

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
KATEDRA AGROEKOLOGIE
SEKCE AGROCHEMIE A PEDOLOGIE

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Pozemkové úpravy a převody nemovitostí

Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum*
ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Autor:

Hana Gramanová

2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci „Technologie pěstování ostropestřece mariánského *Silybum marianum* ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování“ vypracovala samostatně, pod vedením Prof. Ing. Stanislava Kužela, CSc., a veškeré literární a odborné zdroje uvedla v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích, 28. 2. 2009

Tímto děkuji svému vedoucímu diplomové práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc., za metodické vedení a pomoc při zpracování této práce. Zároveň děkuji panu Ing. Martinu Pilařovi, AGRA GROUP, a.s., Střelské Hoštice, a panu Doc. Ing. Jiřímu Divišovi, CSc., za zprostředkování pokusných ploch pro pěstování ostropestřce mariánského. Poděkování patří i paní Ing. Ivetě Češkové za obětavou pomoc a cenné rady při stanovování a vyhodnocování obsahu účinných látek v semenech rostliny.

1. Úvod

Rostlinné produkty zaujímaly v životě lidí vždy určité postavení. Ať už se jednalo o jejich objevování a opětovné upadání v zapomnění a znovuobjevování. Na světě roste přibližně 400 000 druhů rostlin a z toho asi 20 000 má léčivé účinky. Nicméně pouze kolem 500 z nich je prozkoumáno. Poslední dobou se lidé se vzrůstajícím stresem a neustále se zvyšujícími nároky na sebe samé obracejí právě k těmto produktům a zájem o léčivky zaznamenává zvyšující se tendenci.

Mezi tyto byliny patří i ostropestřec mariánský (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.), po kterém neustále roste poptávka a jehož pěstování se stále rozšiřuje. Významnou roli hraje ve farmaceutickém průmyslu, kde se využívají především jeho plody (*Fructus cardui mariae*), které obsahují komplex účinných látek označovaný jako silymarin, jehož účinky byly známy už několik tisíciletí před naším letopočtem. Silymarin se používá hlavně k regeneraci a prevenci správné funkce jaterních tkání a při mnoha dalších onemocněních, od žlučnickových potíží až po rakovinu nebo zevní aplikaci na popálené tkáně.

Proto se při pěstování ostropestřce mariánského klade důraz nejenom na kvantitu získané drogy, ale zároveň na kvalitu semen, tj. množství silymarinového komplexu a jeho složení – poměr jednotlivých komponent. Obecným zájmem je pak cílené zvyšování obsahu účinných látek v semeni této rostliny, k čemuž byla vytvořena řada technologických postupů.

To se stalo i předmětem bádání v této práci. Cílem bylo podle předložených metodik vyhodnotit nejefektivnější metodu pro získání maximálního výtěžku účinných látek a dále zhodnotit vliv elicitorů na zvyšování obsahu těchto látek v semenech ostropestřce mariánského. K vyhodnocení se použila vysokoúčinná kapalínová chromatografie (HPLC). Dílčím úsekem se stalo vypracování technologického návrhu pro pěstování této rostliny na ploše 1-5 ha a zpracování produktu včetně ekonomické kalkulace.

2. Literární rešerše

2.1 Léčivé rostliny v historii

Léčivé vlastnosti rostlin a bylin rozpoznali a začali používat už primáti. Bylo pozorováno množství opic a goril, které opakovaně konzumovaly určité botanické druhy obsahující chemické látky působící jako analgetika, imunostimulanty, látky s protizánětlivými účinky, proti průjmům, látky podporující zažívání nebo dokonce plodnost (Halberstein, 2005).

Existuje rozsáhlý archeologický výzkum, který dokazuje, že léčivé rostliny využívali i naši předci v prehistorické době. Ve starověkých kulturách lidé záměrně užívali plody léčivek pro jejich ozdravné a psychoterapeutické účinky. Postupně se tyto vlastnosti začaly využívat experimentálně v oblasti medicíny a psychiatrie (Halberstein, 2005). První písemné zmínky vznikly 5000 let př. n. l., jejich autoři byli Sumerové (Raskin, et al., 2002).

Záznamy ukazují, že první léčitelé si byli dobře vědomi vzájemného propojení těla a mysli ovlivňující uzdravení a rekonvalescenci (Halberstein, 2005).

V Číně a Indii lze dohledat zdroje o využívání herbální medicíny až čtyři tisíce let zpětně, tj. přibližně 2100 let př. n. l. První psané záznamy pocházejí z doby kolem roku 600 př. n. l. z Indie a 400 př. n. l., kdy v Číně vládla dynastie Zhou. Na rozdíl od Aristotelova západního světa, který preferoval spíše analytický postoj k lékařství založený na neopodstatněných předpokladech, východní kultury považovaly nemoci za projev nerovnováhy mezi dvěma energiemi, jež nás ovládají po celý život, a to Yinem (reprezentovaný Zemí, Měsícem, vlhkostí, tmou a pasivitou, tzv. ženský aspekt) a Yangem (představuje Slunce, sucho, světlo a aktivitu, tzv. mužský aspekt). Dalším rozvojem přírodních věd se začaly rozdíly mezi východem a západem prohlubovat (Schuppan, et al., 1999).

Staří Egypťané zhruba před 3000 – 6000 lety vytvořili přímo propracovaný elaborát obsahující způsoby využití farmakologických látek získávaných z přírodních zdrojů. Lékaři předepisovali zejména analgetika, sedativa, léky na žaludeční potíže i běžné nachlazení. Bylinné extrakty se aplikovaly vnitřně, lokálně zevně, inhalovaly se nebo se vykuřovaly místnosti. Jako léčebné prostředky se užívalo víno, ricínový olej, marihuana, opium, máta a pivo vyráběné z ječmene a pšenice. Egypťané byli vlastně první, kdo moderně používali množství drog a prokázali, že drogy se v medicíně mohou efektivně využít (Halberstein, 2005).

Záznamy o bylinné léčbě pocházejí i z Mezopotámie, od Chetitů (Váňa, 1990).

Ve starém Řecku, kde se k léčení využívaly byliny už před 3000 lety, Dioscorides dokonce sestavil 24 knih pod názvem *De Materia Medica*, kde velice detailně popsal přes 600 léčivých rostlin a jejich náležité používání, a stanovil tak první terminologii. Následující vývoj šel ruku v ruce s objevováním dalších léčivých druhů rostlin a vyplynul z experimentů jiných kultur, jako Tibetanů, Aztéků nebo Mayů. Aztékové dokonce měli umět zužitkovat na 132 léčivých bylin pro léčbu specifických chorob epilepsií počínaje, přes dnu až po krvácení z nosu nebo akné (Halberstein, 2005).

Léčivé rostliny jsou tedy lidstvu známy od nejstarších dob. Naši předkové je zjevně užívali k tomu, aby se zbavili různých nemocí a neduhů, které je od nepaměti sužovaly. Přípravou léčivých odvarů, mastí a mazání se zprvu zabývali kořenáři, mastičkáři a někde i kouzelníci a kněží, kteří tajemství přípravy a použití úzkostlivě střežili a tajili (Andrejev, Barinov, 1990). Dobré i špatné zkušenosti se pak předávaly z generace na generaci a u některých národů již v dávných dobách byly snahy zaznamenat alespoň něco z těchto zkušeností a poznatků slovem i obrazem (Příhoda, 1980).

Zlepšení s sebou v 15. století přinesl vynález Johanna Gutenberga, objev knihtisku. Byla překládána řada děl, mezi nimi i rozličné herbáře, které v té době patřily mezi nejprodávanější publikace, např. Bock, 1577, Matthiolus, 1590, nebo Fuchs, 1543, jehož herbář je uložen ve Švýcarském farmaceutickém muzeu v Basileji (Adams, et al., 2008).

Později, kdy se lékařství začalo vyvíjet jako vědní obor, byla botanika dlouho jednou z jeho hlavních pomocných věd, než se osamostatnila farmakologie jako samostatný vědní obor (Příhoda, 1980).

Výrazného pokroku dosáhl v 18. století švédský botanik Carolus Linnaeus se svým revolučním taxonomickým dílem *Systema naturae* (1735), v němž etabloval kostru pro moderní biologickou taxonomii, a s jedním z jeho nejslavnějších děl *Genera Botanica a Critica Botanica* (obě z 1737), ve kterých uvádí přesnou identifikaci jednotlivých rostlinných druhů a jejich základní charakteristiku se seznamem latinských názvů všech druhů, které byly v té době známy. Do těchto publikací dodnes nahlíží přední botanici i zahradníci (Halberstein, 2005).

Jiný silný svazek s informacemi o rostlinách a lidském zdraví vytvořil Friedrich Bayer v roce 1897, kde představil synteticky vyrobenou kyselinu acetylsalicylovou, aspirin. Jedná se o obdobu kyseliny salicylové, která je aktivní složkou vrbové kůry, a byla objevena zcela náhodně jako lék proti horečce a zimnici (Raskin, et al., 2002).

Chemické rozborů a biologická studia vysvětlila mnohé, co bylo dříve známo jen jako zkušenost, bez logického vysvětlení (Příhoda, 1980). Postupem doby se z rostlin podařilo

izolovat řadu léčebně účinných látek, ze kterých se začaly vyrábět nejrůznější léčebné prostředky a rozmanitých lékových formách. Vědecké zkoumání rostlinných účinných látek pokročilo natolik, že některé z nich se vyrábějí uměle a plně nahrazují přírodní látky (Andrejev, Barinov, 1990). Dvacáté století v tomto ohledu slavilo triumf. Neobyčejný vzestup farmaceutického průmyslu měl ohromný vliv na léčbu nemocí a prevenci, takže se podařilo zachránit bezpočet lidských životů (Raskin, et al., 2002).

Světová organizace pro zdraví (WHO) k roku 1995 zaznamenala na 20 000 léčivých rostlin a jen 250 jich bylo k tomu samému datu analyzováno k identifikaci účinných látek. Od té doby se udává, že nejméně 25 % aktivních látek v současně stanovených syntetických drogách pochází původně z rostlinných zdrojů (Halberstein, 2005). Proto léčivé rostliny mají a nadále budou mít nenahraditelné místo v léčebné praxi, jak při přímém použití ve formě léčivých čajů, tak i jako suroviny pro průmyslově vyráběné léky (Andrejev, Barinov, 1990).

2.2 Ostropestřec mariánský

2.2.1 Původ

Silybum marianum (L.) Gaertner je nápadná bylina podobná pcháčům a bodlákům (Husáková, Lhotská, 1981). Synonymně je pak nazývána *Carduus marianus*. Patří do čeledi hvězdnicovitých, *Asteraceae* (Jegorov, 1996). Jako bodláčí ji označují i cizojazyčná pojmenování, např. anglické milkthistle, francouzské chardon Marie či německé Mariendistel (Starý, 2000).

Pravděpodobně poprvé je popisován ve spisech Theoprasta (4. stol. př. n. l.) pod názvem „Pternix“. Ve středověku byl popisován ve všech významných herbářích léčivých rostlin, např. abatyše Hildegardy z Bingen (1098 – 1179), Hieronyma Bocka (1593), Mattioliho (1626) nebo Von Hallera (1755) a dalších (Jegorov, 1996).

Ostropestřec mariánský nepatří v žádném případě mezi typické kulturní plodiny a není ani původním zástupcem naší domácí květeny (Spitzová, 1981). Dříve se pěstoval poměrně často v teplejších oblastech a přechodně i zplaňoval na rumišťích, v obcích a na pustých místech i keřnatých (Husáková, Lhotská, 1981) a kamenitých stráních (Jaroš, 1992), u nás je ale plevelný výskyt vzácný (Kubínek, 1987). S jeho pěstováním v České republice se začalo počátkem 70. let na Pardubicku (Moudrý, 200-).

Rodové jméno *Silybum* vzniklo pravděpodobně z řeckého slova silybon – štrapec, zřejmě podle tvaru a velikosti úboru. Druhové jméno *marianum* se opírá o starou legendu, že bílé mramorování na listech pochází od mateřského mléka bohorodičky. Je možný i další výklad, že Mariino jméno mělo zdůraznit významné léčivé účinky ostropestřce (Starý, 2000).

Původem pochází ze Středomoří (Janča, Zentrich, 1995), kde je pro svou ostnatost listů často vysazován jako ochranný plot kolem malých zelinářských políček proti kozám spásající vše zelené. Jeho areál ale sahá i dále na východ do malé Asie (ve stepních oblastech Přední Asie občas vytváří souvislé porosty, tzv. bodlákový les), oblasti Kavkazu, Íránu a Sýrie (Starý, 2000). Dále tento druh najdeme na Pyrenejském poloostrově, roste i v severní Africe, na Madeiře a na Kanárských ostrovech (Husáková, Lhotská, 1981). Do dalších teplejších oblastí světa byl zavlečen a často zde zdomácněl (Starý, 2000), což dokládá výskyt ostropestřce mariánského ve střední Evropě, který sahá až na sever Anglie, nebo v Severní a Jižní Americe a v jižní Austrálii (Husáková, Lhotská, 1981).

Jako léčivá bylina byl ostropestřec mariánský znám již v antice, kde se používaly hlavně jeho nažky při nemocech jater a žloutence (Husáková, Lhotská, 1981). Od středověku nacházela tato rostlina uplatnění především v lidovém léčitelství i lékařství (Spitzová, 1981). Používala se celá rostlina (Starý, 2000), listy a kořeny méně (Husáková, Lhotská, 1981), a přisuzovala se jí moc všeléku. V málo přehledném souboru indikací bylo zajímavé tvrzení, že droga pomáhá od bolestí v boku, patrně způsobených nemocí jater a žlučníku. Až známý německý lékař minulého století Rademacher se vyjádřil jasně (1851). Ostropestřec účinkuje spolehlivě proti jaterním onemocněním a k tomu účelu doporučoval velmi slavnou a dlouho používanou tinkturu ze semen ostropestřce – *Tinctura Cardui mariae*. G. Madaus v důkladném kompendiu *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*, čili v učebnici léčiv biologického původu, hlavně léčivých rostlin, která vyšla ve třech objemných svazcích v Lipsku r 1938, věnuje ostropestřci značnou pozornost. Není proto divu, že s jeho jménem spojená farmaceutická továrna byla první, která tuto léčivku zhodnotila ve známém hromadně vyráběném léčivém přípravku Legalon (Starý, 2000). Značný terapeutický efekt a také spotřeba preparátů pro tuto skupinu chorob vedla k rychlému rozšíření výše jmenovaného léčiva v evropském medicínském terénu a k intenzivnímu výzkumu i v jiných státech s rozvinutým farmaceutickým průmyslem (Spitzová, 1981). Stejně složení má u nás vyráběný Flavobion (Starý, 2000), což je vlastně licenční verze Legalonu (Janča, Zentrich, 1995).

Bez nadsázky tedy můžeme říci, že od doby, kdy byly léčivé účinky této rostliny poprvé nalezeny až do současnosti, kdy se podařilo izolovat aktivní komponenty a objasnit alespoň částečně jejich mechanismus účinku, uplynulo více než dva tisíce let (Jegorov, 1996).

V současné době zaznamenává tato rostlina rychlý rozvoj pěstování (Spitzová, 1997) a stala se naší velkoplošně nejpěstovanější léčivou rostlinou (Buchtová, Drašnarová, 2003). Důvodem je hlavně zájem farmaceutického průmyslu o drogu, v tomto případě plody (semena) – *Fructus cardui mariae* (Spitzová, 1997).

2.2.2 Botanická charakteristika

Ostropestřec mariánský je mohutná jednoletá, případně ozimá (Starý, 2000), v našich klimatických podmínkách výjimečně dvouletá bylina (Spitzová, 1997). Dorůstá výšky 50 až 250 cm (Husáková, Lhotská, 1981) v závislosti na půdních podmínkách (Starý, 2000).

Lodyha je silná, dole hustě, nahoře řidčeji olistěná a vyplněná dřeví, podobná benediktu lékařskému (Moudrý, 200-). Na konci hlavní osy i os postranních vyrůstají velké bohaté úbory s červenofialovými (Starý, 2000), zřídka bledě fialovými (Opletal, Volák, 1999) nebo bílými květy o průměru 50 – 80 mm (Moudrý, 200-). Mají kulovitý zákrov a střechovitě uspořádané, ostnitě zubaté listeny (Opletal, Volák, 1999), které vyběhají v mohutné, žlábkovité, nazpět ohnuté ostny (Husáková, Lhotská, 1981).

Ostropestřec je cizosprašný, hlavními opylovači jsou včela a čmelák. Uplatňuje se proto i jako rostlina medonosná (Spitzová, 1997). Kvete od července do září (Moudrý, 200-) v závislosti na termínu výsevu (Spitzová, 1997).

Plodem je nažka 6 až 7 mm dlouhá, hladká, tmavě hnědá nebo šedohnědá s tmavším žlhnáním (Husáková, Lhotská, 1981) s asi 10 až 15 mm dlouhým, lesklým, bílým chmýrem (Husáková, Lhotská, 1981), jehož štětinky jsou drsné, dole srostlé (Janča, Zentrlich, 1995). Droga je bez pachu a chutná nahořkle (Opletal, Volák, 1999). V jednom úboru se nachází kolem sta plodů. HTS je 25 – 30 g (Moudrý, 200-).

Listy jsou zelené, střídavé, přisedlé (Husáková, Lhotská, 1981), objímavé, tuhé, na žilnatině bíle mramorované (Janča, Zentrlich, 1995), v obrysu podlouhle eliptické, lesklé, na okraji ostnitě zubaté (Opletal, Volák, 1999). Jsou charakteristické tím, že dobře svádějí dešťovou vodu ke kořenům (Starý, 2000). Kořenový systém je značně variabilní, zpravidla je mohutně vyvinut křivý kořen (Spitzová, 1997).

V našich podmínkách se při pěstování na zahrádce vysévají nažky až pozdě na podzim nebo na jaře. Při letním nebo časně podzimním výsevu vyklíčí nažky ještě na podzim a mladé rostlinky přes zimu většinou vymrzají. Je výhodné též ostropestřec mariánský předpěstovat, jak je běžné u jednoletých květin. Předpěstované rostliny jsou statnější a mají velký počet úborů (Husáková, Lhotská, 1981).

Rychle a spolehlivě klíčí (Starý, 2000). Právě rychlé klíčení a malá odolnost mladých rostlinek vůči mrazu jsou důvodem, proč u nás tato bylina nezdomicňuje, ale jen přechodně zplaňuje, zatímco v teplých oblastech – například v asijských stepích, jihoamerických pampách a

jihoaustralských pustinách je obtížným plevelem, vyskytujícím se v obrovském množství (Husáková, Lhotská, 1981).

Vzcházet začíná 2 - 3 týdny po výsevu, v optimálních podmínkách i po 5 dnech. (Kubínek, 1987). Zprvu vytvoří přízemní růžici velkých, chobotnatých listů s početnými dožluta zbarvenými trny (Starý, 2000). Zhruba po dvou měsících přechází rostlina do generativní fáze charakterizované rychlým dlouhivým růstem (Spitzová, 1997).

Individuálním sběrem se semena sklízí i se slupkou, neboť účinné obsahové látky se nacházejí bezprostředně pod o semeněním (Jaroš, 1992). Celé, chmýřité hlavice se uřežou a uloží na větraných, suchých místech, kde dozrávají. Teprve potom se šištice vymlátí a plody zbvají chmýru (Janča, Zentrich, 1995). Nažky dozrávají v závislosti na termínu výsevu od července do září. Délka vegetace je v průměru čtyři měsíce (Spitzová, 1997). V chladných a deštivých letech, zvláště ve vyšších polohách, se sklizeň posouvá až na září. Výhodou teplých nížin je kratší vegetační doba, větší jistota dozrání za příznivých podmínek pro sklizeň. Výnosy zde bývají vyšší, přijdou-li srážky včas a v dostatečné míře (Kubínek, 1987).

Sušené úbory, uřežované před rozkvětem, slouží jako dekorativní rostliny do sušených kytic (Moudrý, 200-). Suší se obrácené dolů na vzdušných a stinných místech (Husáková, Lhotská, 1981).

2.2.3 Technologie pěstování

2.2.3.1 Půdní a klimatické podmínky

Ostropestřec je plodinou značně plastickou, kterou lze pěstovat v širokých klimatických podmínkách. Obecně nejvyšších výnosů je ale dosahováno na kvalitní půdě v klimatických podmínkách blízkých areálu původního rozšíření. Těm zhruba odpovídají podmínky řepařského výrobního typu (Spitzová, 1997).

