aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu, indolových derivátů, např. tryptofanu, řadě alkaloidů a dalších aromatických sloučenin, mezi nimi také tříslovin, flavonoidů a ligninu). Ve farmaceutickém průmyslu hraje šikimová kyselina v současnosti dosti významnou roli, protože je výchozím materiálem pro výrobu neuramidového inhibitoru oseltamaviru (Tamiflu), používaného jako profylaktického a terapeutického prostředku při ovlivňování některých závažných virových onemocnění (ptačí chřipka).

Z ostatních látek, které dosud nebyly identifikovány a z předběžného studia frakcí v průběhu izolace je patrné, že především polární frakce extraktů z listů obsahují nemalé množství oligosacharidů (které zde však nebyly identifikovány).

Uvedené výsledky dávají tušit, že především v listech je kromě sacharidů významné množství fenolických látek – zdá se, že podstatně vyšší než lignanů cyklooktadienového typu. Přítomnost kyseliny šikimové naznačuje velmi intenzivní biosyntetické pochody vedoucí ke vzniku benzopyronového skeletu. Jak tyto flavonoidy, tak skořicová kyselina tlumí růst *Helicobacter pylori* a zde nelze jinak, než dát za pravdu zkušenosti lidového léčitelství národům Dálného Východu, kteří doporučovali nadzemní části jako náhražku čaje (ačkoliv pití klasického čaje je v dálně-východní oblasti Ruska záležitostí historicky tak běžnou a tradiční, že lze jen těžko předpokládat teritoriální nedostatek této pochutiny). Tento názor je velmi racionální – bylo zjištěno, že flavany (katechin, epikatechin a některé oligoprocyanidiny) zejména zeleného čaje mají tlumivý účinek na rozvoj růstu *Helicobacter* v žaludku člověka. Proto může mít použití listů magnolky čínské příznivý efekt na případnou eradikaci *Helicobacter pylori*. Dalším příznivým biologickým účinkem je adaptogenní a chemoprotektivní vliv přítomných lignanů.

6. SOUHRN

Petra Dadáková: Fytochemický výzkum nadzemní části *Schizandra chinensis* (TURZ.)BAILL.

Cílem této práce bylo získání alespoň 1 obsahové látky v čistém stavu a určení jejich fyzikálně - chemických charakteristik z polárních n-butanolových výtřepků extraktu listů a kaulomů *Schizandra chinensis* (TURZ.)BAILL., Schizandraceae. K separaci látek bylo využito sloupcové a preparativní tenkovrstvé chromatografie. Byly získány 2 látky v čistém stavu, glukosid stigmasterolu a kyselina šikimová, jejich struktura byla určena za využití NMR spektroskopie. Dále bylo získáno 18 krystalických podílů, jednalo se většinou o 1 látku nebo směs více látek. Dle tenkovrstvé chromatografie a využití specifických detekčních činidel se dá usuzovat ve většině případů na přítomnost flavonoidních látek (např. kvercetin, kemferol, rutin, popř. jejich *O*-glykosidy), dále jiné látky fenolické povahy (např. (*E*)-skořicová kyselina) a sacharidy.

Hlavní obsahové látky plodů (semen), tj. silice a ~60 lignanů dibenzo[a,c]cyklooktadienového typu jsou v morfologických částech magnolky zastoupeny v přibližném poměru kaulomy : listy : semena = 2,4 : 1 : 11,4, kaulomy a listy proto nemohou být hlavním zdrojem lignanů s výrazně antioxidačními, chemoprotektivními a adaptogenními účinky, ale pouze zdrojem sekundárním. Přítomnost flavonoidů odvozených od kemferolu a kvercetinu a dále (*E*)-skořicové kyseliny je logickým vysvětlením, proč je v oblastech původního výskytu nadzemní část doporučována jako náhražka čaje (obě skupiny látek působí podobně jako zelený čaj příznivě při eradikaci *Helicobacter pylori*).

SUMMARY (ABSTRACT)

Petra Dadáková: Phytochemical Research of the Aerial Part of *Schizandra Chinensis* (TURZ.)BAILL.

The work was aimed at isolating of at least one constituent from the polar n-butanolic extract of the leaves and cauloms of *Schizandra chinensis* (TURZ.)BAILL., Schizandraceae, and at physico-chemical characterization of the isolated substance. The separation was performed by means of column and preparatory thin layer chromatography. Two pure compounds were obtained – stigmasterol glucoside and shikimic acid – and their structures were determined by NMR spectroscopy. Moreover, 18 crystalline fractions containing mainly one compound or a mixture of several compounds were separated. According to TLC combined with the usage of specific detection reagents, these fractions contain predominantly flavonoid substances, e.g. quercetin, kaempferol, rutin and/or their glycosides, other phenolic substances such as cinnamic acid, and saccharides.

The constituents typical for fruits (seeds), *i.e.* essential oil and aproximately 60 lignans of dibenzo[*a,c*]cyclooctadiene type, are contained in individual morphological parts, *i.e.* cauloms, leaves and seeds in the approximate ratio 2.4 : 1 : 11.4, respectively. Hence, cauloms and leaves cannot serve as primary source of lignans with strong antioxidative, chemoprotective and agaptogenic properties. They can only be used as a secondary raw materials.

The presence of flavonoids, derived from kaempferol and quercetin, and (*E*)-cinnamic acid is a logical explanation of the fact that the aerial parts have been recommended as a substitute for tea in the regions of original occurrence of the plant. Both classes of compounds have a favourable effects similar to that of the green tea and are useful in the *Helicobacter pylori* eradication.

7. LITERATURA

- ¹ Opletal, L., Opletalová, V.: Lék a jeho vývoj v dějinách. Karolinum, Praha 1999, s. 71.
- ² Opletal, L., Opletalová, V.: Adaptogeny rostlinného původu, Pokroky ve farmacii č. 10. Avicenum, Praha 1990, s. 1-153.
- ³ Tolmačev, A. I. (ed.): Atlas arealov i resursov lekarstvennyh rastenij. GUGK, Moskva 1980.
- ⁴ Palibin, I. V.: Flora SSSR, díl VII, Izdat. Akad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad 1937.
- ⁵ Kolbasina, E. I.: Rastit. Resur. 6, 1970, 596.
- ⁶ Heganuer, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen. Bd 6, Birkhauser Verlag, Basel 1973.
- ⁷ Juraševskij, N. K.: Sov. Bot., č. 2, 1935, 108.
- ⁸ Prikldovskaja, P. F.: Bjull. glav. bot. Sada Akad. Nauk SSSR, č. 65, 1967, 49.
- ⁹ Suprunov, N. I.: Biologičeski aktivnyje reščestva plodov i jagod. Kolos, Moskva, 1976.
- ¹⁰ Zapotyloko, F. T.: Ž. pril. Chim. 18, 1945, 704.
- ¹¹ Suprunov, N. I.: Rastit. Resur. 9, 1973, 570.
- ¹² Štěrbakova, M. N.: Apt. Dělo 12, 1963, č.1, 33.
- ¹³ Xia, Y., Li, Z., Zhu, D. et al.: Zhougguo Zhougguo Zazhi 23, 230, 1998. In: Chem. Abst. 130, 122157, 1999.
- ¹⁴ Yamara, S., Sakamoto, Ch., Nohava, T. et al.: Shouakugaku Zasshi 47, 1993, 420.
- ¹⁵ Chen, Ch.-Ch., Sheu, Ch.-Ch., Shih, Y.-Z. et al.: J. Nat. Prod. 57, 1994, 1164.
- ¹⁶ Lee, I. S., Jung, K. Y., Oh, S. R. et al.: Biol. Pharm. Bull. 22, 1999, 265.
- ¹⁷ Liu, J., Wng, W., Huang, M.: Zhoncayao 21, 294, 1990. In: Chem. Abstr. 113, 217928, 1990.
- ¹⁸ Lee, I. S., Oh, S. R., Jung, K. Y. et al.: Int. J. Pharmacogn. 35, 1997, 358.
- ¹⁹ Motl, O., Bucharov, V. G., Herout, V. et al.: Chem. Ind. (London), 1963, 1759.
- ²⁰ Ohta, Y., Hirose, Y.: Tetrahedron Lett. 1968, 1251.
- ²¹ Ohta, Y., Hirose, Y.: Tetrahedron Lett. 1968, 2483.
- ²² Ikeya, I., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 26, 1978, 682.
- ²³ Ikeya, I., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 1583.
- ²⁴ Lee, I. S., Jung, K. Y., Oh, S. R. et al.: Biol. Pharm. Bull. 22, 1999, 265.
- ²⁵ Liu, G.-T. In: Advances in Chinese Medicinals Materials Research. World Sci, Singapore, 1985, 257.
- ²⁶ Kočetkov, N. K., Chorlin, A. J., Chižov, O. S.: Tetrahedron Lett. 1962, 361.
- ²⁷ Kočetkov, N. K., Chorlin, A. J., Chižov, O. S.: Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Chim., 1964, 1036.
- ²⁸ Chen, Y.-Y., Shu, Z.-B., Li, L.-N.: Sci. Sin. 19, 1976, 276.