V příznivých podmínkách a vhodné expozici pozemku lze ostropestřec pěstovat až do nadmořské výšky 600 m. Suma průměrných denních teplot se pohybuje mezi 1800-2000°C. Kritickým obdobím růstu je fáze přechodu k tvorbě květonosné lodyhy (Moudrý, 200-) a s tím spojený prudký nárůst biomasy, kdy vyžaduje rostlina dostatek vody. Nejvyšší výnosy mají porosty, jejichž průměrná výška dosahuje přibližně 2 m (Kubínek, 1987).

Vzhledem k velkému nárůstu nadzemní hmoty vyžaduje ostropestřec i značné množství živin. Optimální je půda ve své staré síle, se zásobou živin podle rozborů AZP dobrou, popřípadě

vysokou (Spitzová, 1997). Velký význam tudíž má dostatek organické hmoty a neutrální půdní reakce.

Na lehkých půdách trpí nedostatkem vláhy. Zcela nevhodné jsou půdy mělké, písčité a kyselé (Moudrý, 200-). Těžké půdy jsou pro ostropestřec mariánský přípustné, nesmějí se však přemokřovat a být utužené. Při výběru pozemku je třeba se vyhnout výsušným jižním svahům (Kubínek, 1987).

2.2.3.2 Výsev

Ostropestřec není náročný na předplodinu. Jako nejvhodnější lze doporučit jetelovinu nebo organicky hnojenou plodinu (Moudrý, 200-), obecně plodiny zlepšující. Nejsou však rozhodující podmínkou úspěchu. Možné je zařazení po obilovině. Pěstování ostropestřce po ostropestřci se z důvodů běžně známých i u jiných plodin nedoporučuje (Spitzová, 1997). Semena, která zůstanou hluboko v půdě způsobují zaplevelení pozemku v dalších letech (Moudrý, 200-).

Předset'ová příprava je zhruba stejná jako pro jarní obilovinu. Preferuje se širokořádkový výsev přesně secími stroji (Spitzová, 1997). Pečlivé urovnění povrchu je důležité pro dodržení stejnoměrné hloubky výsevu. Norma výsevu činí $12 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, u přesných secích strojů lze výsevek snížit na 8 až $10 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Sejeme do hloubky 20 až 30 mm (Moudrý, 200-). Termín výsevu v závislosti na regionu spadá na březen až duben (Spitzová, 1997). Vhodná je podzimní hluboká orba. Na proschlé půdě při opožděném výsevu je žádoucí válení (Kubínek, 1987) a současné zvýšení normy výsevu i hloubky setí (Moudrý, 200-). Podmítka by neměla chybět, pokud byla předplodinou obilnina, jetelovina, luskovina nebo olejnina (Kubínek, 1987).

Podle způsobu kultivace se teoretický spon pohybuje v rozmezí $0,30 \times 0,30 \text{ m}$ až $0,40 \times 0,40 \text{ m}$ u porostů, které nebudeme plečkovat. Spon $0,45 \times 0,20$ lze plečkovat mechanizací určenou pro cukrovku. Na 1 m^2 by mělo být 6 až 12 jedinců. Teplota půdy pro setí by se měla pohybovat kolem $5 \text{ }^\circ\text{C}$, půda se nemá lepit (Moudrý, 200-).

2.2.3.3 Výživa a hnojení

Problematikou optimální výživy této plodiny se detailně zabývají především v oblasti severního Egypta (Ryant, 2005). Na písčitéch půdách této oblasti je zaznamenáno pozitivní působení dávek dusíku 120 až 240 kg.ha⁻¹, resp. fosforu 62 kg.ha⁻¹ na výnos nažek, výnos oleje a silymarinu (Omer, et al., 1998).

Při porovnání různých druhů dusíkatých hnojiv (močovina, síran amonný, dusičnan amonný, všechny v dávce 143 kg dusíku na hektar) poskytuje nejvyšší výnos nažek síran amonný a jeho dělená aplikace ve dvou termínech poskytuje také vyšší výnos oleje a všech složek silymarinového komplexu (Omer, 1996). Také při sledování vlivu dvou dávek dusíku 70 až 140 kg.ha⁻¹ a tří dávek draslíku (46, 71 a 95 kg.ha⁻¹) působí nejvyšší dávky nárůst výnosu nažek, výnosu oleje a obsah oleje v nažkách ve srovnání s nižší hladinou hnojení, avšak nemají významný vliv na obsah flavonolignanů (Omer, et al., 1993).

Ostropestřec je zde pěstován také pod závlahami, kde při vysokých dávkách dusíkatých a draselných hnojiv (476 kg N v dusičnanu amonném na ha a 99 kg K v síranu draselném na ha) dosahuje vyššího výnosu nažek, výnosu oleje a silymarinu ve srovnání s nižší úrovní hnojení dusíkem a draslíkem (238 kg N na ha a 99 kg K na ha) (Omer, et al., 1995). Procentický obsah oleje v nažkách a také obsah silymarinu však vysokými dávkami dusíku již není ovlivněn (Omer, et al., 1995, 1998).

Efekt dusíkatého hnojení ostropestřce mariánského byl zkoumán také v Německu, avšak výnos nažek byl ovlivněn negativně a obsah silymarinu se lišil od dusíkem nehnojených rostlin pouze o 0,03 % (Schunke, 1992).

V našich podmínkách má množství srážek během kritického období mnohem větší vliv na výnos plodů ostropestřce než běžné půdní podmínky a hnojení. Hnojení ostropestřce se tedy nemusí výrazně projevit zvýšením výnosu (Kubínek, 1987).

Dávku dusíku lze doporučit v rozmezí 60 až 90 kg.ha⁻¹ (Moudrý, 200-), ve srážkově bohatších regionech je výhodné dávku dusíku dělit. Jednu až dvě třetiny aplikovat při předset'ově přípravě a zbytek ve fázi 6 - 8 pravých listů. Paušálně je možné aplikovat cca 300 – 400 kg NPK předset'ově (Ryant, 2005). Organické hnojení přímo k ostropestřci je vhodné, zapraví se hlubokou orbou na podzim (Moudrý, 200-).

Podle Rámcové metodiky 2, z roku 2003, pěstování ostropestřce mariánského Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s. r. o. je pro podmínky České republiky

doporučováno aplikovat 45 až 60 kg N, 17,5 kg P a 33,2 kg K na ha. V praxi to znamená aplikovat 200 kg.ha⁻¹ NPK (19-19-19) a v případě vysoké nebo velmi vysoké zásoby K v půdě 100 kg Amofosu na ha na podzim. Na jaře je potom vhodné aplikovat 100 až 150 kg dusičnanu amonného před setím nebo ihned po zasetí. Jako nejvhodnější regiony pro pěstování ostropestřce mariánského je popisována zemědělská výrobní oblast řepařská nebo obilnářská s hlubší hlinitou půdou a s velmi dobrou zásobou živin (Ryant, 2005).

2.2.3.4 Plevelé, choroby a škůdci

Ostropestřec má velmi dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům. Velmi mu škodí odběrem vláhy plevelé vytrvalé, jako pýr, pcháč aj. Základem ničení plevelů je mechanická kultivace, obvykle ve fázi šesti pravých listů. Po zapojení porostu plečkování již nelze provádět (Moudrý, 200-).

Zdravotním problémem, zejména podhorských oblastí je plíseň šedá (Spitzová, 1997), *Botrytis cinerea*, která ostropestřec mariánský napadá především ve fázi kvetení. Prevencí proti této chorobě je včasný výsev (Moudrý, 200-). V teplých regionech škodí houby rodu *Fusarium*. Čas od času je zaznamenán výskyt padlí čekankového a v poslední době i skvrnitosti způsobené druhy rodu *Alternaria* a *Septoria* (Spitzová, 1997).

Nejvážnější chorobou je tracheomykóza jinak nazývaná jako cévní vadnutí. Příznaky choroby se projevují masově od fáze listové růžice. Je to postupné vadnutí, žloutnutí až hnědnutí celé rostliny. U dospělých jedinců dochází k zasychání poupat. Proto se vyplatí osivo mořit např. Fundazolem a používat biologicky vhodné osivo, které časně zasejeme (Moudrý, 200-). Protože chemická ochrana proti cévnímu vadnutí je velmi obtížná a značně nákladná, dá se jen stěží uplatnit v praxi, snad s výjimkou zvláště cenných kultur, pěstovaných na malých plochách.

Další herbicidní ochrana je víceméně vyřešena, povoleny jsou například přípravky Afalon nebo Gesagard. Z živočišných škůdců škodí mšice, housenky polyfágních škůdců a babočky bodlákové (Spitzová, 1997). Zasetá semena mohou vyzobávat bažanti, dozrávající plody jsou atraktivní pro ptáky, hlavně zvonky a vrabce (Kubínek, 1987).

2.2.3.4 Sklizeň

Sklizeň je považována za nejnáročnější článek agrotechniky. Ovlivňuje výnos i kvalitu drogy. Obsah účinných látek je totiž přímo úměrný stupni vyzrání semen a vzhledem k jejich postupnému dozrávání v různých patrech rostlin i v rámci úborů je odhad termínu sklizně obtížný a sklizeň pouze zcela biologicky zralých semen je technicky neproveditelná (Spitzová, 1997).

Sklizeň se provádí sklízecí mlátičkou. Porost by měl mít 30 % přezrávajících úborů, které rozeznáme za suchého počasí podle otevření úborů a bílého chmýří. Většina zbývajících úborů by měla v té době zasychat (Kubínek, 1987).

Při vlhkém počasí se úbory zavírají, to je vhodné pro sklizeň. U sklízecí mlátičky se demontují pera přiháněče, vytrásadla se nahradí vytrásadly pro sklizeň kukuřice a zvětší se mezera mezi mláticím košem a bubnem. Rostliny totiž bývají ještě zelené (Moudrý, 200-).

Sklízet lze i pomocí techniky používané pro sklizeň obilovin. Desikace je nežádoucí vzhledem k riziku obsahu reziduí v droze (Spitzová, 1997). Po výmlatu se plody vyčistí, dosuší a zbaví chmýru (Opletal, Volák, 1999). Semena je nutno během skladování zabezpečit před skladištními škůdci, zejména zavíječem paprikovým (Spitzová, 1997).

2.2.4 Pěstování v ČR

Na konci roku vydává Ministerstvo zemědělství ČR Situační a výhledovou zprávu Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny (LAKR), která je prakticky jediným souhrnným dokumentem o stavu pěstování této skupiny rostlin v ČR (Drašnarová, 2005).

Nutno podotknout, že získání dat o zpracování LAKR v České republice je velmi problematické, sdílení informací závisí jen na ochotě ke spolupráci jednotlivých zpracovatelů (LAKR, 2008).

Následující tabulky ukazují vývoj ploch produkce léčivých (Tab. 1), kořeninových a aromatických rostlin (Tab. 2) a ostropestřce mariánského (Tab. 3) u nás od roku 1996:

Tab. 1 Vývoj ploch produkce léčivých rostlin v ČR

ROK	Sklizňová plocha v ha	Produkce v t	Výnos v t.ha⁻¹
1996	5 306	3 636	0,69
1997	6 127	3 570	0,58
1998	6 362	5 282	0,83
1999	950	578	0,61
2000	2 201	2 118	0,96
2001	1 500	974	0,65
2002	2 841	2 086	0,73
2003	5 162	3 003	0,58
2004	5 595	5 257	0,94
2005	3 211	2 596	0,84
2006	2 429	1 963	0,81
2007	2 369	1 892	0,80

(Buchtová, Drašnarová, 2003, LAKR, 2008)

Tab. 2 Vývoj ploch produkce kořeninových a aromatických rostlin v ČR

ROK	Sklizňová plocha v ha	Produkce v t	Výnos v t.ha⁻¹
1996	10 483	7 314	0,70
1997	7 018	5 663	0,81
1998	3 315	2 039	0,62
1999	2 557	1 565	0,61
2000	4 818	2 440	0,51
2001	4 871	3 292	0,68
2002	5 118	3 709	0,72
2003	6 259	4 286	0,68
2004	6 153	2 546	0,40
2005	5 144	3 245	0,63
2006	3 429	2 764	0,81
2007	2 815	2 033	0,72

(Buchtová, Drašnarová, 2003, LAKR, 2008)

Tab. 3 Vývoj ploch produkce ostropestřce mariánského v ČR

ROK	Sklizňová plocha v ha	Produkce v t	Výnos v t.ha ⁻¹
1996	2 400	2 064	0,86
1997	150	93	0,62
1998	120	156	1,30
1999	250	325	1,30
2000	1 300	1 118	0,86
2001	1 500	930	0,62
2002	2 500	2 000	0,80
2003	2 500	1 550	0,62
2004	2 500	1 750	0,70
2005	0	0	0
2006	800	520	0,65
2007	750	450	0,60

(Buchtová, Drašnarová, 2003, LAKR, 2008)

Z tabulek je patrné, že po výrazném nárůstu ploch pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin v letech 2003 a 2004 nastává u nás v posledních letech podle situační a výhledové zprávy opačný trend, kdy se zemědělci od pěstování léčivých i kořeninových a aromatických rostlin odvracejí. Hlavním důvodem je především stále se měnící situace v odbytu těchto komodit v tuzemském prostředí. Podle statistik Českého statistického úřadu (ČSÚ) poklesly u nás sklizňové plochy LAKR v roce 2005 o 28,9 procenta oproti roku 2004 na celkových 8 355 hektarů a tento trend pokračoval i v roce 2006, kdy ČSÚ zaznamenal další téměř třicetiprocentní pokles ploch na konečných 5858 hektarů. S ohledem na vývoj klimatických podmínek v letech 2004 a 2005 nebyl propad produkce úměrný úbytku pěstebních ploch. Léčivé rostliny se v roce 2006 pěstovaly na 2429 hektarech s výnosem 0,81 t/ha, přitom ještě v roce 2005 zaujímaly pěstební plochy léčivých rostlin 3 211 hektarů, tedy pokles ploch o 24,4 procenta (Přibík, 2008).

Plocha pěstování ostropestřce mariánského v posledních letech výrazně kolísá (750 – 2500 ha) s průměrným výnosem 0,75 t.ha⁻¹. Je většinou pěstován pro farmaceutické zpracování, které požaduje vysokou kvalitu produktu (LAKR, 2008). Proto se dává přednost stálému a osvědčenému pěstiteli (Drašnarová, 2005).

Náklady na pěstování jsou zhruba srovnatelné s jarní obilovinou. Při průměrném hektarovém výnosu 1 t je čistý zisk v porovnání s obilovinou vyšší (Spitzová, 1997).

Výkupní ceny léčivých rostlin, tedy ceny zemědělských výrobců, jsou výrazně ovlivňovány především poptávkou na trhu, kvalitou i množstvím domácí produkce a závisí také na objemu dovozu. V posledních letech tyto ceny víceméně stagnují a jsou určovány výhradně nákupci nebo odběrateli a zpracovateli. V průměru se pohybují okolo 140 Kč/kg u květových drog, 55 Kč/kg u kořenových drog a 50 Kč/kg u listových a naťových drog. V konkrétních případech výše ceny odráží obtížnost pěstování, sběru a posklizňové úpravy, vedle prioritního faktoru nabídky a poptávky (Přibík, 2008). Výkupní ceny za kg semene ostropestřce mariánského v posledních letech na tuzemském trhu víceméně stagnují a pohybují se okolo 24 Kč/kg (Dvořáková, 2006).

2.3 Chemické složení

2.3.1 Lignany

Lignany jsou poměrně rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Skládají se ze dvou fenylpropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců (Slanina, 2000).

Název lignany byl pro tuto skupinu přírodních látek odvozen z toho, že sloučeniny byly původně považovány za meziprodukty při biosyntéze ligninu $(C_6 - C_3)_n$, polymeru rovněž složeného z fenylpropanových jednotek jako lignany $(C_6 - C_3)_2$. Dnes je zřejmé, že vzhledem ke struktuře ligninu a lignanů pouze některé z nich mohou sloužit k tomuto účelu (Slanina, 2000).

Lignany jsou tedy pouze chemicky příbuzné polymerním ligninům rostlinných buněčných stěn a byly nalezeny zejména ve dřevě, kde slouží jako stavební bloky pro tvorbu ligninu. V současné době je známo již téměř 500 těchto sloučenin a jejich počet neustále narůstá (Beran, 2007).

Hojně se nacházejí u nahosemenných rostlin (jehličnany) a u dvouděložných rostlin. V rostlinách se mohou vyskytovat ve formě glykosidů, většinou jsou však přítomny ve formě aglykonů. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typická je jejich přítomnost ve dřevě, jak již bylo výše zmíněno, kůře stromů a v pryskyřicích. U některých druhů byl nejvyšší obsah lignanů nalezen v semenech (Slanina, 2000).

Protože se jedná o sloučeniny, které vykazují antimikrobiální, antimitotické, antivirové, antioxidační a antinutriční vlastnosti, předpokládá se, že podobně jako jiné sekundární metabolity zvyšují rezistenci rostlin proti různým patogenům. Jejich nepolární charakter jim umožňuje snadnou prostupnost buněčnými membránami a schopnost ovlivnit v buňkách řadu biologických dějů. Některé lignany se používají jako léčiva, např. cytostatika etoposid a teniposid. Vykazují také výraznou antivirovou aktivitu, včetně aktivity vůči HIV (Slanina, 2000).

Současný výzkum se zaměřuje na lignany identifikované v lidském a zvířecím organismu (Beran, 2007). Byly nalezeny v krvi a moči savců, včetně člověka. Tyto „živočišné“ lignany vznikají ve střevech savců mikrobiální transformací rostlinných lignanů (Slanina, 2000). Strukturálně připomínají syntetické estrogény (ženské pohlavní hormony) a mohou působit jako slabé estrogény, nebo antiestrogény. Tyto látky mají celou řadu pozitivních zdravotních účinků,

působí např. jako prevence onemocnění srdce a oběhového systému, nebo rakoviny (Beran, 2007).

2.3.2 Flavanolignany a jiné účinné látky

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolových látek, které se od sebe liší chemickou strukturou a charakteristikou, vyskytující se všudypřítomně v rostlinách. Jsou přirozenou součástí ovoce, zeleniny, ořechů, semen nebo kůry a tak se staly i nedílnou součástí lidské stravy. Třída flavonoidů zahrnuje flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, antokyany, isoflavony, dihydroflavonoly a chalkony (Cook, Samman, 1996).

V roce 1952 se Herzogovi a Hagedornovi podařilo zjistit, že aktivní složkou semen ostropestřce mariánského jsou právě látky flavonoidní povahy. Struktura dvou flavanonů – silybinu a silydianinu byla objasněna v roce 1960 Janiakem a Hänselem. Dalšími komponentami směsi flavonoidů, souhrnně označované jako silymarin, jsou silychristin a iso-silybin. Všechny tyto látky jsou tvořeny flavanonem taxifolinem (dihydrokvercetin), k němuž je oxidativní adicí připojena molekula koniferalkoholu. Vzhledem k tomu, že koniferalkohol je obvyklou složkou ligninu, dostal tento typ flavonoidů souhrnné označení flavanolignany (Jegorov, 1996).