- ²⁹ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull 26, 1978, 3257.
- ³⁰ Liu, C.-S., Fang, S.-D., Huang, M.-F. et al.: Sci. Sin. 21, 1978, 483.
- ³¹ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 2695.
- ³² Ikeya, Y., Taguchi, H., Sasaki, H. et al.: Chem. Pharm. Bull. 28, 1980, 2414.
- ³³ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 28, 1980, 2422.
- ³⁴ Balandin, D. A.: Priroda 1950, č. 3, 55.
- ³⁵ Kočetkov, N. K., Chorlin, A. J., Chižov, O.: Ž. obšč. Chim. 31, 1961, 3454.
- ³⁶ Kočetkov, N. K., Chorlin, A. J., Chižov, O. S. et al.: Tetrahedron Lett 1961, 730.
- ³⁷ Chen, Y.-P., Liu, R., Hsu, H.-Y. et al.: Bull. Chem. Soc. Jap. 50, 1977, 1824.
- ³⁸ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 26, 1978, 328.
- ³⁹ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 1383.
- ⁴⁰ Kočetkov, N. K., Chorlin, A. J., Chižov, O. S. et al.: Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Chim. 1962, 850.
- ⁴¹ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 1576.
- ⁴² Taguchi, H., Ikeya, Y.: Chem. Pharm. Bull. 23, 1975, 3296.
- ⁴³ Taguchi, H., Ikeya, Y.: Chem. Pharm. Bull. 25, 1977, 364.
- ⁴⁴ Ikeya, I., et al.: Chem. Pharm. Bull. 36, 1988, 3974.
- ⁴⁵ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 30, 1982, 132.
- ⁴⁶ Hikino, H., Kiso, Y., Taguchi, H. et al.: Planta Med. 50, 1984, 213.
- ⁴⁷ Tan, R., Li, L.-N., Fang, Q.: Planta med. 1986, 49.
- ⁴⁸ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 1395.
- ⁴⁹ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 30, 1982, 3207.
- ⁵⁰ Ikeya, Y., Ookawa, N., Taguchi, H. et al.: Chem. Pharm. Bull. 30, 1982, 3202.
- ⁵¹ Taguchi, H., Ikeya, Y., Yosioka, I.: Koen Yoshishu-Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai 1979, 299. In: Chem. Abstr. 93, 1980, 362338g.
- ⁵² Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I.: Chem. Pharm. Bull. 27, 1979, 2536.
- ⁵³ Ikeya, Y., Taguchi, H.: Chem. Pharm. Bull. 29, 1981, 2893.
- ⁵⁴ Chen, Ch.-Ch., Shen, Ch.-Ch., Shen, Ch.-Ch., Shih, Y.-Z. et al.: J. Nat. Prod. 57, 1994, 1164.
- ⁵⁵ Ikeya, Y., Taguchi, H., Yosioka, I. et al.: Chem. Pharm. Bull. 28, 1980, 3357.
- ⁵⁶ Anonym: K' o Hsueh T' ung Pao 22, 1977, 504. In: Chem. Abstr. 88, 1978, 68067z.
- ⁵⁷ Chen, Y.-Y., Li, L.-N.: Hua Hsueh Pao, 34, 1976, 45. In: Chem. Abstr. 86, 1977, 167860t.
- ⁵⁸ Ikeya, Y., Taguchi, H., Litaka, Y.: Tetrahedron Lett. 1976, 1359.
- ⁵⁹ Brechman, I. I., Dardymov, I. V.: Ann. Rev. Pharmacol. 9, 1969, 419.