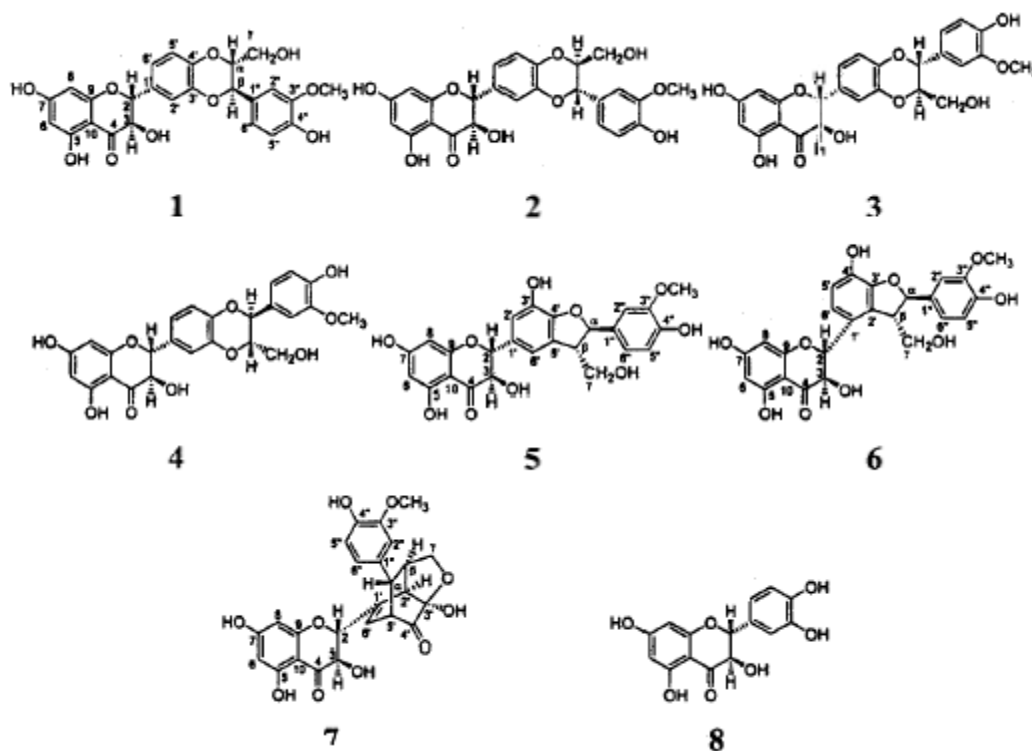
U ostropestřce mariánského jsou pak účinné látky ze skupiny flavanolignanů označovány jako tzv. silymarinový komplex, lokalizovány v oplodí a osemeni plodů (Indrák, Chytilová, 1992), kde se nachází přibližně 70 až 80 % silymarinových flavanolignanů (Křen, Walterová, 2005). Nejdůležitější z tohoto komplexu je směs látek s majoritním zastoupením silybinu, silydianinu, silychristinu a také iso-silybinu. Z těchto čtyř chemických komponent je terapeuticky využíván díky svému hepatoprotektivnímu účinku silydianin a zejména silybin (Indrák, Chytilová, 1992), synonymně nazýván silibinin, někdy gramaticky chybně psán jako silybinin. Silybin představuje směs dvou diastereomerů A a B zastoupených přibližně v poměru 1:1. Bílé kvetoucí varieta obsahuje navíc silandrin, silymonin, silyhermin a neosilyhermin A a B (Křen, Walterová, 2005), které se v semenech fialově kvetoucí rostliny nevyskytují (Jegorov, 1996).

Nažky ostropestřce obsahují také 26 – 28 % bílkovin, 25 – 35 % oleje s vysokým podílem kyseliny linolové (55 – 72 %) a olejové (15 – 26 %) a 8 – 12 % nasycených mastných kyselin. V pokusech ČZU v Praze bylo dosaženo průměrné olejnatosti 24,5 %, přičemž značné rozdíly byly způsobeny rozbory nestejně zralých nažek (Ryant, 2005). Vedle toho obsahují semena ještě

histamin, thyramin, hořčinu, sacharidy, malé množství sílice (Indrák, Chytilová, 1992), tokoferol (0,6%) a steroly, jako kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol (Opletal, Volák, 1999).

Biosyntéza flavonoidů z fenylalaninu představuje řadu specifických enzymatických reakcí, nízká stereospecifita následné oxidativní adice koniferalkoholu je v souladu s předpokládaným radikálovým mechanismem této reakce probíhající jak *in vitro*, tak *in vivo*. Struktura flavonolignanů je neobyčejnou ukázkou stereochemických možností oxidativní adice olefinu (koniferalkoholu) na fenol (taxifolin). Tvorba 1, 4-benzodioxanů, při níž reagují obě sousední fenolické skupiny (3', 4'), poskytuje čtyři stereomery nalezené v přírodní směsi: dva silybiny, kde je α -uhlík koniferalkoholu vázán na 4'-O náležející C-kruhu taxifolinu. Vzhledem k přítomnosti dalších chirálních center v molekule mají jednotlivé stereomery odlišné vlastnosti a lze je tudíž rozlišit kapalinovou chromatografií v achirálním systému. Podle pořadí eluce byly jednotlivé silybiny a iso-silybiny označeny A a B (Jegorov, 1996).

1 silybin A 2 silybin B 3 isosilybin A 4 isosilybin B 5 silychristin 6 isosilychristin 7 silydianin 8 taxifolin



Obr. 1 Chemická stavba některých účinných látek (Nam-Cheol Kim, et al., 2003)

2.3.3 Kultivar Silyb

Jak již bylo zmíněno, za nositele terapeutického účinku je považován silybin. Z toho vyplývá, že droga jako průmyslová surovina by měla mít v silymarinovém komplexu zastoupen především silybin, a to v množství, které umožní jeho izolaci. V přirozených populacích obsah komponent silymarinového komplexu značně kolísá a u jednotlivých individuí se ještě různým způsobem kombinuje. Závisí také na celé řadě vnějších vlivů. V konečném hledisku to znamená, že přirozené populace představují z hlediska obsahu a složení účinných látek nehomogenní soubor jedinců problematických z pohledu dalšího zpracování (Spitzová, 1991).

Vzhledem k tomu, že v původně pěstovaném nešlechtěném materiálu byly koncentrace silybinu nízké (0,2 – 0,6 %) a vzájemný poměr silybin : silydianin kolísal, byla vyšlechtěna pracovníky VÚFB Praha silybinová chemovarieta Silyb, vyznačující se koncentrací silybinu asi 2 %, vyšším výnosem (1 t.ha⁻¹) a vyrovnaností. Na listinu povolených odrůd byla zařazena v roce 1988 (Indrák, Chytilová, 1992).

V průběhu pěstování tohoto kultivaru byla podchycena celá řada genotypů odlišných kvalitativním i kvantitativním složením účinných látek. Z nich nejzajímavější jsou individua umožňující v dosti krátké době vyšlechtění kultivaru, v němž chybí silybin, ale je vhodný k izolaci čistého silydianinu. Šlechtění se zkrátka stalo nejen nedílnou součástí oboru léčivých rostlin, ale zejména prostředkem k dosažení standardní kvality surovin farmaceutického průmyslu (Spitzová, 1991).

2.4 Farmakologické účinky

Ostropestřec mariánský, jeho semena, listy, plody i kořeny jsou po staletí užívány v tradiční evropské medicíně na léčení různých chorob jater. Systematické studie aktivních komponent se datují zhruba od 60. let a pokračují dodnes. Z hlediska hepatoprotektivního účinku při akutních otravách lze rozlišovat dva hlavní účinky flavanolignanů, a sice ochranný efekt na jaterní buněčné membrány (Jegorov, 1996), tj. stabilizuje a reguluje pronikání hepatotoxických látek do jaterních buněk (Fraschini, et al., 2002), a antioxidační efekt (Jegorov, 1996).

Silymarin je považován za velice bezpečný léčebný prostředek a existuje pouze několik studií, ve kterých byly zaznamenány jeho nepříznivé účinky, nejčastěji žaludeční potíže. Nicméně frekvence výskytu takových obtíží byla velmi nízká (2 – 10 % v kontrolovaných pokusech). Zaznamenány byly rovněž některé dermatologické symptomy a bolesti hlavy. Obecně lze říci, že v důsledku nízké rozpustnosti silybinu (ca. 0,5 g.l⁻¹ H₂O) je prakticky nemožné dosáhnout toxické koncentrace *in vivo* (Křen, Walterová, 2005).

Dále se jedná především o prevenci a léčbu jaterních onemocnění způsobených viry, bakteriemi, houbami a chemickými jedy (tlumí např. účinky tetrachlormetanu CCl₄ nebo falloidinu) (Opletal, Volák, 1999). Účinek těchto jaterních jedů, např. CCl₄, thalných solí, ethanolu a dalších spočívá v tvorbě volných radikálů. Při tomto typu otrav převažuje účinek silymarinu jako lapače volných radikálů, jeho inhibiční účinek na různé oxygenasy a peroxidasy a naopak pozitivní efekt na stabilizaci koncentrace neredukovaného glutathionu. V souladu s tím jsou silymarin, jeho jednotlivé konstituenty nebo deriváty zahrnuty do standardních medicínských postupů při akutních otravách (Jegorov, 1996).

Při akutní otravě např. toxiny muchomůrky zelené brání přítomnost silymarinu navázání toxinů na buněčný povrch a aktivnímu transportu dovnitř buňky. Vliv silymarinu na propustnost membrán se zde jeví jako primární ochranný efekt a jeho včasné podání podstatně zvyšuje naději na přežití (Jegorov, 1996, Schuppan, et al., 1999).

Není bez zajímavosti zmínit, že synteticky získaný dimer silybinu vykazuje přibližně desetinasobný ochranný účinek proti poškození jaterních buněk jedním z toxinů muchomůrek – falloidinem (Jegorov, 1996).

Podporuje syntézu RNA (Fraschini, et al., 2002), proniká rovněž do buněčných jader, kde působí jako stimulant syntézy bílkovin a stimulant syntézy DNA. Stimulace proteosyntézy je významným krokem umožňujícím opravu poškozených buněčných struktur a náhradu enzymů poškozených jaterními toxiny. Stimulace syntézy DNA vede k aktivaci buněčného dělení a regeneraci jaterních buněk. Zdá se, že právě tento efekt činí flavanolignany výjimečnými léky se

specifickým účinkem na obnovu jaterního parenchymu i u chronicky poškozených jater (Jegorov, 1996).

Flavonolignany se využívají i jako součást antioxidačních směsí (odstraňují z organismu škodlivé látky), uplatňuje se rovněž jejich schopnost zvyšovat tvorbu žluči a uvolňovat křeče (Opletal, Volák, 1999). Pozitivní účinky byly prokázány i při zraněních popálením, silymarin působí protizánětlivě a napomáhá tak obnovování popálených tkání (Toklu, et al., 2007).

Prokázaly se příznivé účinky při léčbě některých nádorových onemocnění, např. rakoviny tlustého střeva, která se může dokonce kombinovat s tradiční chemoterapií (Hogan, et al., 2007), zejména se jeho účinků využívá k detoxikaci po a preventivně při chemoterapii, kde má příznivý vliv na kardiovaskulární systém (Greenlee, 2007), což potvrzuje i mnoho jiných výzkumů (Post-White, Ladas, Kelly, 2007, Hoh, et al., 2007, Deep, Agarwal, et al., 2007, Křen, Walterová, 2005). Účinných látek lze preventivně využít i při rakovině prostaty (Singh, Argawal, 2004) a k potlačení vývoje nádorových onemocnění, jako jsou rakovina prsu, vaječníků nebo plic (Argawal, et al., 2006).

Vzhledem k tomu, že řada farmakologických studií byla provedena se souhrnem flavanolignanů označovaném jako silymarin, naskytá se logicky otázka, který z nich je nejaktivnější. Při *in vitro* testu na ochranný účinek proti poškození CCl₄ vykazaly pozitivní účinek silybin, silandrin, silymonin a silyhermin v menší míře silydianin. Při hodnocení těchto flavonoidů na ochranný účinek proti poškození galaktosaminem byl účinek silydianinu a silymoninu výrazně vyšší. V souhrnu lze říci, že jednotlivé flavanolignany vykazují podobný účinek. Iso-silybin je však pravděpodobně nejméně aktivní (Jegorov, 1996).

V lidovém léčitelství se semena ostropestřce zpracovávají dvojím způsobem, a to buď mletá či drcená. Obě receptury se používají takřka od nepaměti a zachovávají maximální množství účinných látek (Janča, Zentrich, 1995). Semena získaná individuálním sběrem z divoce rostoucích rostlin doporučuje rozdrtit, dvě minuty vařit a pít odvar po předchozím asi dvacetiminutovém vyluhování (Jaroš, 1992). Takto připravený odvar se doporučuje pít 2krát až 3krát denně (Váňa, 1990). Jednotlivá dávka se připravuje z 1g drogy na pohár odvaru nebo z jedné čajové lžičky drogy na sklenici vody. Účinnější formou je tinktura aplikovaná 4krát denně po 30 až 35 kapkách. Kromě semen se v lidovém léčitelství užívá i list a kořen, např. při bílém výtoku, píchání v boku, žloutence, vodnatelnosti, zánětu pohrudnice a plic a žlučnickových kamenech, kdy se aplikuje odvar z 10 g sušených listů, které se asi 3 minuty povaří v 0,5 l vody a nechá se odstát (Janča, Zentrich, 1995).

2.5 Vliv elicitorů na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského

2.5.1 Stres rostliny a stresory

Pojem stres zavedl maďarsko-německo-kanadský fyziolog Hans Seley, který stres definoval v době těsně před druhou světovou válkou: „Stres je nespecifická (tj. nastávající po různých zátěžích stereotypně) fyziologická reakce na jakýkoli nárok na organismus kladený.“ Slovo nárok zde má v sobě složku nadměrnosti, a proto učitel českých endokrinologů, Josef Charvát, zavedl pojem zátěž. Mluvíme tedy o reakcích zátěžových nebo stresových (Kopřiva, 2002).

Negativní fyzikální a chemické vlivy vnějšího prostředí (abiotické stresory) a negativní biologické vlivy (biotické stresory) se mohou uplatňovat vnitrodruhově mezi rostlinami stejného druhu nebo mezidruhově mezi rostlinou a ostatními organizmy, zejména viry, bakteriemi, houbami, hmyzem, jinými rostlinnými druhy, vyššími živočichy a člověkem. Překročí-li proměnlivost negativních faktorů určitou mez (toleranci rostliny), lze hovořit o stresu rostliny, to znamená, že se objeví poruchy struktur jednotlivých funkcí a následně i orgánů rostliny (Bláha, et. al., 2003).

V zemědělské výrobě je důležitý nejen výnos, ale i kvalita zrna. Kvalitou se rozumí optimální chemické složení, optimální anatomická a morfologická stavba, klíčivost a vitalita. Stresory působí na celou rostlinu, tj. na kořeny, nadzemní část, ovlivňují výnos a kvalitu zrna jednak nepřímo ještě před vlastní tvorbou semene tím, že oslabí rostlinu, nebo přímo v době kvetení, oplodnění a tvorby semene (Bláha, et. al., 2003).

Skupina reakcí, které se spustí pod vlivem stresorů se nazývá stresovou reakcí, jejíž výsledkem je určitá úroveň adaptační schopnosti. Přechodně se může zvýšit i úroveň odolnosti vůči abiotickým stresorům – tento jev je nazýván aklimací. Rostlina se většinou pokouší o toleranci vůči stresu (Bláha, et. al., 2003).

Někdy mohou jako stresory působit i tzv. stimulatory. Jsou to prakticky látky, přípravky, preparáty, v širším pojetí postupy biologické, fyzikální, chemické a jiné, které mají schopnost přímo, nebo nepřímo ovlivňovat růst či vývin rostlin, mohou ovlivňovat rostlinné tkáně v nadzemní i podzemní hmotě, obsah žádoucích i nežádoucích metabolitů. Tyto metabolity obsahují velké množství látek, z nichž některé jsou zároveň látkami účinnými. Tento tlak působící na rostlinu vede k obranným reakcím s následnému utváření sekundárních metabolitů (Dvořáková, 2006).

2.5.2 Elicitory

Elicitor představuje látku, která se vytváří po proniknutí patogena do organismu rostliny a spouští obrannou reakci rostliny. Elicitory lze rozdělit na exogenní a endogenní. Exogenní elicitory vznikají činností patogena a jedná se o jeho metabolity. Z chemického hlediska sem patří např. některé polysacharidy, specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory se uvolňují z narušovaných buněčných stěn organismů. Řadí se mezi ně oligomery chitinu, oligoglukany a glykoproteiny uvolňované hydrolýzou buněčné stěny patogenních hub či oligogalakturonany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky (Bláha, et. al., 2003).

Dále lze elicitory klasifikovat jako obecné a druhově specifické. Obecný elicitor je schopen spustit obrannou reakci v hostitelské i nehostitelské rostlině, druhově specifický elicitor indukuje obranu jen ve specifickém hostiteli (Piterková, 200-).

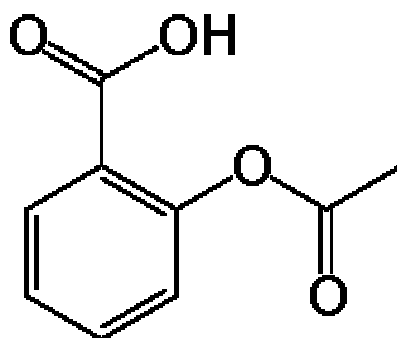
Elicitory užívané při kultivaci rostlin *in vitro* ve farmaceutickém průmyslu nebo i na menších zemědělských plochách mohou být organického i anorganického původu. Optimální koncentraci stejného elicitoru u různých kultur *in vitro* v případě jeho pozitivního působení nelze zevšeobecnit, je specifická, pro různé kultury a dobu elicítace. Účinnost elicítace závisí na mnoha faktorech, které často působí synergicky, jako jsou stáří kultury, koncentrace elicitoru a časových periodách, ve kterých byl elicitor podáván. Elicitor by neměl snižovat životaschopnost kultury, proto se obecně užívají nižší koncentrace elicitorů (Pexídr, 2004, Dvořáková, 2006).

Metoda elicítace využívá schopnosti rostlin reagovat na různé infekční patogeny celou řadou reakcí, jejichž výsledkem je zvýšená tvorba sekundárních metabolitů. Při stresu tak dochází k uvolňování látek z buněčných stěn rostlin a následně k vytvoření nízkomolekulárních látek (fytoalexinů). Tyto fytoalexiny představují obrannou reakci rostliny a zároveň jednu z možností iniciace genové aktivity za vzniku určitých enzymů, které urychlují vznik antimikrobiálně působících sekundárních metabolitů. Patří sem například flavonoidy, isoflavonoidy, terpeny, steroidy, stilbeny aj. (Dicosmo, Misawa, 1985).

2.5.3 Elicítace kyselinou acetylsalicylovou ASA

První syntéza ASA byla uskutečněna v roce 1879 a přestože od jejího prvního léčebného použití uplynulo více jak 100 let, je i nadále tato látka předmětem zájmu medicínské praxe a výzkumu. Stabilní formu ASA syntetizoval německý chemik Felix Hoffmann u Bayerů v Leverkusenu. Později byla účinná látka nazvána aspirinem spojením "a" jako zkratky acetyl,

dále částice "spir" ze slova spirea, tj. jména rostliny, která byla zdrojem salicinu a nový název léku dostal koncovku "in", po léta pro medikamenty oblíbenou. Acetylsalicylová kyselina (Obr. 2) se neuvádí pouze pro zmírnění bolesti či horečky, ale také jako prevence tvorby krevních sraženin - prevence ucpaní tepen, tj. tedy i proti vzniku infarktu myokardu (snížení agregability destiček) nebo mozkové mrtvice (Pexídr, 2004, Dvořáková, 2006).



Obr. 2 Kyselina acetylsalicylová

V řadě pokusů se prokázal pozitivní účinek kyseliny salicylové jako elicitoru. Například přidáním v různých koncentracích (0,5 - 20 mM) do buněčné kultury *Catharanthus roseus* bylo zjištěno zvýšení celkových alkaloidů o 505 %, 1587 % fenolických látek, 612 % furanokumarinu a 1476 % anthokyaninu (Godoy-Hernández, Loyola-Vargas, 1997).

V posledních letech se rozšiřuje používání kyseliny acetylsalicylové jako elicitoru na hospodářské plodiny. Experimentálně byla ověřována aplikace ASA ve vodném roztoku (0,2-2 mg/rostlina nebo 1 - 2 kg.ha⁻¹) na rostliny (ječmen, brambory, cukrovky), kdy se významně zvýšil výnos a efektivita využití vody (například v ječmenu až o 20 % a v cukrovce o 10 %). Účinek aplikace ASA byl porovnatelný s šesti ošetřeními fytohormonem kyselinou abscisovou (ABA). V nestresových podmínkách se ASA chovala jako antitranspirant a zvyšovala osmotický tlak (n). Nicméně po následujícím suchém období byla v ošetřených rostlinách zvýšená hodnota (n) menší než v neošetřených (50%) (Šrámek, 2007).

2.6 Stanovení obsahu účinných látek

2.6.1 Chromatografie

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších analytických a zároveň separačních metod. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu anorganických látek i organických látek obsažených v nejrůznějších přírodních i technických směsích v širokém koncentračním rozmezí (Drbal, Křížek, 1999), tj. poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku (Coufal, 2004). Základy kapalinové kolonové chromatografie položil na počátku 20. století Cvet, botanik ruskoitalského původu, který na sloupci úspěšně rozdělil listová barviva. (Drbal, Křížek, 1999).

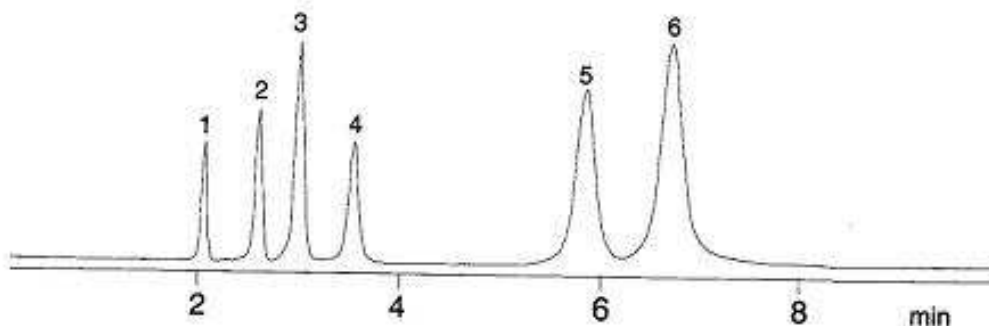
Mezi chromatografické metody patří mimo jiné vysokoúčinná kolonová kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GLC) nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Jednotlivé složky se rozdělují mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází (Kopřiva, 2002).

Pohyblivou fází tvoří plyn nebo kapalina, fáze nepohyblivá, označovaná jako sorbent, může mít velmi rozdílnou formu, např. jí mohou být částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, může to být kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry (Drbal, Křížek, 1999). Tato fáze vytváří tzv. chromatografické lože různého tvaru, kterým protéká fáze pohyblivá (Kopřiva, 2002).

Při styku těchto dvou fází s dělenými látkami vzorku dochází k vzájemným interakcím, které rozhodují o průběhu separačního procesu. Podle typů interakcí je možno dělit jednotlivé chromatografické metody (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná aj.), jejichž názvy jsou vždy odvozeny od mechanismu, na jehož základě dochází k separaci. Při nástřiku vzorku, např. dvojice látek, do chromatografické kolony se nejprve vytvoří zóna obsahující směs obou složek. Ty jsou potom unášeny mobilní fází a na koloně naplněné sorbentem dochází k jejich rozdělení (Drbal, Křížek, 1999).

Po výstupu první látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a zaznamenává tzv. eluční pík. Poté, co kolonu opustí obě rozdělené látky, jsou na záznamu zapisovače patrné dva oddělené eluční píky (Drbal, Křížek, 1999), které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky. Poloha píku na ose x uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu) určuje, o jakou

látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza) (Obr. 3). Identifikace píku se provádí podle analýzy předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, podle tzv. standardní směsi, za stejných experimentálních podmínek (Chromatografie, 2009).



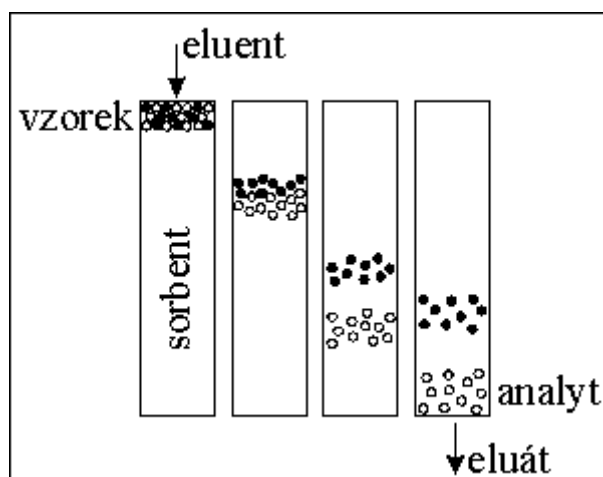
Obr. 3 Záznam chromatogramu – každý pík odpovídá jedné složce analyzované směsi (Chromatografie, 2009)

2.6.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie probíhá v uzavřeném systému a spočívá v minimální kompresibilitě mobilní fáze, malém vlivu teploty na separaci a významné aktivní úloze mobilní fáze. Mobilní fáze je kapalná (Drbal, Křížek, 1999).

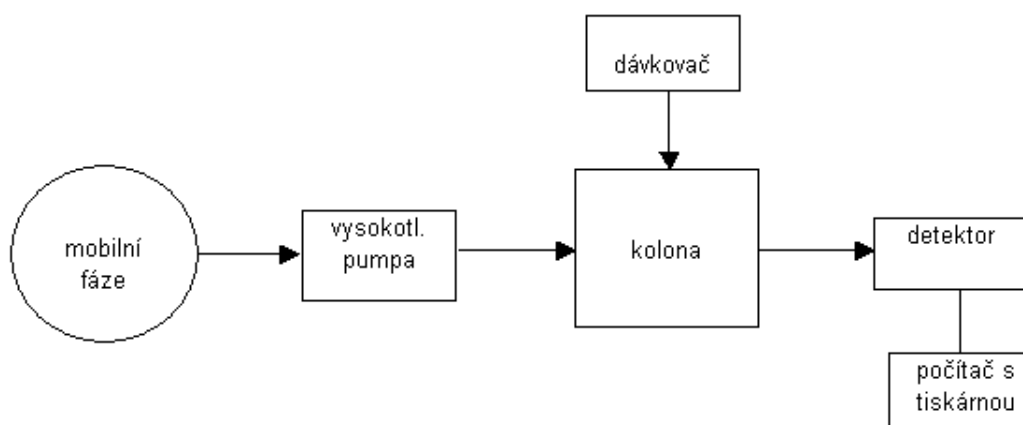
Běžně se pracuje s tlaky od 1 do 60 Mpa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml.min⁻¹. Používají se rovné kolony o délce 10 – 100 cm, nejčastěji 10 – 20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Při dělení složitějších směsí se někdy kolony řadí za sebou. Velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3 – 50 μm. Používají se pulzující membránová nebo pístová čerpadla, kde při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do systému. Vzorokly se dávkuje mikrostříkačkou pomocí tzv. „stop flow“ ventilu, který umožňuje krátkodobé rozpojení čerpadla a kolony a po nástřiku dojde opět k propojení (Drbal, Křížek, 1999).

V separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (eluent), probíhá dělení. Průtokem mobilní fáze dochází k prostupu jednotlivých složek kolonou. Při vhodně zvolených podmínkách je jejich rychlost natolik odlišná, že jednotlivé složky vytvoří oddělené zóny, které postupně opouštějí kolonu ve formě tzv. eluátu, což je roztok složky v mobilní fázi (Obr. 4) (Kopřiva, 2002).



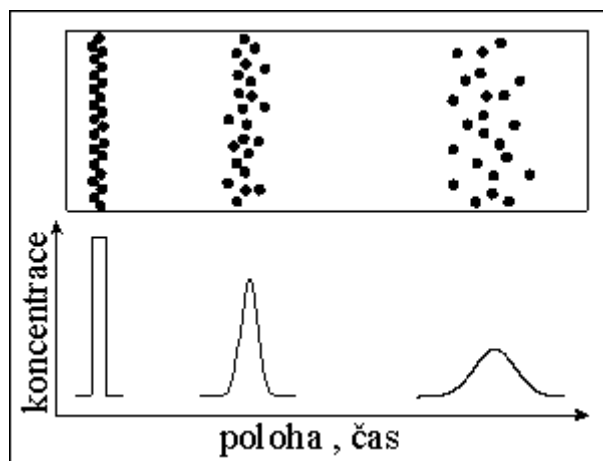
Obr. 4 Rozdělení jednotlivých složek (Coufal, 2004)

Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi a jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány (Coufal, 2004).



Obr. 5 Schématický náčrt kapalového chromatografu (Chromatografie, 2009)

Zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou rozšiřují. Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík neboli eluční křivka, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně (Obr. 6) (Coufal, 2004).



Obr. 6 Kinetika separace (Coufal, 2004)

Při vhodně zvolené vlnové délce je registrována absorbance eluátu. Detektory s proměnlivou a programově měnitelnou délkou, tzv. diode array detektory, jsou schopné ve zvoleném okamžiku proměřit celé spektrum látky. Dále jsou rozšířeny detektory fotometrické, méně běžným detektorem je refraktometrický detektor registrující změny indexu lomu eluátu (Drbal, Křížek, 1999).

Běžně se používají rozpouštědla mísitelná s vodou nebo jiné organické kapaliny, jako metanol nebo acetonitril. Výsledkem je zaznamenaný chromatogram (Obr. 6) (High performance liquid chromatography, 2009).

2.6.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC

Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography) má dvě podoby:

- rozdělovací, kdy stacionární fáze je kapalina zachycená v tenké vrstvě a mobilní fáze je též kapalná, a
- adsorpční, kdy stacionární fáze je tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy, a mobilní fáze je kapalná (Coufal, 2004)

Jedná se o jednoduchou a často používanou chromatografickou metodu, lze ji charakterizovat jako chromatografii v otevřené koloně. Na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze a tudíž analýza může být velmi rychlá v porovnání s kolonou (Sobotníková, 2007).

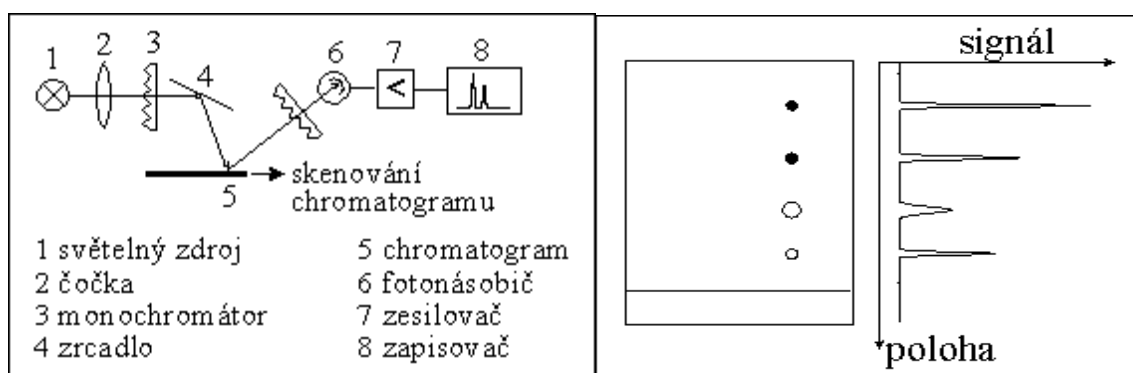
Používají se prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografii se zrnitostí 5 až 40 μm , např. oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměniče, polyamid nanoseny na skleněných deskách nebo hliníkových fóliích. Jako mobilní fáze slouží cyklohexan, toluen,

chloroform, dichlormetan, voda, aceton, etanol, metanol, amoniak, kyselina octová a jejich směsi (Coufal, 2004).

Provádí se na deskách, na kterých je nanese tenká vrstva sorbentu. Na místo, vhodně vzdálené od okraje desky (start), se nanese kapka dělené směsi (Drbal, Křížek, 1999). Nanáší se 0,1 % až 5 % roztoky v množství 200 nl až 20 μ l do skvrn o průměru 2 až 6 mm (Coufal, 2004).

Po odpaření rozpouštědla se deska umístí do chromatografické komory, do níž se předem nasadí určité množství mobilní fáze a komora se nechá saturovat parami rozpouštědel. Vyvíjení se obvykle provádí vzestupně, tzn., že okraj desky se ponoří do rozpouštědla šikmo tak, aby skvrna vzorku byla nad jeho hladinou. rozpouštědlo vzlíná vrstvou sorbentu a unáší s sebou dělené složky. Po určité době se deska vyjme z rozpouštědla, to se nechá odpařit a provede se detekce, a to vybarvením skvrn jednotlivých složek po postřiku chromatogramu vhodným činidlem, nebo prohlížením chromatogramu v ultrafialovém světle či jinou technikou (Drbal, Křížek, 1999).

Analyty lze stanovit přímo na chromatogramu pomocí fotodozimetru (densitometru), který převede skvrny analytů na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně, nebo se analyty extrahují z chromatogramu a stanoví se vhodnou metodou v roztoku (Obr. 7) (Coufal, 2004).



Obr. 7 Vyhodnocení chromatogramu (Coufal, 2004)

Kvalitativní vyhodnocování chromatogramů se provádí změřením hodnot retardačním faktorem R_F (Obr. 7) jednotlivých složek a jejich porovnáním se standardními vzorky chromatografovanými za stejných podmínek. Vyhodnocení je možno provést několika způsoby, z nichž nejjednodušší je vizuální porovnání velikosti skvrn stanovované složky ve vzorku a ve standardu (Drbal, Křížek, 1999).

$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k_i}$$

- u_i = rychlost skvrny i-tého analytu
- u_m = rychlost (čela) mobilní fáze
- d_i = vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu
- d_m = vzdálenost čela mobilní fáze od startu

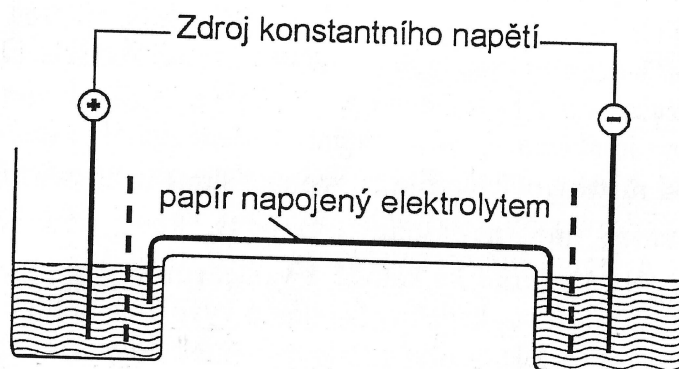
Obr. 8 Měření hodnot retardačním faktorem (Coufal, 2004)

Jinou možností je vymytí skvrn jednotlivých složek (např. po rozstříhání chromatogramu) a použití některé z technik kvantitativní analýzy (např. fotometrie) ke stanovení (Drbal, Křížek, 1999).

2.6.2 Elektroforéza

Elektroforéza patří mezi elektromigrační metody, které využívají rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost nabitých částic závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí, ve kterém separace probíhá a na síle použitého elektrického pole. Tyto metody se aplikují výhradně v kapalně fázi, obvykle ve vodných roztocích (Drbal, Křížek, 1999).

Zařízení pro klasickou elektroforézu (Obr. 9) se skládá ze dvou elektrod umístěných do rezervoárů elektrolytu (obvykle tlumivého roztoku). Oba rezervoáry jsou vodivě spojeny vhodným médiem napuštěným elektrolytem. Celý systém je uzavřen ve schránce, aby nedocházelo k odparu roztoku elektrolytu z porézního média. Jako médium se používá speciální filtrační papír napojený elektrolytem či skleněná deska s vrstvou celulosy či gelu (Drbal, Křížek, 1999).



Obr. 9 Zařízení pro elektroforézu (Drbal, Křížek, 1999)

2.6.2.1 Kapilární zónová elektroforéza CZE

Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis) neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku se provádí jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře. Kapiláry jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyamidový povlak, jsou křehké. V místě detekce je malý podíl povlaku odstraněn. Kapilára je běžně 25 až 100 cm dlouhá a její vnitřní povrch může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Úprava povrchu je využívána pro různé účely, např. ke snížení adsorpce vzorku nebo ke změně iontového náboje na kapilární stěně (Klouda, 2005).

Hlavní výhodou elektroforézy v kapilárním provedení je možnost zvyšovat svorkové napětí přístroje až k hodnotám 30 kV. Generované teplo je odvedeno stěnou kapiláry do okolního termostátového prostoru. Rychlost částice je přímo úměrná intenzitě elektrického pole, proto jsou rychlosti migrujících iontů vyšší oproti klasické elektroforéze (Drbal, Křížek, 1999).

Zónová elektroforéza se v současnosti provádí převážně v plošných uspořádáních na tenkých vrstvách gelů či na fólii acetátové celulózy (polyakrylamidový gel, agarózy). Tloušťky gelových vrstev jsou 0,2 – 1 mm, používají se pufrы o koncentracích 0,005 – 0,05 mol.l⁻¹ (Vávrová, 2008).

Do kapiláry je na jejím anodovém konci zaveden vzorek (1 – 10 nl). Dávkované množství je tedy přibližně tisíckrát nižší než u chromatografických metod. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do vhodného tlumivého roztoku a při 10 – 30 kV dochází v kapiláře k elektroosmotickému toku, kterým jsou jak kationty, tak anionty transportovány směrem k detektoru. Během této cesty dochází k separaci. O kvalitě dělení rozhoduje zejména délka kapiláry, rychlost elektroosmotického toku a pohyblivost dělených iontů, která je závislá na pH roztoku a teplotě, při níž separace probíhá (Drbal, Křížek, 1999).

2.6.3 Srovnání metod pro stanovení účinných látek v ostropestřci mariánském

Při porovnání metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla v některých pokusech nalezena vyšší koncentrace silybinu, přestože příprava vzorku k analýze jak TLC, tak i HPLC byla stejná. Statisticky bylo prokázáno, že mezi stanovením obsahu silybinu v droze metodou HPLC a stanovením

spektrofotometrickou metodou, po rozdělení na jednotlivé komponenty pomocí TLC, existuje vysoce průkazný rozdíl. Důvodem se stala reakce mezi diazotovanou kyselinou sulfanilovou a silybinem a iso-silybinem, které nejsou na tenké vrstvě rozděleny. U HPLC byla odečtena koncentrace pouze silybinu, resp. iso-silybinu, neboť u těchto komponent dochází na koloně k rozdělení a jsou detekovány samostatně (Indrák, Chytilová, 1992).

Při porovnávání HPLC a kapilární zónové elektroforézy (CZE) bylo různými autory dosaženo podobných výsledků (Velikinac, et. al., 2004, Quaglia, et. al., 1999, Kvasnička, et. al., 2003). Obsah silymarinových komponentů v droze dokonce koreloval s jejich antioxidačními účinky. Zajímavostí se stala čistota extraktů ostropestřce mariánského, kdy se při vyšší čistotě snižoval antioxidační účinek, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že nečistoty samotné měly vyšší antioxidační účinek než identifikované flavonolignany, a proto se stanou předmětem dalšího bádání (Kvasnička, et. al., 2003).

Experimenty za podobně popsanych podmínek prokázaly, že metoda CZE je více selektivní, zatímco metoda HPLC více senzitivní (Velikinac, et. al., 2004) s tím, že metoda CZE neseparovala diastereomery isosilybinu a metoda HPLC jejich separaci umožňuje (Quaglia, et. al., 1999) a v konečném výsledku udává nepatrně vyšší celkové obsahy flavonolignanů. Na druhou stranu metoda CZE je dvakrát rychlejší a oproti metodě HPLC poskytuje lepší separaci silychristinu a silydianinu a díky své přesnosti vyhovuje veškerým farmakologickým kritériím (Kvasnička, et. al., 2003).

Obecně lze říci, že při použití metody HPLC a CZE se dosahuje srovnatelných výsledků. Při porovnávání metody HPLC a TLC bylo prokázáno, že vliv na výsledek má vzhledem k obsahu účinných látek rovněž i stupeň umletí semen (rozdíl až 26 %), doba ponechání mleté drogy před další extrakcí (rozdíl až 12 %), způsob utěsnění baňky – vlivem netěsnosti může dojít k částečnému odpaření extrakčního činidla (aceton, bod varu 56,3 °C), a tím vlastně k zakoncentrování silybinu (rozdíl až 13 %), kvalita použitého extrakčního činidla a standardních látek (Indrák, Chytilová, 1992) a způsob extrakce (Subramaniam, et. al., 2007).

3. Vlastní pokus

Cílem této práce bylo porovnat metody přípravy extraktů ze semene ostropestřece mariánského se zaměřením na získání co nejvyššího obsahu účinných látek a provést optimalizaci extrakce vybraných účinných látek ze semene rostliny. Dále zhodnotit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v semeni rostliny, použita byla kyselina acetylsalicylová (ASA) ve třech různých koncentracích.

Pokusy byly uskutečněny v roce 2007 na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a pozemcích u Svárova v blízkosti Velkých Opatovic, které nám poskytlo Zemědělské družstvo ve Velkých Opatovicích ve spolupráci s Ing. Martinem Pilařem, AGRA GROUP, a.s., Střelské Hoštice.