- ⁶⁰ Medexport: Eleuterokokk – strategija primenjenja i novyje dannyje fundamental'nyh issledovaniy, Moskva bez udani roku.
- ⁶¹ Panossian, A. G., Oganessian, A. S., Ambartsumian, M. et al.: *Phytomedicine* 6, 1999, 17.
- ⁶² Li, X. Z.: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1991 (Suppl.2) 31.
- ⁶³ Ko, K.-M., Mak, D. H. F., Li, P.-Ch. et al.: *Jpn. J. Pharmacol* 69, 1995, 439.
- ⁶⁴ Ko, K. M., Ip, S. P., Poon, M. K. T. et al.: *Planta Med.* 61, 1995, 134.
- ⁶⁵ Ni, J., Fujii, K., Sato, N. et al.: *J. Appl. Toxicol.* 13, 1993, 385.
- ⁶⁶ Eybl, V., Koutenský, J. Koutenská, M. et al.: *proc. Sat. Symp. 4th World Conf. Clin. Pharmacol. Therapeutics, Praha 1989*, 87.
- ⁶⁷ Ip, S. P., Mak, D. L., Li, P. C. et al.: *Pharmacol. Toxicol.* 78, 1996, 413.
- ⁶⁸ Tsutsui, H., Mizoguchi, Y., Miyajima, K. et al.: *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 84, 670, 1987. In: *Chem. Abstr.* 107, 127 117, 1987.
- ⁶⁹ Takeda, S., Maemua, S., Sudo, K. et al.: *Nippon Yakurigaku Zasshi* 87, 1986, 169.
- ⁷⁰ Kubo, S., Ohkura, Y., Mizoguchi, Y. et al.: *Planta Med.* 58, 1992, 489.
- ⁷¹ Ohtaki, Y., Hida, T., Hiramatsu, K. et al.: *Anticancer. Res.* 16, 1996, 751.
- ⁷² Nomura, M., Ohtaki, Y., Aizawa, T. et al.: *Anticancer. Res.* 14 (5A), 1994, 1967.
- ⁷³ Takeda, S., Kase, Y., Arai, I. et al.: *Nippon Yakurigaku Zasshi* 88, 1986, 321.
- ⁷⁴ Takeda, S., Arai, I., Hasegawa, M. et al.: *Nippon Yakurigaku Zasshi* 91, 1988, 237.
- ⁷⁵ Takeda, S., Kase, Y., Ohkura, Y. et al.: *Oyo Yakuri* 33, 229, 1987. In: *Chem. Abstr.* 107, 70 274, 1987.
- ⁷⁶ Takeda, S., Funo, S., Iizuka, A., et al.: *Nippon Yakurigaku Zasshi* 85, 1985, 193.
- ⁷⁷ Ip, S. P., Poon, M. K., Wu, S. S. et al.: *Planta Med.* 61, 1995, 398.
- ⁷⁸ Ip, S. P., Poon, M. K., Che, C. T. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 21, 1996, 709.
- ⁷⁹ Mak, D. H., Ko, K. M.: *Mol. Cell Biochem.* 175, 1997, 225.
- ⁸⁰ Wu, W. L., Chen, S. E., Chang, W. L. et al.: *Eur. J. Med. Chem.* 27, 1992, 353.
- ⁸¹ Liu, T. Y., Hwua, Y. S., Chao, T. W. et al.: *Cancer Lett.* 89, 1995, 201.
- ⁸² Tong, Q.: *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuah Hsueh Pao* 12, 1990, 42.
- ⁸³ Almeida, J.D., Waterson, A. P.: *Lancet* II, 1969, 983.
- ⁸⁴ Edvingron, T. S., Chisari, F. M.: *Am. J. Med. Sci.* 270, 1975, 213.
- ⁸⁵ Hiroichi, N., Ikuhisa, Y., Motonovi, A. et al.: *Planta Med.* 55, 1989, 13.
- ⁸⁶ Liu, Y. G.: *Can. CA* 1, 266, 236, *Appl.* 508, 064. In: *Chem. Abstr.* 114, 1991, 150 155.
- ⁸⁷ Zhang, L., Niu, X.: *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao* 13, 1991, 13.
- ⁸⁸ Ikeya, Y., Taguchi, H., Mitsuhashi, H. et al.: *Phytochemistry* 27, 1988, 569.

- ⁸⁹ Iketani, Y., Taguchi, H., Takeda, S. et al.: Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 63,30,410 [88,30,410]. Appl. 86/171,842. In: Chem. Abstr. 109, 1988, 92533.
- ⁹⁰ Hara, K.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 50,178,818, [85,178,818], Appl. 84/34, 818. In: Chem. Abstr. 104, 1986, 24205.
- ⁹¹ Lin, T. J.: Sheng Li Ko Hsueh Chin Chan 22, 1991, 342.
- ⁹² Takeda, S., Hasegawa, M., Yuda, M.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63,119,422 [88,119,422], Appl. 86/261, 779. In: Chem. Abstr. 110, 1989, 13563.
- ⁹³ Takido, M., Yasukawa, K., Yuda, M. et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 03,215,418 [91,215,418], Appl. 90/3,335. In: Chem. Abstr. 116, 1992, 99304.
- ⁹⁴ Yasukawa, K., Ikeya, Y., Mitsuhashi, H. et al.: Oncology 49, 1992, 68.
- ⁹⁵ Bolšakova, I. V., Lozovskaja, E. L., Sapežinskij, I. I.: Biofizika 42, 1997, 480.
- ⁹⁶ Zhang, L., Yang, L., Yuan, Q.: Yaowu Shengwu Jishu 4, 45, 1997. In: Chem. Abstr. 126, 1997, 301741.
- ⁹⁷ Liu, G.: Int. Congr. Ser. – Excerpta Med. (Oxygen Radicals) 1992, 998, 805.
- ⁹⁸ Liu, Z., Cheu, L., Dong, J. et al.: Zhoncaoyao 27, 355, 1996. In: Chem. Abstr. 125, 1996, 238522.
- ⁹⁹ Lu, H., Liu, G.: Planta Med. 58, 1992, 311.
- ¹⁰⁰ Toda, S., Iketani, Y., Taguchi, H. et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,16,721 [89,16,721], Appl. 83/169, 697. In: Chem. Abstr. 112, 1990, 11909.
- ¹⁰¹ Zhao, B. L., Li, X. J., Liu, G. T. et al.: Cell. Biol. Int. Rep. 14, 1990, 99.
- ¹⁰² Li, X. J., Zhao, B. L., Liu, G. T., et al.: Free Radic. Biol. Med. 9, 1990, 99.
- ¹⁰³ Zheng, R. L., Kang, J. H., Chen, F. Z. et al.: Phytother. Res. 11, 1997, 600.
- ¹⁰⁴ Wang, J. P., Raung, S. L., Hsu, M. F. et al.: Br. J. Pharmacol. 113, 1994, 945.
- ¹⁰⁵ Li, P. C., Mak, D. H. F., Pouu, M. K. T. et al.: Phytomedicine 3, 1996, 217.
- ¹⁰⁶ Ko, K. M., Yock, P. K., Pouu, M. K. T. et al.: Phytother. Res. 9, 1995, 203.
- ¹⁰⁷ Takeda, S., Hasegawa, M., Yuda, M.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63,119,422 [88,119,422], Appl. 86/261, 779. In: Chem. Abstr. 110, 1989, 13563.
- ¹⁰⁸ Kim, B. J., Kim, J. H., Kim, H. P. et al.: Int. J Cosmet. Sci 19, 1997, 299.
- ¹⁰⁹ Lee, I. S., Jung, K. Y., Oh, S. R. et al.: Arch. Pharmacol. Res. 20, 1997, 633.
- ¹¹⁰ Jung, K. Y., Lee, I. S., Oh, S. R. et al.: Phytomedicine 4, 1997, 229.
- ¹¹¹ Rhee, J. K., Woo, K. J., Back, B. K. et al.: Am. J. Chin. Med. 1, 1981, 277.
- ¹¹² Migazawa, M., Hirota, K., Fukuyama, M. et al.: Nat. Prod. Lett. 12, 1998, 175.
- ¹¹³ Hwang, E. I., Kim, M. K., Lee, H. B. et al.: Yakhak Hoechi 43,509, 1999. In: Chem. Abstr. 131, 1999, 327389.