Na pozemcích Jihočeské univerzity bylo vytyčeno 16 pokusných parcel, každá o velikosti 1 m², z nichž 4 byly určeny pro kontrolu a postřik byl na nich proveden pouze vodou, další čtyři byly stříkány kyselinou acetylsalicylovou o nízké [10⁻⁵ mol.l⁻¹] (0,1 ml/10 l H₂O), další čtyři parcelky o střední [10⁻⁴ mol.l⁻¹] (1 ml/10 l H₂O) a zbylé čtyři o vysoké koncentraci [10⁻³ mol.l⁻¹] (10 ml/10 l H₂O) ASA, jak ukazuje schéma na obr. 10.

Obr. 10 Schéma aplikovaných postřiků na parcelkách v areálu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007

K	N	S	V
V	S	N	K
S	V	K	N
N	K	V	S

K – kontrola

N – nízká koncentrace ASA

S – střední koncentrace ASA

V – vysoká koncentrace ASA

Semena ostropestřece byla zasetá 4. května, jednotlivé postřiky byly aplikovány 27. června, 16. července a 13. srpna. Sklizeň proběhla ve druhé dekádě září.

Na pozemku u Svárova bylo pro potřeby tohoto experimentu vytyčeno 20 parcel o rozměru 1×2 m a tyto byly označeny 20 A – E, 21 A – E, 22 A – E a 23 A – E (schéma na obr. 11), přičemž parcely označené číslem 20 sloužily pro kontrolu a postřik byl proveden vodou, parcely označené číslem 21 byly stříkány nízkou [10^{-5} mol.l⁻¹], parcely s číslem 22 střední [10^{-4} mol.l⁻¹] a parcely s číslem 23 vysokou [10^{-3} mol.l⁻¹] koncentrací ASA. Pro laboratorní rozbor byla použita semena z rostlin z parcel označených písmeny D a E.

Obr. 11 Schéma aplikovaných postřiků na parcelkách u Svárova

22D	23D					20E	21E	22E	23E					
23B					20C	21C	22C	23C					20D	21D
				20A	21A	22A	23A					20B	21B	22B

Zde proběhl výsev 23. dubna, jednotlivé postřiky se aplikovaly 25. června, 20. července a 14. srpna. Sklizeň byla uskutečněna v první dekádě září.

3.2 Metodika pro porovnání přípravy extraktů s cílem maximálního výtěžku účinných látek

3.2.1 Metodika přípravy extraktů pro maximální výtěžnost účinných látek

Semena byla na laboratorním robotu rozemleta na hrubou mouku – šrot. Do čtyř Stohmanových baněk bylo odváženo po 10 g šrotu a baňky byly doplněny destilovanou vodou na 500 ml a jeden týden denně protřepávány. Poté byly vloženy na jeden týden do termostatu:

1. baňka při 20°C
2. baňka při 30°C
3. baňka při 50°C
4. baňka při 60°C

Obsah baněk byl zfiltrován, extrakty označeny k analýze jako 1, 2, 3, 4 filtrát.

Do dalších 4 Stohmanových baněk bylo opět naváženo po 10 g šrotu a doplněno na 500 ml destilovanou vodou. Baňky byly protřepány a následně uloženy v laboratoři při laboratorní teplotě 20 °C po různě dlouhou dobu. Poté byly zfiltrovány:

1. baňka po 4 hodinách, zbylé protřepány
2. baňka po 8 hodinách, zbylé protřepány
3. baňka po 24 hodinách, zbylá protřepána
4. baňka po 96 hodinách

Tyto baňky byly postupně označeny k analýze jako 5, 6, 7, 8 filtrát.

Do nových Stohmanových baněk bylo opět naváženo po 10 g šrotu

1. baňka doplněna na 500 ml destilovanou vodou
2. baňka doplněna na 500 ml 20% etanolem
3. baňka doplněna na 500 ml 40% etanolem
4. baňka doplněna na 500 ml 60% etanolem
(etanol ředěn destilovanou vodou)

Všechny baňky byly uloženy při laboratorní teplotě (20°C) na 96 hodin a denně protřepávány, poté zfiltrovány a označeny k analýze jako 9, 10, 11, 12 filtrát.

Dále bylo vloženo 25 g šrotu do patryony Soxhletova extraktoru a extrahováno 6 hodin chloridem uhličitým v digestoři. Poté byl šrot z patryony dán na hodinové sklo, na vzduchu se nechal CCl_4 zhruba odpařit. Následovalo sušení v sušárně při teplotě 60-70°C.

Do 2 Stohmanových baněk bylo naváženo 10 g odtučněného šrotu, doplněno destilovanou vodou na 500 ml, uloženo při laboratorní teplotě po 96 hodin a denně protřepáváno. Následovala filtrace a označení jako 13 filtrát a 15 filtrát.

Do dalších 2 Stohmanových baněk bylo naváženo 10 g neodtučněného šrotu, doplněno destilovanou vodou na 500 ml, uloženo při laboratorní teplotě po 96 hodin a denně protřepáváno. Následovala filtrace a označení jako 14 filtrát a 16 filtrát.

Do nových Stohmanových baněk bylo opět naváženo po 10 g šrotu:

1. baňka doplněna na 500 ml 80% etanolem
2. baňka doplněna na 500 ml 96% etanolem

Při laboratorní teplotě uloženy na 96 hodin, zfiltrovány a označeny k analýze jako 17, 18 filtrát.

3.2.2 Metodika pro vyhodnocení vlivu elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského

Do odměrné baňky o objemu 25 ml se navážil 1 g jemně pomleté drogy ostropestřce mariánského. K navážce se přidal 1 ml vody (redestilované) a nechala se 1 hodinu stát. Poté bylo přidáno 23 ml směsi acetonu (p.a.) a metanolu (p.a.) (26:20, v/v). Takto připravená směs byla míchána 1 hodinu pomocí ultrazvuku, poté následovala 12 hodinová macerace. Acetonmetanolová frakce byla filtrována přes nylonový filtr a extrakt byl 6x zředěn (100 μ l vzorku + 500 μ l metanolu).

3.3 Stanovení účinných látek

3.3.1 Porovnání metod pro přípravu extraktů s cílem maximální výtěžnosti účinných látek

Obsah silymarinu byl stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) na přístroji varian Pro Star.

Jako mobilní fáze byla užitá směs methylkyanidu a vody s přídatkem kyseliny fosforečné. Mobilní fáze A: 10% CH_3CN + 0,1% H_3PO_4 (85%) \rightarrow (100 ml CH_3CN + 900 ml extrepure H_2O) + 1 ml H_3PO_4 ; mobilní fáze B: 50% CH_3CN + 0,1% H_3PO_4 (85%) \rightarrow (500 ml CH_3CN + 500 ml extrepure H_2O) + 1 ml H_3PO_4 .

Gradient: 0 min. – 75% A; 20 min. – 37% A; 35 min. – 37% A. Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min. Záznam a vyhodnocení bylo provedeno při $\lambda = 288$ nm. Data byla analyzována softwarem HP Chem Station (Hewlet Packard).

Standardy byly připraveny v methanolu (Silydianin 1,18 mg/10 ml CH_3OH ; Silybinin 1,22 mg/10 ml CH_3OH ; Silychristin 1,36 mg/10 ml CH_3OH). Množství silymarinu bylo počítáno podle kalibrační křivky pro silybinin.

3.3.2 Vliv elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského

Extrakty byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Separace probíhala na koloně Nucleosil C 18 o rozměrech 4,6 x 250 mm (zrnění 5 μ m). Kolona byla spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně.

Jako mobilní fáze byla užitá směs metanolu, acetonitrilu a vody s přidavkem kyseliny fosforečné. Mobilní fáze A: 22 % CH₃OH (metanol) + 15 % CH₃CN (acetonitril) + 63 % H₂O + 0,5 % H₃PO₄; mobilní fáze B: 40 % CH₃OH + 20 % CH₃CN + 40 % H₂O + 0,5 % H₃PO₄. Gradient byl následující: 0 min. – 100 % A; 30 min. 100 % B; 35 min. – 100 % A. Celkový čas analýzy byl 40 minut. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 0,9 ml/min. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l.

Detekce byla provedena pomocí diodového pole (DAD). Data byla zpracována při vlnové délce 288 nm a vyhodnocena pomocí softwaru Interactive Graphics Version 6.5. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků.

Pro kalibraci kvantitativního stanovení silymarinu byly připraveny zásobní roztoky taxifolinu (TX), silychristinu (SCH), silydianinu (SD), silybinu A a B (SB A,B) a silybininu A a B (ISB A,B) v metanolu. Z těchto zásobních roztoků byl připraven směsný standard, jehož naředěním byly dále připraveny směsné standardní roztoky o koncentracích: 2,219 – 142 ug/ml TX; 1,625 – 104 ug/ml SCH; 3,313 – 212 ug/ml SD; 3,563 – 228 ug/ml SB A a B; 0,836 – 53,50 ug/ml ISB A a 0,352 – 22,5 ug/ml ISB B. Podmínky analýzy byly totožné jako při stanovení silymarinových extraktů.

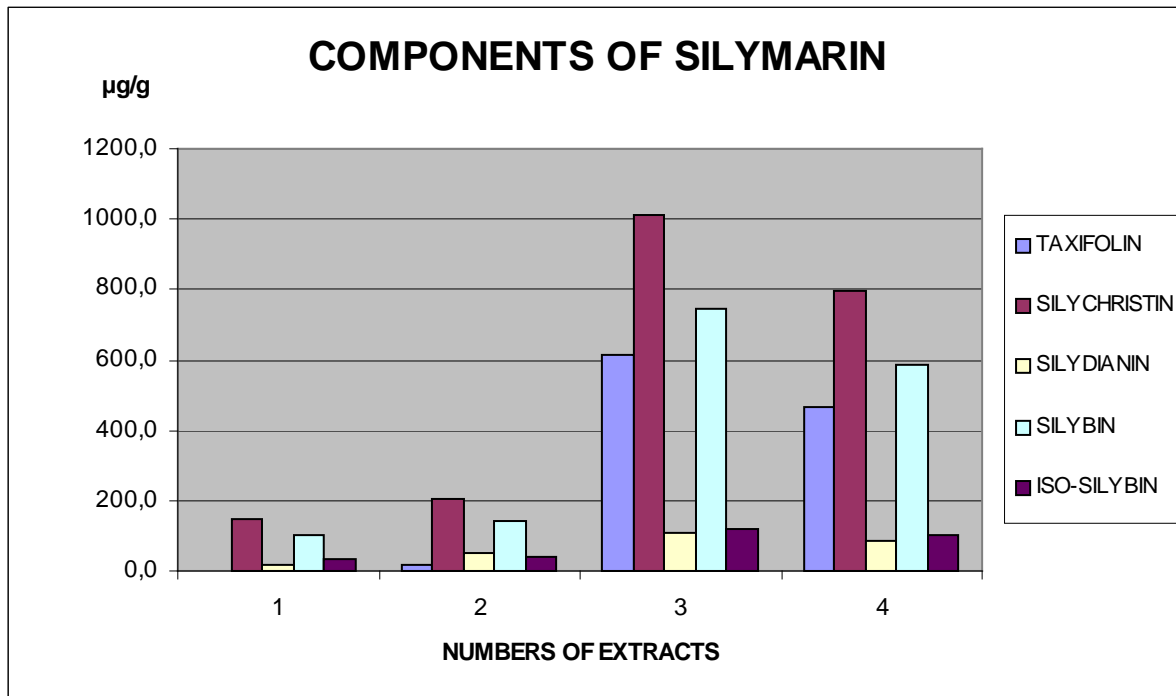
4. Výsledky

Tab. 4: Množství účinných látek ostropestřce mariánského pro stanovení neúčinnější metody extrakce

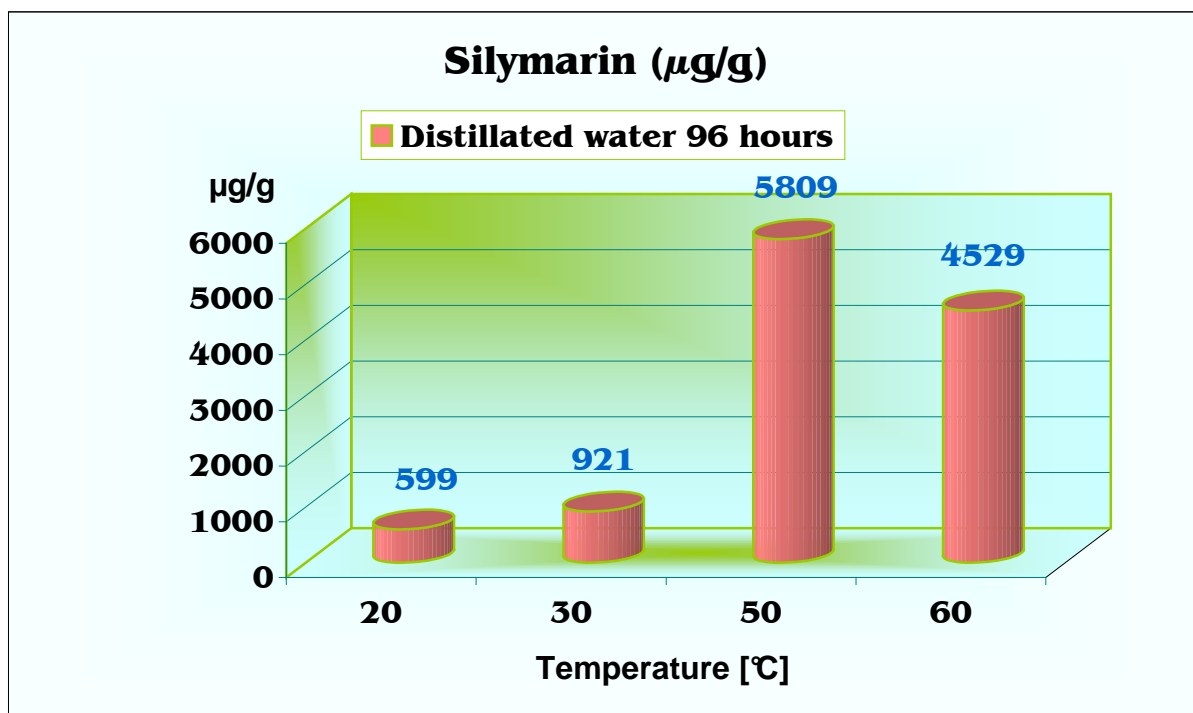
Označení filtrátu	TX [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	SCH [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	SD [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	SB [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	ISB [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] vyjádřeno jako silybinin	Silymarin [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
1	0,0	148,9	15,8	103,9	32,7	599
2	17,7	205,9	52,3	139,8	37,8	921
3	615,3	1015,1	108,5	743,3	119,4	5809
4	466,0	794,2	84,0	586,9	102,1	4529
5	46,5	41,9	1,9	45,4	28,1	388
6	24,5	24,4	1,0	31,3	8,9	211
7	34,0	25,4	1,1	32,4	9,7	247
8	12,3	80,3	7,0	65,4	147,9	685
9	8,1	81,3	4,6	83,5	175,9	776
10	377,6	852,9	97,1	798,9	150,4	4993
11	605,5	3242,2	669,3	4720,6	835,8	21646
12	748,3	4505,9	747,3	7562,8	1512,0	32576
13	75,5	157,9	7,7	155,7	32,9	950
14	18,1	136,9	7,1	106,8	34,5	627
15	54,0	130,0	122,6	257,9	202,9	1722
16	28,1	150,5	13,3	130,0	41,5	764
17	149,2	2451,8	325,5	4572,2	936,2	18098
18	90,5	1429,9	185,5	2708,0	520,7	10594

TX ... taxifolin, SCH ... silychristin, SD ... silydianin, SB ... silybin, ISB ... iso-silybin

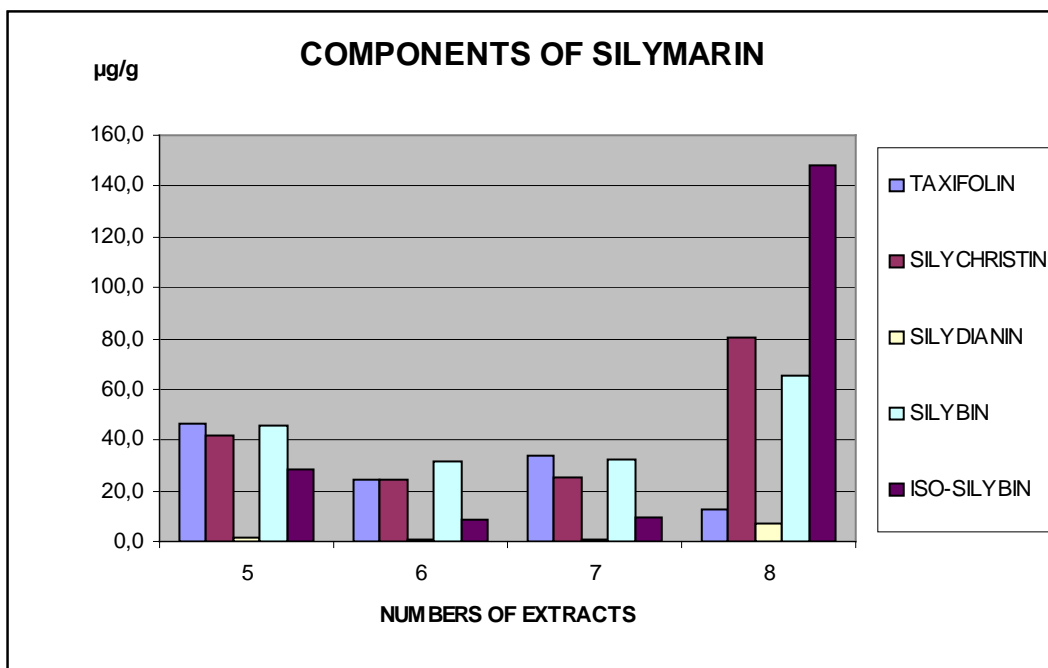
Graf 1: Množství jednotlivých složek silymarinu získaného po 96 hodinách z destilované vody při různých teplotách uložení



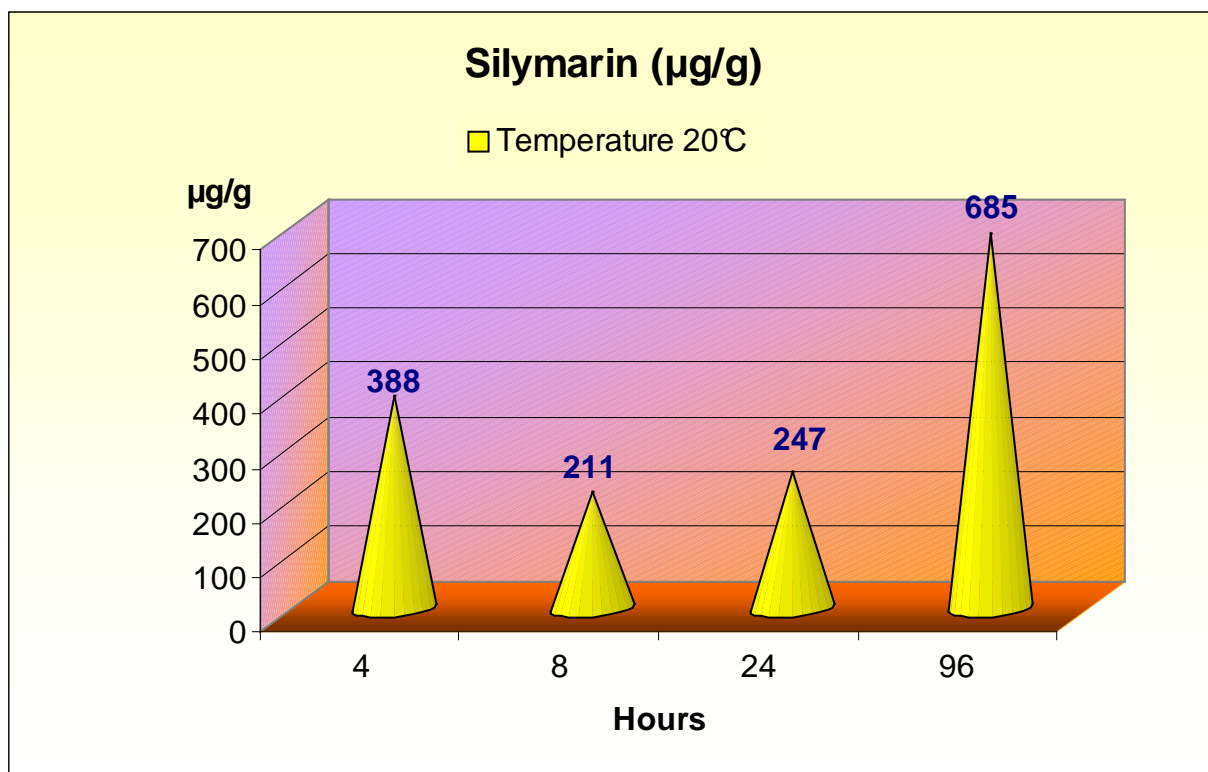
Graf 2: Množství silymarinu získaného po 96 hodinách z destilované vody při různých teplotách uložení