- ¹¹⁴ Tanaka, M., Sakata, T. Ikeya, Y. et al.: PCT Int. Appl. WO 95 00,466, JP Appl. 93/173,570. In: Chem. Abstr. 123, 1995, 198438.
- ¹¹⁵ Bolšakova I., Lozovskaja, E. L., Sapežinskij, I. I.: Biofizika 42, 1997, 926.
- ¹¹⁶ Iketani, Y., Kanetani, H., Sato, S. et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,172,354 [89,172,354], Appl. 87,327,389. In: Chem. Abstr. 112, 1990, 10 4842.
- ¹¹⁷ Sakura, H., Nikaido, T., Ohmoto, T. et al.: Chem. Pharm. Bull. 40, 1992, 1191.
- ¹¹⁸ Kwon, B.-M., Jung, H.-J., Lim, J.-H. et al.: Planta Med. 65, 1999, 74.
- ¹¹⁹ Iketani, Y., Taguchi, H., Sasaki, H. et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,42,448 [89,42,448], Appl. 87/198,195. In: Chem. Abstr. 112, 1990, 62608.
- ¹²⁰ Iketani, Y., Yanagisawa, T., Mihashi, H.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02,169,543 [90,169,543], Appl. 87/327,390. In: Chem. Abstr. 112, 104841.
- ¹²¹ Iketani, Y., Yanagisawa, T., Mihashi, H.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02,169,543 [90,169,543] Appl. 88/322,069. In: Chem. Abstr. 113, 1990, 237825.
- ¹²² Ohkua, Y., Mizoguchi, Y., Morisawa, S. et al.: Jpn. J. Pharmacol. 52, 1990, 331.
- ¹²³ Suekawa, M., Shiga, T., Sone, H. et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,42,421 [89,42,421], Appl. 87/198,196. In: Chem. Abstr. 11, 1989, 239480.
- ¹²⁴ Opletal, L., Drašar, P.: *Fytochemické metody, Izolace obsahových látek (laboratorní technika)*. Karolinum, Praha 1994.
- ¹²⁵ Křenková, M.: *Fytochemický výzkum nadzemní části *Schizandra chinensis* (TURCZ.)BAILL.* Disertační práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2003.
- ¹²⁶ Lábler, L., Schwarz, V. et al.: *Chromatografie na tenké vrstvě*. Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1965, s. 443-455.
- ¹²⁷ Stahl, E.: *Thin-layer chromatography, second edition*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1969, s. 855-905.
- ¹²⁸ Jork, H., Funk, W., Fisher, W. et al.: *Thin-layer chromatography, Reagents and detection metod*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1990, Volume 1a, s. 213-214.
- ¹²⁹ Šaršúnová, M., Schwarz, V., Michalec, Č. et al.: *Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémií*. Osveta, Martin 1977, s. 451-476.
- ¹³⁰ Mikeš, O. a spol.: *Laboratorní chromatografické metody*, SNTL, Praha 1980, s. 145.
- ¹³¹ Stöger, A. E., Friedl F. (ed.): *Arzneibuch der Chinesischen Medizin*. 6. Ergänzungslieferung 9/1997, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1998.
- ¹³² Opletal, L., Křenková, M., Havlíčková, P.: *Čes. slov. Farm.* 50, 2001, 219.
- ¹³³ Jirkovský, M.: *Fytochemický výzkum druhu *Schizandra chinensis* (TURCZ.)BAILL.* 3. Některé obsahové látky listů. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy,

Hradec Králové 1999.

¹³⁴ Tichý, I.: Fytochemický výzkum druhu *Schizandra chinensis* (TURCZ.)BAILL. 2. Některé obsahové látky listů. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 1999.

¹³⁵ Graja, Z.: Fytochemický výzkum druhu *Schizandra chinensis* (TURCZ.)BAILL. 1. Některé obsahové látky listů. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 1999.

¹³⁶ Eskin, N. A. M., Tamis, S.: Dictionary of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC-Taylor & Francis, Boca Raton 2005, s. 229.