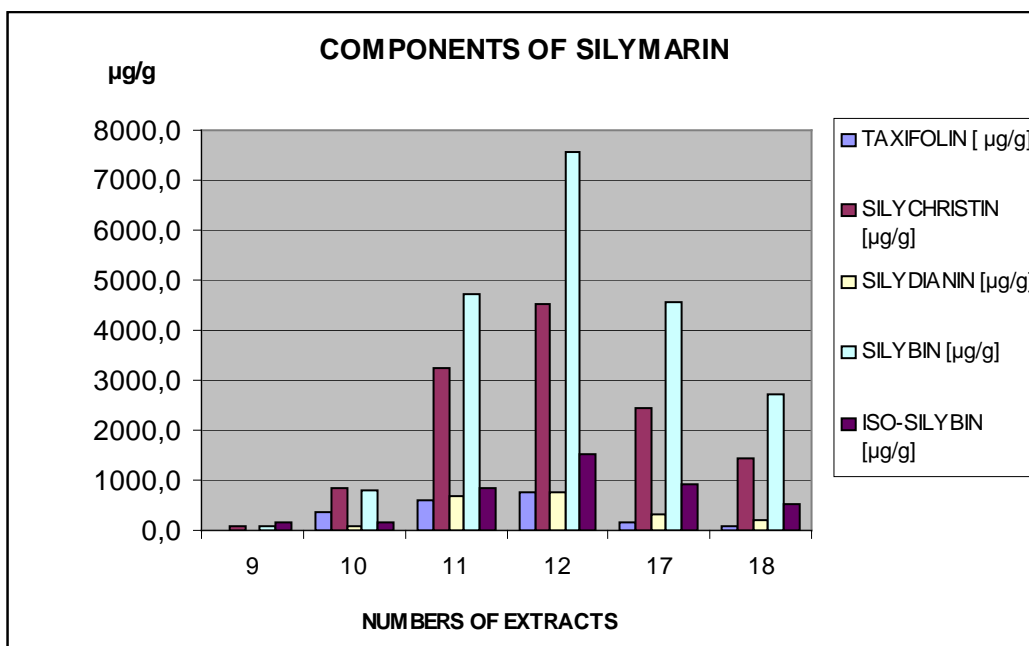
Graf 3: Množství jednotlivých složek silymarinu při laboratorní teplotě 20 °C po různě dlouhou dobu uložení



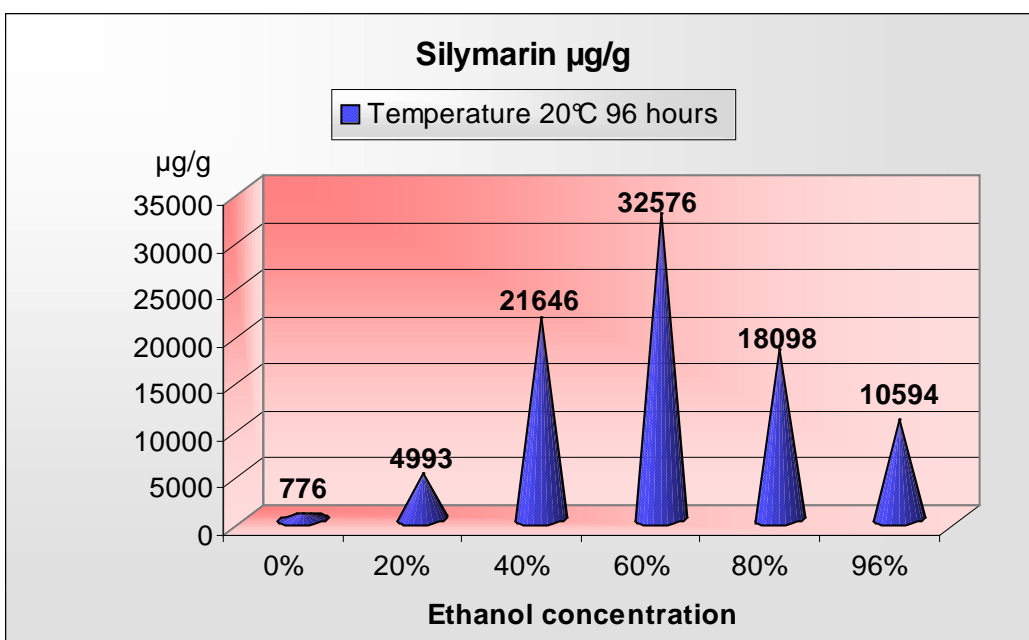
Graf 4: Množství silymarinu získaného z destilované vody při laboratorní teplotě 20 °C po různě dlouhou dobu uložení



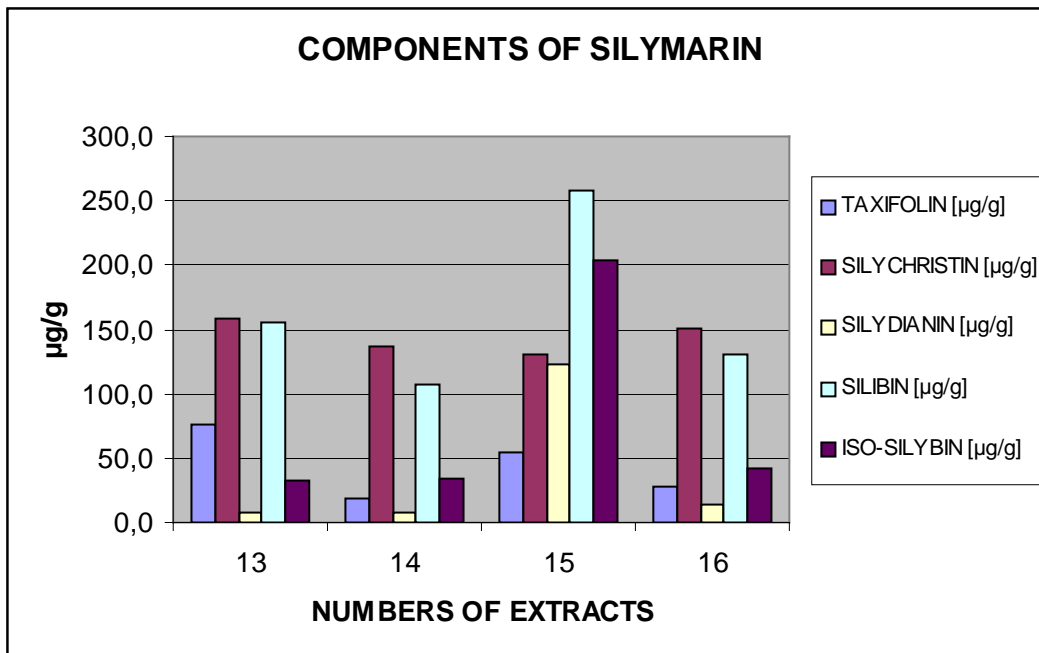
Graf 5: Množství jednotlivých složek silymarinu při různých koncentracích etanolu při teplotě 20°C a době uložení 96 hodin



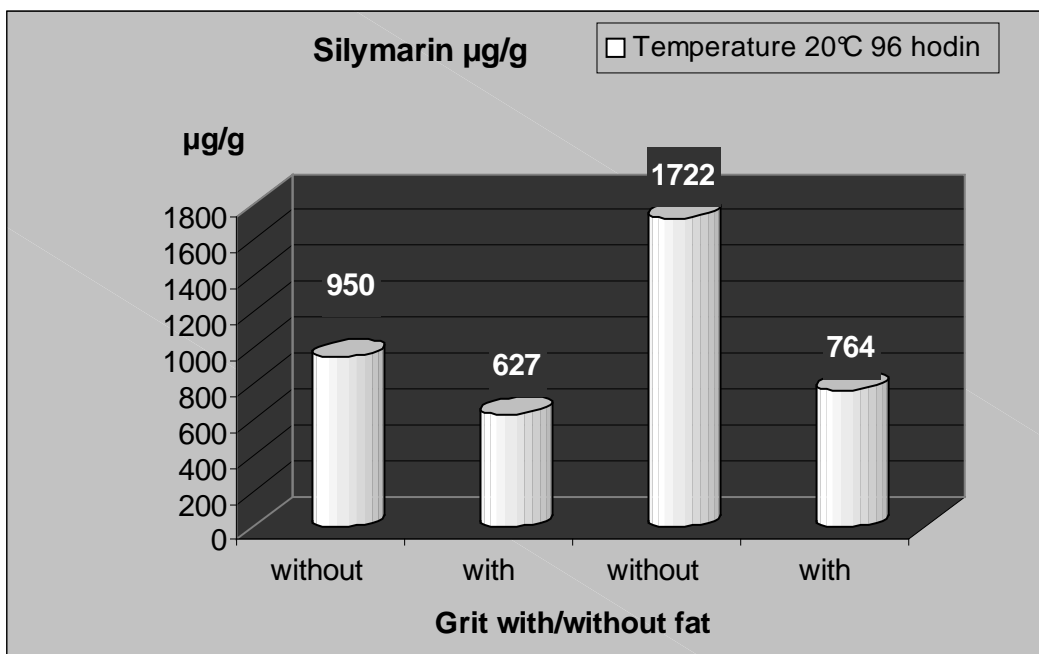
Graf 6: Množství silymarinu získaného z různých koncentrací etanolu při teplotě 20°C a době uložení 96 hodin



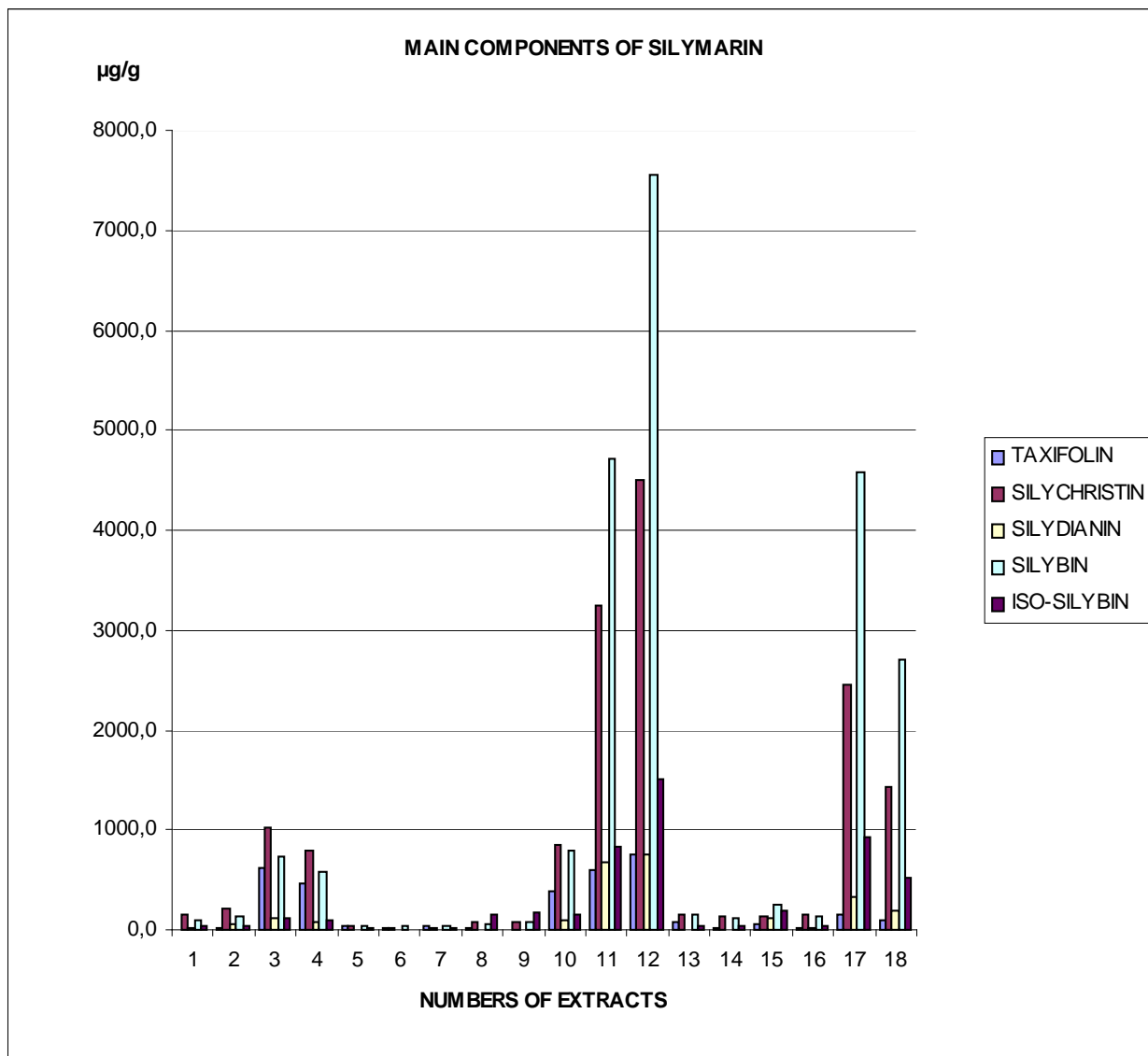
Graf 7: Jednotlivé složky silymarinu v odtučněném a neodtučněném šrotu



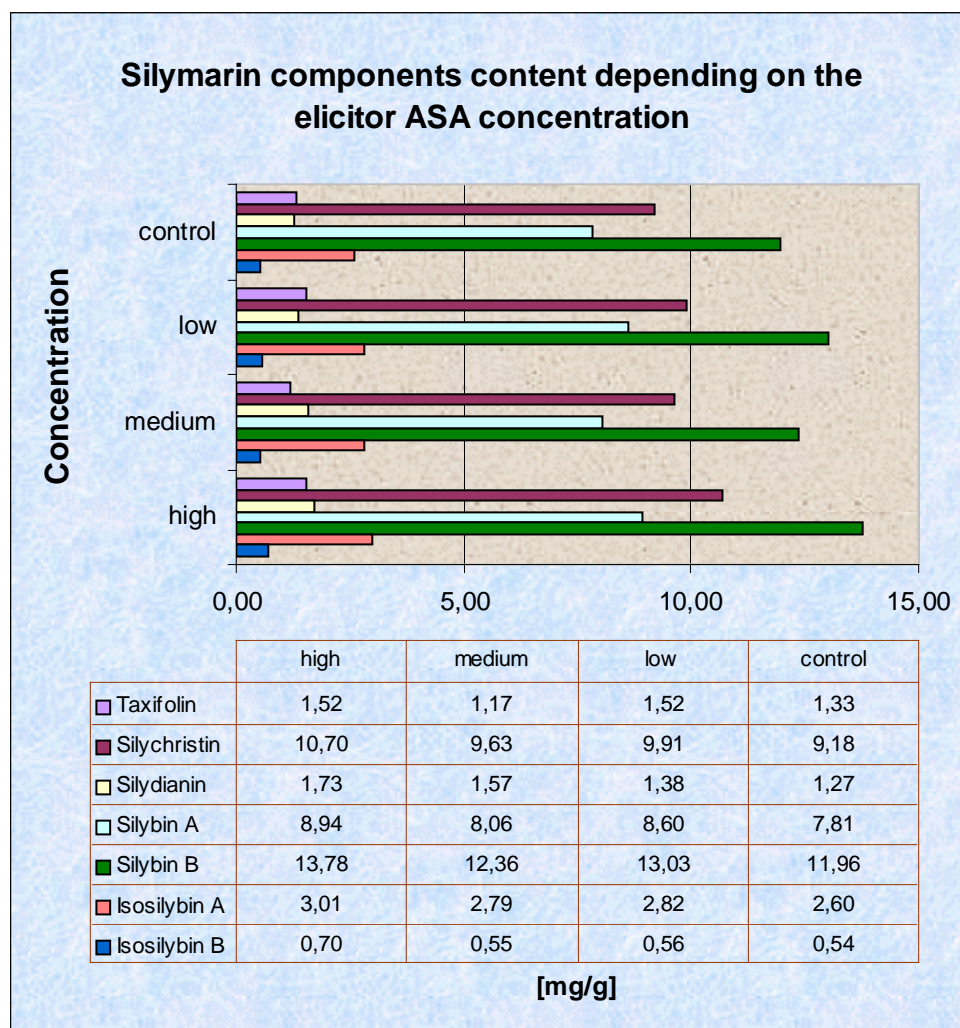
Graf 8: Množství silymarinu získaného z odtučněného a neodtučněného šrotu použitím destilované vody při teplotě 20°C a uložení po dobu 96 hodin



Graf 9: Množství jednotlivých složek silymarinu stanoveného metodou HPLC při různých způsobech přípravy extraktů



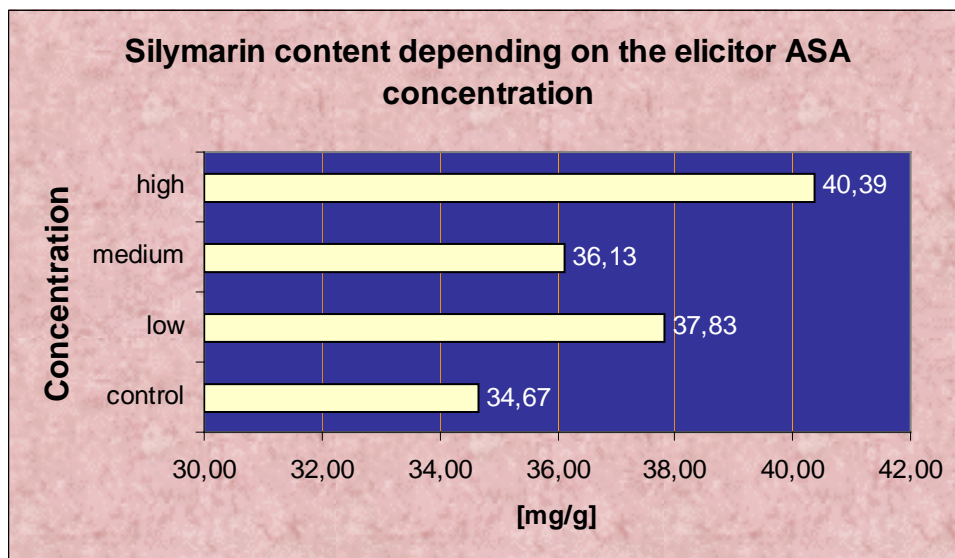
Graf 10: Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicitace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007, přepočteno na 100 % sušinu.



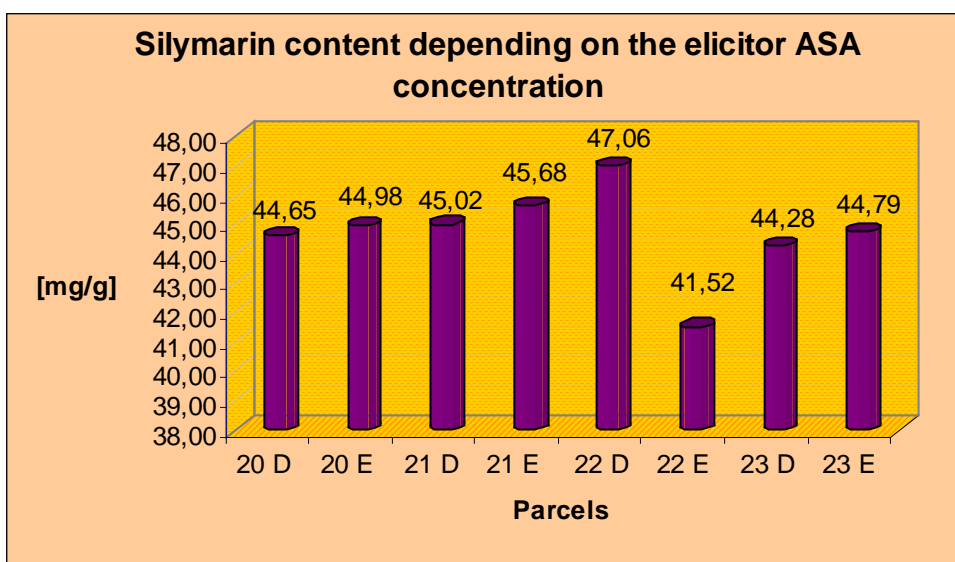
Tab. 5 Změna obsahu účinných látek po aplikaci ASA na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Koncentrace ASA	[mg.g ⁻¹]	Procentický obsah silymarinu
kontrola	34,67	100,00
nízká	37,83	109,12
střední	36,13	104,21
vysoká	40,39	116,48

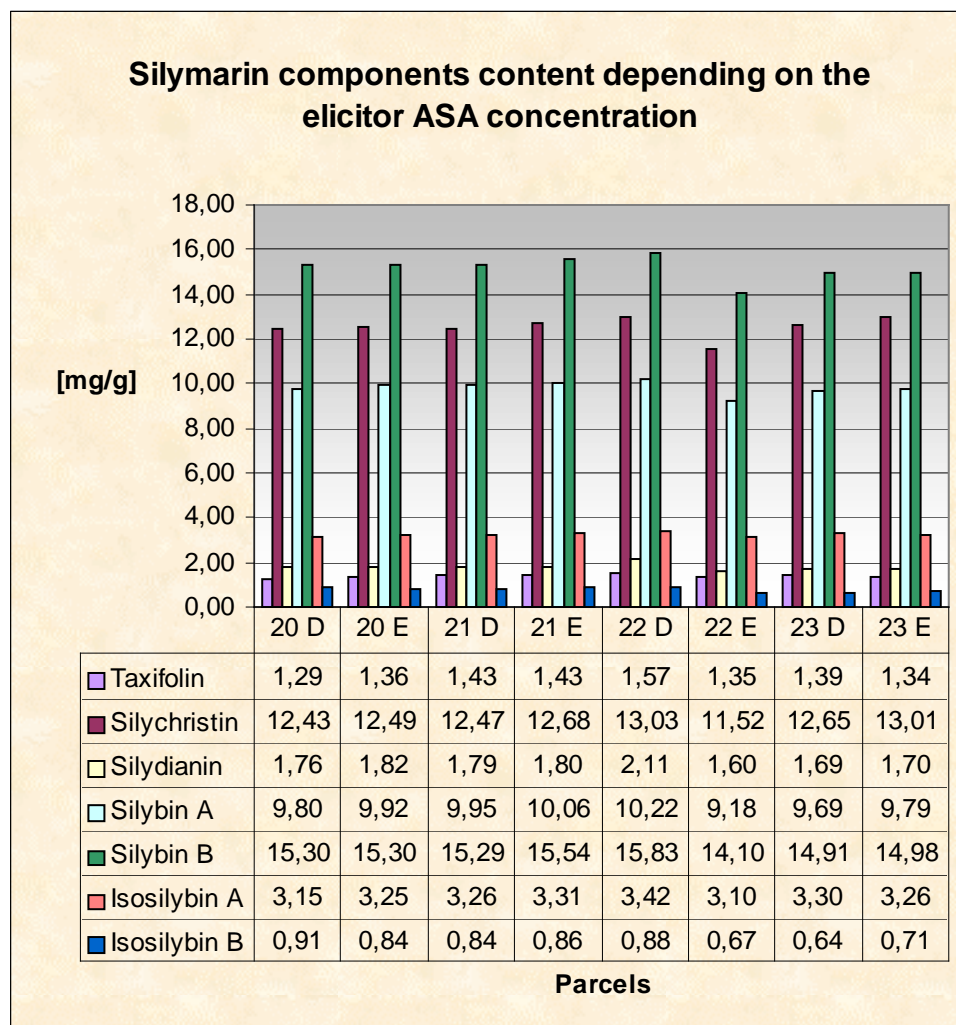
Graf 11: Obsah silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace ze semen ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007



Graf 12: Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic v roce 2007, přepočteno na 100 % sušinu



Graf 13: Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic v roce 2007, přepočteno na 100 % sušinu.



Tab. 6 Změna obsahu účinných látek po aplikaci ASA na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic (pro výpočet použit průměr parcel stříkaných touže koncentrací ASA)

Koncentrace ASA	[mg.g ⁻¹]	Procentický obsah silymarinu
kontrola	44,81	100,00
nízká	45,35	101,20
střední	44,29	98,83
vysoká	44,53	99,37

5. Návrh technologie pěstování ostropestřce mariánského

Na základě poznatků uvedených v kapitole 2.2 navrhuji pěstovat ostropestřec mariánský na ploše 1 – 5 ha následovně. S přihlédnutím k relativně malé provozní ploše a trendům ekologického zemědělství budu vycházet z extenzivního způsobu pěstování.

5.2 Předset'ová příprava a výsev

Ostropestřec mariánský je výhodnější sít do hlubších hlinitých půd s dobrou zásobou živin, u nás nejlépe v podmínkách řepářského nebo obilnářského výrobního typu. Pečlivé urovnání povrchu je důležité pro dodržení stejnoměrné hloubky výsevu. Po sklizené předplodině bude vhodné provést kvalitní podmítku a hlubokou orbu (0,25 – 0,30 m) nejlépe se zapravením organického hnojiva. V jarní předset'ové přípravě se už vyhneme aplikaci hnojiv, neboť v našich podmínkách má množství srážek během kritického období mnohem větší vliv na výnos plodů ostropestřce než běžné půdní podmínky a hnojení

Termín výsevu je závislý na daném regionu a pohybuje se v rozmezí od března do dubna, dle Dvořákové (2006) je nejvhodnější termín mezi 15. – 25. dubnem. Půda by se neměla lepit a její teplota by měla být alespoň 5 °C. Na 1 m² by mělo být 6 až 12 jedinců, tj. 60 000 – 120 000 rostlin na 1 ha. Seje se do hloubky 20 až 30 mm, 12 kg.ha⁻¹.

5.3 Ošetření proti plevelům a škůdcům

Vzhledem k velmi dobré konkurenční schopnosti ostropestřce mariánského vůči plevelům by k ničení nežádoucích plevelů měla být používána mechanická kultivace, zpravidla ve fázi šesti pravých listů, respektive do doby zapojení porostu by se měla kultura udržovat čistá. Po zapojení porostu již není možné plečkování provádět, většinou ale je pak růst jednoletých plevelů zastíněním listy ostropestřce mariánského znemožněn.

5.4 Sklizeň

Sklizeň se provede upravenou sklízecí mlátičkou. Je považována za nejobtížnější článek agrotechniky. Limituje jak výnos, tak kvalitu drogy. Obsah účinných látek je totiž přímo úměrný stupni vyžrání semen a vzhledem k jejich postupnému dozrávání v různých patrech rostlin i v rámci úborů je odhad termínu sklizně obtížný a sklizeň pouze zcela biologicky zralých semen technicky neproveditelná.

Nicméně porost by měl mít 30 % přezrávajících úborů, rozeznatelných za suchého počasí podle otevření úborů a bílého chmýří. Většina zbývajících úborů by měla v té době zasychat.

5.5 Ekonomická kalkulace

Je všeobecně známo, že veškeré ekonomické kalkulace se v tržním hospodářství odvíjí od nabídky a poptávky. U ostropestřce mariánského je pak pro pěstitele stěžejní výkupní cena drogy a její hektarový výnos. Snahou pěstitelů je samozřejmě vyprodukovat maximum za co nejvyšší cenu s tím, že se neustále zvyšuje objem nákladů pohonných hmot, energie a různých výživných a ochranných prostředků.

V následující tabulce jsou zhodnoceny pracovní úkony spojené s pěstováním této plodiny. Ceny operací a osiva byly sestaveny dle Dvořákové (2006) s mírným navýšením, byly konzultovány s vedoucím práce Prof. Ing. Kuželem, CSc. a jsou uvedeny bez DPH.

Tab. 7 Náklady na jednotlivé operace při pěstování ostropestřce mariánského extenzivním způsobem

Pracovní operace	Náklady [Kč.ha ⁻¹]
Podmítka – talířový podmítač	550
Aplikace hnoje (20 t.ha ⁻¹ , 60 Kč.t ⁻¹ rozmetání, 200 Kč.t ⁻¹ nákup hnoje)	5 200
Hluboká orba	1 500
Smykování, vláčení	500
Setí (včetně ceny osiva 200 Kč.ha ⁻¹)	1 000
Plečkování (2 × rok)	1 000
Sklizeň drogy	1 950
Celkem	11 700

Z Tab. 2 vyplývá, že průměrný hektarový výnos ostropestřce mariánského se pohybuje kolem 0,70 t. V optimálních podmínkách lze dosáhnout výnosu i $1,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Při výkupních cenách $24 \text{ Kč}\cdot\text{kg}^{-1}$, tj. $24.000 \text{ Kč}\cdot\text{t}^{-1}$, což odpovídá výnosu $16.800 \text{ Kč}\cdot\text{ha}^{-1}$ drogy, dosáhneme po odečtení nákladů zisku $5.100 \text{ Kč}\cdot\text{ha}^{-1}$, z 5 ha pak 25.500 Kč.

Proto je potřeba maximálním způsobem využívat státních dotací a dotací EU.

6. Diskuze

Dosažené výsledky ukázaly, že množství silymarinu získaného po 96 hodinách z destilované vody při různých teplotách uložení je nejvyšší při teplotě 50 °C, a to přes 5,809 mg.g⁻¹, nezanedbatelné je rovněž množství získaného silymarinu při teplotě 60 °C (4,529 mg.g⁻¹), teploty 20 °C a 30 °C zdaleka nedosahují takového efektu. V celkovém množství silymarinu se pak nejvíce projevíly silychristin a silybin (Grafy 1, 2).

Množství silymarinu získaného z destilované vody při laboratorní teplotě 20 °C po různé dlouhou dobu uložení bylo nejvyšší po 96 hodinách (přes 0,6 mg.g⁻¹), přičemž se největší měrou uplatnil výskyt iso-silybinu. Po 4, 8 a 24 hodinách uložení nedosáhly hodnoty množství získaného silymarinu ani na 0,5 mg.g⁻¹ (Grafy 3, 4).

Dále byl zjišťován obsah silymarinu z různých koncentrací etanolu při teplotě 20°C a době uložení 96 hodin. Největší množství silymarinu bylo získáno 60% etanolem (přes 32 mg.g⁻¹), zhruba dvoutřetinové množství se pak vylouhovalo ze 40% a 80% etanolu (více jak 21,5 mg.g⁻¹ a 18 mg.g⁻¹). Kolem 10,5 mg.g⁻¹ bylo zjištěno množství silymarinu z 96% etanolu, nejméně silymarinu bylo získáno z 20% etanolu (necelých 5 mg.g⁻¹) a z destilované vody, kde toto množství dosáhlo hodnoty přibližně 0,8 mg.g⁻¹. V celkovém množství silymarinu se při této přípravě nejvíce uplatnily silybin a silychristin (Grafy 5, 6).

Množství silymarinu získaného z odtučněného a neodtučněného šrotu při teplotě 20°C a uložení po dobu 96 hodin dosáhlo u odtučněného šrotu nižších hodnot (0,627 mg.g⁻¹ a 0,764 mg.g⁻¹) než u neodtučněného šrotu (0,950 mg.g⁻¹ a 1,722 mg.g⁻¹) (Grafy 7, 8).

Na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byl prokázán významný vliv elicitoru kyseliny acetylsalicylové na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského, a to při aplikaci ASA ve vysoké koncentraci [10⁻³ mol.l⁻¹] (Studentův test na hladině významnosti α = 0,05, p-value = 0,013). U nízké koncentrace ASA [10⁻⁵ mol.l⁻¹] vzrostl silymarinový obsah o 9,12 % a u střední koncentrace [10⁻⁴ mol.l⁻¹] o 4,21 % (Tab. 5), s tímto nárůstem bylo zaznamenáno i úměrné zvýšení jednotlivých komponentů (Grafy 10, 13), ovšem statisticky neprůkazné.

Na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic nebyl ani v jednom případě prokázán účinek ASA na zvýšení obsahu silymarinové složky. Při aplikaci ASA ve střední a vysoké koncentraci došlo dokonce ke snížení obsahu účinných látek (Grafy 12, 13, Tab. 6). Statisticky

ale tyto rozdíly nejsou prokazatelné. Příčinou může být celá řada faktorů od průběhu počasí (rok 2007 byl extrémně suchým rokem, rostliny nevyrostly ani do výšky dvou metrů a navíc se jednalo o mírný jižní svah), přes působení nejrůznějších činitelů, jako jsou zásobenost živinami, vláhou, zejména v kritické fázi růstu, až po kultivaci rostliny a nerovnoměrné dozrávání semen.

Stejným problémem se zabývala i Dvořáková (2006), která ve své práci dosáhla nejvyššího obsahu účinných látek při aplikaci ASA ve střední koncentraci. V případě aplikace vysoké koncentrace elicitoru ASA došlo oproti kontrole k nežádoucímu přibližně 43 % poklesu obsahu účinných látek. Dvořáková na základě toho vyvodila závěr, že aplikace elicitoru ASA o vysoké koncentraci na rostlinu ostropestřec mariánský je zcela nevhodná, neboť podstatně redukuje obsah účinných látek v semenech, a na základě toho zmínila hypotézu, že vysoká koncentrace ASA je zřejmě již pro ostropestřec toxická. Tato hypotéza v tomto experimentu nebyla prokázána, ale vzhledem k malému objemu dat by bylo vhodné v tomto směru s pokusy pokračovat.

Průměrný výtěžek silymarinu dosáhl v maloparcelkových pokusech u Dvořákové v letech 2004 a 2005 zhruba 47 mg.g^{-1} a 31 mg.g^{-1} , což odpovídá i výsledkům této práce, kde byl průměrný silymarinový obsah z pozemků Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích 37 mg.g^{-1} a z pozemků u Svárova 45 mg.g^{-1} .

7. Závěr

Cílem této práce bylo podle předložených metodik porovnat metody přípravy extraktů ze semene ostropestřce mariánského se zaměřením na získání co nejvyššího obsahu účinných látek a provést optimalizaci extrakce vybraných účinných látek ze semene rostliny. Dále zhodnotit vliv elicitorů na obsah vybraných účinných látek v semeni rostliny, použita byla kyselina acetylsalicylová (ASA) ve třech různých koncentracích, a to $[10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}]$ označena jako nízká, $[10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}]$ jako střední a $[10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}]$ jako vysoká koncentrace.

Za tímto účelem byly v roce 2007 uskutečněny dva maloparcelkové pokusy, konkrétně na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a pozemcích u Svárova v blízkosti Velkých Opatovic, které nám poskytlo Zemědělské družstvo ve Velkých Opatovicích ve spolupráci s Ing. Martinem Pilařem, AGRA GROUP, a.s., Střelské Hoštice.

K vyhodnocení jednotlivých vzorků byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Z hlediska přípravy extraktů pro získání maximálního množství silymarinu ze semen ostropestřce mariánského se nejlépe projevilo použití 60% etanolu při teplotě uložení 20 °C po dobu 96 hodin. Celkově lze říci, že použití etanolu vykazuje mnohem lepší účinky pro získání komplexu účinných látek z této rostliny než použití vody.

Při sledování výsledků vlivu elicítace na zvýšení obsahu účinných látek v semeni ostropestřce mariánského pěstovaného v maloparcelkovém pokusu na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byl prokázán statisticky významný rozdíl při použití ASA ve vysoké koncentraci. Rozbor extraktů připravených ze semena získaných z rostlin vypěstovaných na pozemcích na Moravě ovšem neukázal žádný podstatný vliv kyseliny acetylsalicylové jako elicitoru.

Částí této práce bylo navržení technologie pěstování ostropestřce mariánského na ploše 1 – 5 hektaru. Vzhledem k tomu, že tato rostlina má velmi dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům a v současné době je státem upřednostňováno ekologické zemědělství, zpracovala jsem návrh technologie a ekonomickou kalkulaci pro extenzivní pěstování ostropestřce mariánského.

Ačkoliv se v poslední době hovoří o ostropestřci mariánském jako o perspektivní plodině, bylo by podle výše uvedených kalkulací dosaženo zisku z jednoho hektaru pouze 5 100 Kč. Nicméně do těchto propočtů nebyly zahrnuty případné státní dotace a dotace Evropské unie a jiné, které by jistě hrály důležitou roli při rozhodování, zda se této plodině hospodářky věnovat.

8. Summary

The aim of this work was to compare methods of extracts preparation from seeds of *Silybum marianum*, with a specialising in obtaining the highest possible content of active substances and to analyze the extraction optimization of selected active substances of the seed plants. In addition, to assess the elicitor impact on the content of selected active substances in seed plants by using acetylsalicylic acid (ASA) in three different concentrations: 10^{-5} mol.l⁻¹ signed as a low, 10^{-4} mol.l⁻¹ signed as a medium and 10^{-3} mol.l⁻¹ signed as a high concentration.

For this purpose there were realized two ground-plot experiments in 2007. The silymarin complex was determined by High Performance Liquid Chromatography.

The preparation of the extract was practised in different ways – using ethyl alcohol extract and distilled water in combination with various temperatures of extracts storage. These methods were compared one another. As the best one has been turned out to be using 60% ethanol concentration for the duration of 96 hours in the storage temperature 20°C.

In the case of the application ASA concentration 10^{-3} mol.l⁻¹ there was proven an effective action only in one ground-plot experiment. The increase of effective components in seeds reached approximately 116,5 % ratio compared with control application of distilled water on the *Silybum marianum* leaves. The increase of active components in the second one ground-plot experiment was not statistically proven.

This thesis also includes an project and economic calculations for the *Silybum marianum* cultivation.

Key words: *Silybum marianum*, silymarin, High Performance Liquid Chromatography, flavonolignans

9. Použitá literatura

ADAMS, Michael, et al. Medicinal Herbs for the Treatment of Rheumatic disorders - A Survey of European Herbals from the 16th and 17th Century. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, no. 121, s. 343-359.

ANDREJEV, Sergej, BARINOV, Viktor. *Lékárna na dosah ruky*. [s.l.] : [s.n.], 1990. 190 s. ISBN 80-7022-059-7.

ARGAWAL, Rajesh, et al. Anticancer potential of silymarin: From bench to bed side. *Anticancer research*. 2006, vol. 26, no. 6B, s. 4457-4498.

BERAN, Miloš. *Vaše dotazy - Naše Odpovědi* [online]. 2007 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.vupp.cz/czvupp/aktualit/index.htm>>.

BLÁHA, Ladislav, et al. *Rostlina a stres*. [s.l.] : [s.n.], 2003. 156 s. ISBN 80-86555-32-1.

BUCHTOVÁ, Irena, DRAŠNAROVÁ, Zuzana. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny : Situační a výhledová zpráva* [online]. MZe ČR, [2003] [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <www.mze.cz/attachments/LAKR_04_03.PDF>.

Chromatografie [online]. 2009 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>.

COOK, N. C., SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1996, vol. 7, s. 66-76.

COUFAL, Pavel. *Separation methods* [online]. 2004 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>>.

COUFAL, Pavel. *Thin layer chromatography, TLC; Paper chromatography, PC* [online]. 2004 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>>.

DEEP, Gagan, ARGAWAL, Rajesh. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integrative Cancer Therapies*. 2007, vol. 6, no. 2, s. 130-145.

DICOSMO, Frank, MISAWA, Masanaru. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends. Biotechnol.* 1985, vol. 3, no. 12, s. 318 – 322.

DRAŠNAROVÁ, Zuzana. O léčivých, aromatických a kořeninových rostlinách v ČR. *Úroda : časopis pro rostlinnou produkci*. 2005, roč. 53, č. 3, s. 54-55.

DRBAL, Karel, KRÍŽEK, Martin. *Analytická chemie*. [s.l.] : [s.n.], 1999. 185 s.

DVOŘÁKOVÁ, Jana. *Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině*. [s.l.], 2006. 72 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra obecné produkce rostlinné. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel CSc.

FRASCHINI, F., DEMARTINI, G., ESPOSTI, E. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*. 2002, vol. 22, no. 1, s. 51-65.

GODOY-HERNÁNDEZ, Gregorio, LOYOLA-VARGAS, Víctor M. Effect of acetylsalicylic acid on secondary metabolism of *Catharanthus roseus* tumor suspension cultures. *Plant Cell reports*. 1997, vol. 16, no. 5, s. 287-290.

GREENLEE, Heather, et al. Clinical applications of *Silybum marianum* in oncology. *Integrative Cancer Therapies*. 2007, vol. 6, no. 2, s. 158-165.

HALBERSTEIN, Robert A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann Epidemiol*. 2005, vol. 15, no. 9, s. 686-699.

High performance liquid chromatography [online]. 2009 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography>.

HOGAN, Fawn S., et al. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *Journal of Surgical Research*. 2007, vol. 143, no. 1, s. 58-65.

HOH, Carmen S. L., et al. Quantification of silibinin, a putative cancer chemopreventive agent derived from milk thistle (*Silybum marianum*), in human plasma by high-performance liquid chromatography and identification of possible metabolites.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, no. 7, s. 2532-2535.

HUSÁKOVÁ, Jana, LHOTSKÁ, Marie. Ostropestřec mariánský - okrasná a léčivá rostlina. *Živa: časopis pro biologickou práci*. 1981, roč. 28, č. 4. ISSN 0044-4812. s. 133.

INDRÁK, P., CHYTILOVÁ, D. K problematice stanovení silybinu v droze ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.). *Zahradnictví*. 1992, roč. 19, č. 4, s. 309-313.

JANČA, Jiří, ZENTRICH, Josef A. *Herbář léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha : Emitent, 1995. ISBN 80-85876-14-0. s. 216-219.

JAROŠ, Zdeněk. *Léčivé látky z rostlin*. Redaktor Jiří Jabulka; ilustrace ak. mal. Pavel Lysý. 1. vyd. [s.l.] : Dona, 1992. 79 s. ISBN 80-85463-04-0.

JEGOROV, Alexandr. Favanolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem. *Chemické listy*. 1996, č. 90, s. 859-862.

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody* [online]. 2005 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <<http://klouda.webpark.cz/mam.htm>>.

KOPŘIVA, Zbyněk. *Leuzea saflorová (Leuzea carthamoides) jako alternativní rostlina*. [s.l.], 2002. 67 s. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel CSc.

KŘEN, Vladimír, WALTEROVÁ, Daniela. Silybin and Silymarin - New Effects and Applications. *Biomed. Papers*. 2005, vol. 149, no. 1, s. 29-41.

KUBÍNEK, J. *Ostropestřec mariánský – metodika pěstování*. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR : [s.n.], 1987. 21 s.

KVASNIČKA, František, et al. Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*. 2003, vol. 990, no. 1-2, s. 239-245.

MOUDRÝ, Jan. *Ostropestřec mariánský (Silybum marianum)* [online]. 200- [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Ostropestrec_mariansky.htm>. >.

NAM-CHEOL, Kim, et al. Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org. Biomol. Chem.*. 2003, vol. 1, no. 10, s. 1684-1689.

OMER, Elsayed A. Effect of different nitrogen sources on Romanian *Silybum marianum* cultivated in sandy and clay soils. *Egyptian Journal of Horticulture*. 1996, vol. 23, no. 1, s. 63-76.

OMER, Elsayed A., et al. Effect of spacing and fertilization on the yield and active constituents of milk thistle, *Silybum marianum*. *Journal of herbs, Spices and Medicinal Plants*. 1993, vol. 1, no. 4, s. 17-23.

OMER, Elsayed A., et al. Effect of spacing, nitrogen and potassium of *Silybum marianum* L. cultivated in new reclaimed lands of Egypt. *Egyptian Journal of Horticulture*. 1995, vol. 22, no. 1, s. 97-108.

OMER, Elsayed A., et al. Seed yield of *Silybum marianum* L. as affected by row spacing and fertilization in new reclaimed lands of Egypt. *Egyptian Journal of Horticulture*. 1998, vol. 25, no. 3, s. 281-293.

OPLETAL, Lubomír, VOLÁK, Jan. *Rostliny pro zdraví. Ilustrace Jindřich Krejča*. 1. vyd. [s.l.] : [s.n.], 1999. 176 s. ISBN 80-7151-074-2.

PITERKOVÁ, Jana. *Úloha enzymů v oxidativním stresu rostlin*. [s.l.], [200-]. 63 s. Univerzita Palckého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Lenka Luhová, PhD.

POST-WHITE, Janice, LADAS, Elena J., KELLY, Kara M. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integrative Cancer Therapies*. 2007, vol. 6, no. 2, s. 104-109.

PŘIBÍK, Oldřich. *Zájem o léčivé rostliny trvá* [online]. 2008 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <http://www.agroweb.cz/roslinna-vyroba/Zajem-o-lecive-rostliny-trva__s44x30251.html>.

PŘÍHODA, Antonín. *Léčivé rostliny*. 2. dopl. vyd. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1980. 296 s. ISBN 07-033-80-04/38.

QUAGLIA, Maria Giovanna, et al. Determination of silymarin in the extract from the dried *silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999, vol. 19, s. 435-442.

RASKIN, Ilya, et al. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology*. 2002, vol. 20, no. 12, s. 522-539.

RYANT, Pavel. *Výživa a hnojení alternativních olejnin pro nepotravinářské účely* [online]. 2005 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <old.mendelu.cz/~agro/af/mendelnet2003/obsahy/fyto/ryant_cz.pdf>.

SCHUNKE, Ulrich. Holy thistle. First experiences with cultivation and harvest. *Landtechnik*. 1992, vol. 47, no. 11, s. 548-550.

SCHUPPAN, Detlef, et al. Herbal products for Liver diseases: A Therapeutic Challenge for the New Millennium. *Hepatology*. 1999, vol. 30, no. 4, s. 1099-1104.

SINGH, Rana P., ARGAWAL, Rajesh. Prostate cancer prevention by silibinin.. *Curent Cancer Drug Targets*. 2004, vol. 4, no. 1, s. 1-11.

Situační a výhledová zpráva : Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny. Ministerstvo zemědělství. 2008. Dostupný z WWW: <<http://www.mze.cz/Index.aspx?ch=73&typ=2&ids=536&val=536>>.

SLANINA, Jiří. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chemické listy*. 2000, č. 94, s. 111-116.

SOBOTNÍKOVÁ, Jana. *Chromatografie* [online]. 2007, 2007 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <www.natur.cuni.cz/~suchan/PC_TLC.pdf>.

SPITZOVÁ, Irena. Kultivar Silyb, nová surovina farmaceutického průmyslu. *Živa : časopis pro biologickou práci*. ACADEMIA. 1991, roč. 39, č. 3, s. 116-117.

SPITZOVÁ, Irena. Ostropestřec mariánský a jeho význam pro farmaceutický průmysl. *Živa : časopis pro biologickou práci*. ACADEMIA. 1981, roč. 28, č. 4. ISSN 0044-4812. s. 133.

SPITZOVÁ, Irena. Ostropestřec mariánský - staronová léčivá rostlina. *Úroda : časopis pro rostlinnou produkci*. 1997, roč. 45, č. 8. ISSN 0139/6013. s. 28-29.

STARÝ, František. Léčivé bodláky : Ze světa léčivých rostlin 5. *Živa : časopis pro biologickou práci*. 2000, č. 5, s. 208-210.

SUBRAMANIAM, Senthil, et al. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield : An alternative to petroleum ather defatting. *Biosource Technology*. 2008, vol. 99, no. 7, s. 2501-2506.

ŠRÁMEK, Jan. *Léčivé rostliny, jejich hnojení a ošetření elicitory s cílem maximální produkce některých účinných látek*. [s.l.], 1997. 87 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra agroekologie, Sekce agrochemie a pedologie . Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

TOKLU, Hale Z., et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. *Burns*. 2007, vol. 33, no. 7, s. 908-916.

VÁŇA, Pavel. *Rady bylináře Pavla*. Praha : [s.n.], 1990. 128 s. ISBN 80-900298-0-9.

VÁVROVÁ, Jaroslava. *Zónová elektroforéza* [online]. 2008 [cit. 2009-02-28]. Dostupný z WWW: <ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAZH.htm>.

VELIKINAC, Ivan, et al. Comparison of capillary zone lectrophoresis and high liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in grug formulations. *IL FARMACO*. 2004, vol. 59, no. 5, s. 419-424.

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1	Chemická stavba některých účinných látek	str. 18
Obrázek 2	Kyselina acetylsalicylová	str. 24
Obrázek 3	Záznam chromatogramu	str. 26
Obrázek 4	Rozdělení jednotlivých složek	str. 27
Obrázek 5	Schématický náčrt kapalínového chromatografu	str. 27
Obrázek 6	Kinetika separace	str. 29
Obrázek 8	Měření hodnot retardačním faktorem	str. 30
Obrázek 9	Zařízení pro elektroforézu	str. 30
Obrázek 10	Schéma aplikovaných postřiků na parcelkách v areálu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007	str. 33
Obrázek 11	Schéma aplikovaných postřiků na parcelkách u Svárova	str. 34
Tabulka 1	Vývoj ploch produkce léčivých rostlin v ČR	str. 13
Tabulka 2	Vývoj ploch produkce kořeninových a aromatických rostlin v ČR	str. 13
Tabulka 3	Vývoj ploch produkce ostropestřce mariánského v ČR	str. 14
Tabulka 4	Množství účinných látek ostropestřce mariánského pro stanovení neúčinnější metody extrakce	str. 38
Tabulka 5	Změna obsahu účinných látek po aplikaci ASA na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích	str. 44
Tabulka 6	Změna obsahu účinných látek po aplikaci ASA na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic	str. 46
Tabulka 7	Náklady na jednotlivé operace při pěstování ostropestřce mariánského extenzivním způsobem	str. 48
Graf 1	Množství jednotlivých složek silymarinu získaného po 96 hodinách z destilované vody při různých teplotách uložení	str. 39
Graf 2	Množství silymarinu získaného po 96 hodinách z destilované vody při různých teplotách uložení	str. 39
Graf 3	Množství jednotlivých složek silymarinu při laboratorní teplotě 20 °C po různé dlouhou dobu uložení	str. 40
Graf 4	Množství silymarinu získaného z destilované vody při laboratorní teplotě 20 °C po různé dlouhou dobu uložení	str. 40
Graf 5	Množství jednotlivých složek silymarinu při různých koncentracích etanolu při teplotě 20°C a době uložení 96 hodin	str. 41
Graf 6	Množství silymarinu získaného z různých koncentrací etanolu při teplotě 20°C a době uložení 96 hodin	str. 41
Graf 7	Jednotlivé složky silymarinu v odtučněném a neodtučněném šrotu	str. 42
Graf 8	Množství silymarinu získaného z odtučněného a neodtučněného šrotu použitím destilované vody při teplotě 20°C a uložení po dobu 96 hodin	str. 42
Graf 9	Množství jednotlivých složek silymarinu stanoveného metodou HPLC při různých způsobech přípravy extraktů	str. 43
Graf 10	Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicitace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007	str. 44

- Graf 11** Obsah silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace ze semen ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2007 str. 45
- Graf 12** Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic v roce 2007 str. 45
- Graf 13** Obsah jednotlivých složek silymarinu v závislosti na koncentraci ASA elicítace v semenech ostropestřce mariánského získaných z maloparcelkového pokusu uskutečněného na pozemcích u Svárova u Velkých Opatovic v roce 2007 str. 46

Seznam příloh

- Příloha 1** Ostropestřec mariánský, pozemek Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
- Příloha 2** Porost při aplikaci 1. postřiku ASA na zkušební pozemku u Svárova u Velkých Opatovic
- Příloha 3** Ostropestřec mariánský – květ
- Příloha 4** Aplikace 2. postřiku – zkušební pozemky u Svárova u Velkých Opatovic
- Příloha 5** Hodnocení HPLC – chromatogram
- Příloha 6** Chromatogram - HPLC

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	2
2.1 Léčivé rostliny v historii	2
2.2 Ostropestřec mariánský	5
2.2.1 Původ	5
2.2.2 Botanická charakteristika	7
2.2.3 Technologie pěstování	8
2.2.3.1 Půdní a klimatické podmínky	8
2.2.3.2 Výsev	9
2.2.3.3 Výživa a hnojení	10
2.2.3.4 Plevel, choroby a škůdci	11
2.2.3.4 Sklizeň	12
2.2.4 Pěstování v ČR	12
2.3.1 Lignany	16
2.3.2 Flavanolignany a jiné účinné látky	17
2.3.3 Kultivar Silyb	19
2.4 Farmakologické účinky	20
2.5 Vliv elicitorů na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského	22
2.5.1 Stres rostliny a stresory	22
2.5.2 Elicitory	23
2.5.3 Elicitace kyselinou acetylsalicylovou ASA.....	23
2.6 Stanovení obsahu účinných látek	25
2.6.1 Chromatografie	25
2.6.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC	26
2.6.1.2 Chromatografie na tenké vrstvě TLC	28
2.6.2 Elektroforéza	30
2.6.2.1 Kapilární zónová elektroforéza CZE	31
2.6.3 Srovnání metod pro stanovení účinných látek v ostropestřci mariánském	31
3. Vlastní pokus	33
3.2 Metodika pro porovnání přípravy extraktů s cílem maximálního výtěžku účinných látek	34
3.2.1 Metodika přípravy extraktů pro maximální výtěžnost účinných látek	34
3.2.2 Metodika pro vyhodnocení vlivu elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského	36
3.3 Stanovení účinných látek	36
3.3.1 Porovnání metod pro přípravu extraktů s cílem maximální výtěžnosti účinných látek	36
3.3.2 Vliv elicitoru ASA na obsah účinných látek v semeni ostropestřce mariánského	37
4. Výsledky	38
5. Návrh technologie pěstování ostropestřce mariánského	47
5.2 Předset'ová příprava a výsev	47
5.3 Ošetření proti plevelům a škůdcům	47
5.4 Sklizeň	48
5.5 Ekonomická kalkulace	48
6. Diskuze	50
7. Závěr	52
8. Summary	53
9. Použitá literatura	54

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obsah

Přílohy

Příloha 1



Ostropěstřec mariánský, pozemek jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Příloha 2



Porost při aplikaci 1. postřiku ASA na zkušebním pozemku u Svárova u Velkých Opatovic

Příloha 3



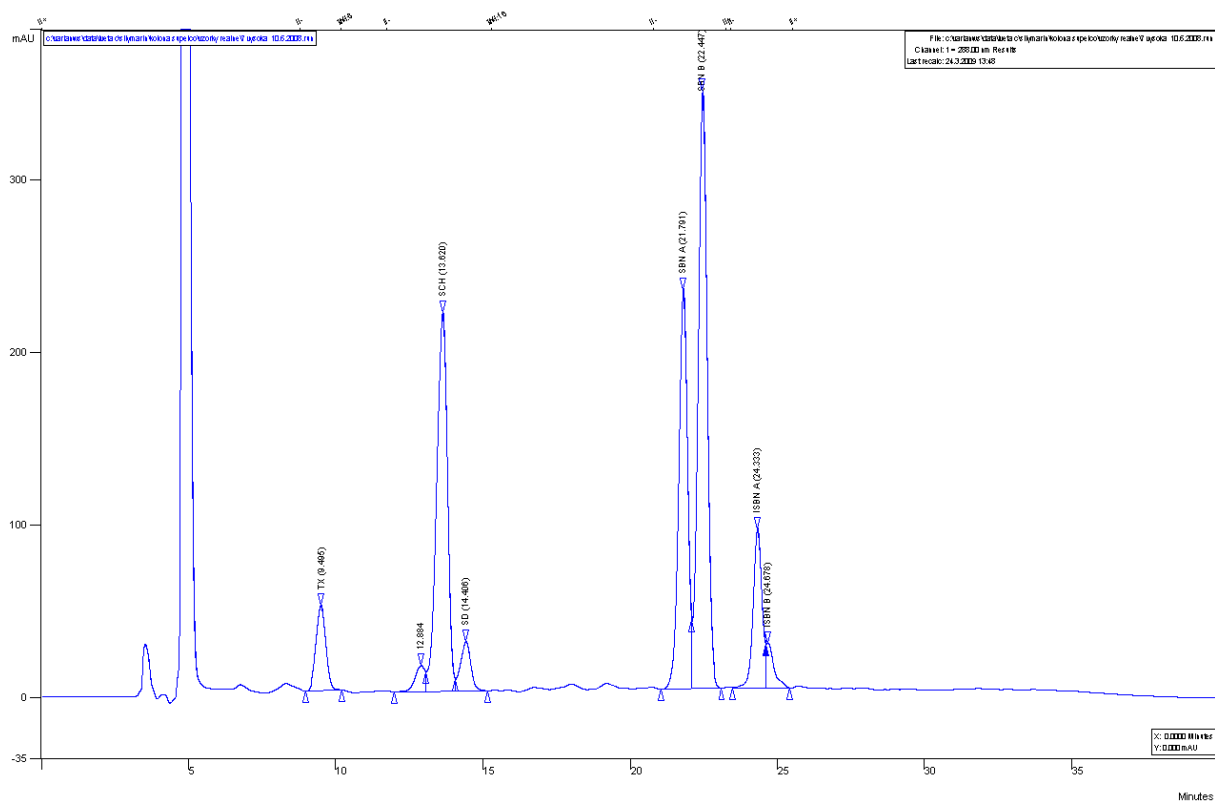
Ostropestřec mariánský – květ

Příloha 4



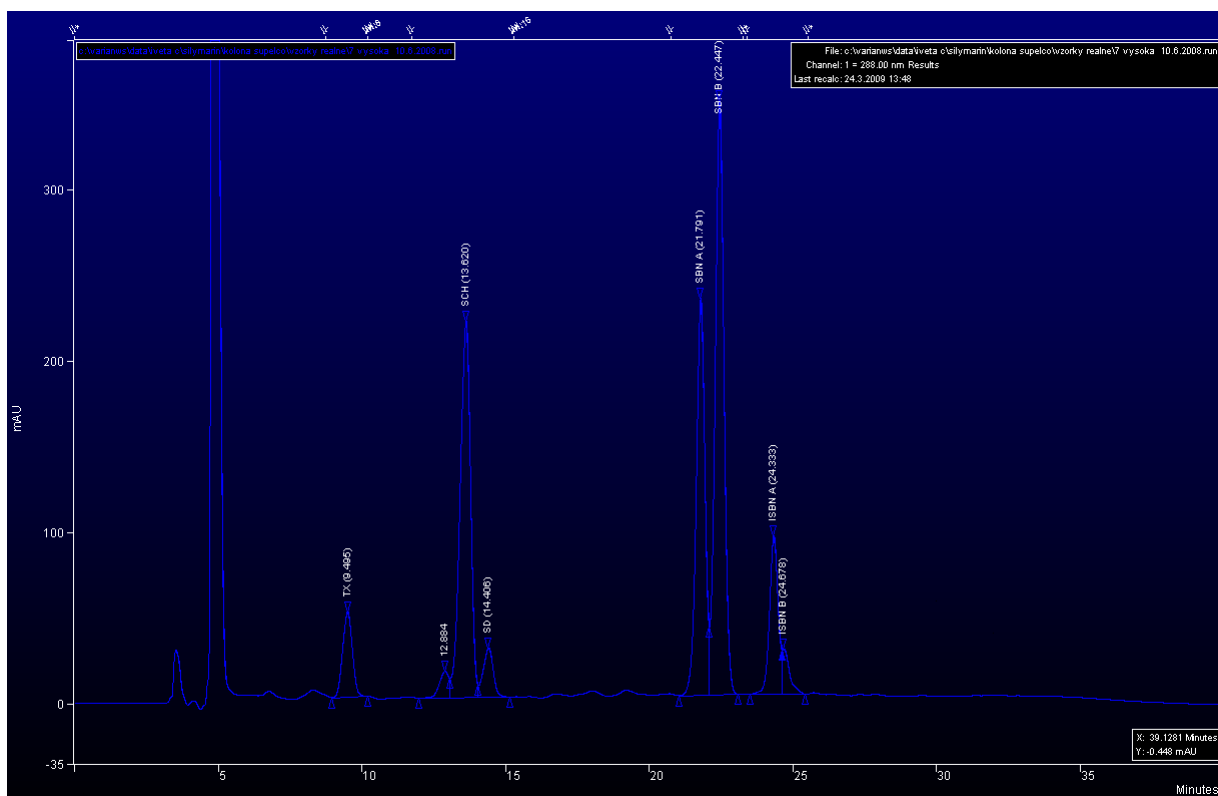
Aplikace 2. postřiku – zkušební pozemky u Svárova u Velkých Opatovic

Příloha 5



Hodnocení HPLC – chromatogram

Příloha 6



Chromatogram - HPLC