

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**KATEDRA APLIKOVANÝCH A ROSTLINNÝCH
BIOTECHNOLOGIÍ**

Studijní program: B4131 / Zemědělství

Studijní obor: 4106R013 / Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině

**Agrotechnika pěstování a obsah některých biologicky
aktivních látek v rostlinách *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:
Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Autor:
Petr Koblíček

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr KOBLIC**
Osobní číslo: **Z09291**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Trvale udržitelné systémy hospodaření v krajině**
Název tématu: **Agrotechnika pěstování a obsah některých biologicky aktivních látek v rostlinách *Silybum marianum* (L.) Gaertn.**
Zadávající katedra: **Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Rostlina *Silybum marianum* obsahuje značné množství účinných látek ze skupiny flavonolignanů, tzv. silymarinový komplex, který vykazuje hepatoprotektivní vliv na jaterní buňky. Směs silybinu, silydioninu a silychristinu se nazývá silymarin a pod tímto označením je známa jako hlavní obsahová část velké řady komerčně vyráběných přípravků. Silymarin chrání játra zejména antioxidantním účinkem před škodlivými vlivy jako jsou např. chemické přídavky potravin, léky, alkohol, toxické látky z hub, virové infekce, při aplikaci steroidních hormonů a dalších látek, které mohou negativně zatížit organismus. Jsou prokázány pozitivní účinky při léčbě některých druhů rakoviny. Cílem práce je studium vlivu agrotechniky na obsah biologicky aktivních látek v rostlinách.

Vypracujte literární rešerši:

- a) botanická charakteristika, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a proti chorobám
- b) chemické složení a účinné látky
- c) farmakologické účinky účinných látek
- d) vliv elicitorů na zvýšení obsahu účinných látek
- e) metody stanovení některých účinných látek v rostlinách ostropestřece mariánského

Vyhodnoťte poskytnuté výsledky maloparcelkového pokusu.

Vypracujte bakalářskou práci dle Opatření děkana č. 13 ze dne 18. 12. 2009.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci „Agrotechnika pěstování a obsah některých biologicky aktivních látek v rostlinách *Silybum marianum* (L.) Gaertn.“ vypracoval samostatně, pod vedením Prof. Ing. Stanislava Kužela, CSc., a veškeré literární a odborné zdroje uvedl v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích, 12. 4. 2012



Tímto děkuji svému vedoucímu diplomové práce panu Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc., za metodické vedení a pomoc při zpracování této práce.

ABSTRAKT

Rostlina ostropestřec mariánský je známá již několik tisíc let. Jeho blahodárné účinky pro lidský organismus lidé pozorovali již v antické době. Cílem mé práce bylo studium vlivu agrotechniky na obsah biologicky aktivních látek v této rostlině. Z dostupných zdrojů od různých autorů jsem se zabýval agrotechnickými postupy a klimatickými podmínkami, které do značné míry ovlivňují obsah silymarinového komplexu v nažkách sledované rostliny. Dále jsem se ve své bakalářské práci pokusil objasnit některé z metod pro stanovení účinných látek v ostropestřci mariánském. Na obsah účinných látek mají vliv i elicitory. Některé z nich jsou popisovány v další části mé práce. Na závěr jsem provedl vyhodnocení maloparcelového pokusu a ekonomické zhodnocení navrhované technologie pěstování rostliny.

ABSTRACT

The milk thistle plant has been known for several thousand years. People observed its beneficial effects for human body as early as in the ancient times. The aim of my work was to study the influence of agricultural technologies to the content of biologically active substances in this plant. I dealt with agrotechnical procedures and climatic conditions which largely influence the content of silymarin complex in achenes of the monitored plant. I gained information in available resources from various authors. Furthermore, in my undergraduate thesis I attempted to clarify some of the methods for the determination of active substances in milk thistle. These active substances are influenced by elicitors. Some of them are described in the next part of my work. In conclusion I evaluated the small plot attempt and the economic evaluation of the proposed technology of growing the plants.

2.5.	VLIV ELICITORŮ NA ZVÝŠENÍ OBSAHU ÚČINNÝCH LÁTEK..	51
2.5.1.	ELICITORY	51
2.5.2.	ELICITACE	51
2.5.3.	ELICITACE KYSELINOU ACETYLSALICYLOVOU (ASA).....	52
2.5.4.	ELICITACE METHYLVIOLOGENEM (PARAQUAT).....	55
2.6.	FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY ÚČINNÝCH LÁTEK.....	59
2.6.1.	VYUŽÍVÁNÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO V MEDICÍNĚ	59
2.7.	NÁVRH TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTRČE	
	MARIÁNSKÉHO.....	60
2.7.1.	VYHODNOCENÍ MALOPARCELOVÝCH POKUSŮ.....	60
2.7.1.1.	VLIV ELICITORŮ NA OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK	61
2.7.1.2.	TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO	63
2.7.1.3.	EKONOMICKÉ ZHODNOCENÍ NAVRHOVANÉ TECHNOLOGIE.....	65
3.	ZÁVĚR.....	68
4.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ	69
5.	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT.....	74
6.	PŘÍLOHY	76

1. ÚVOD

Rostliny a rostlinné produkty měli a mají pro život lidí vždy patřičný význam. Mnohé rostliny po jejich objevení upadly v zapomnění, aby byly posléze znovu objeveny. Lidé hlavně z důvodu vlivu negativních účinků špatného stavu životního prostředí a nezdravého životního stylu moderní doby stále častěji vyhledávají léčivé rostliny a produkty z nich. Patrný zájem o léčivé rostliny ve světě je nejen u spotřebitelů, ale také u výrobců. Přispěly k tomu nové vědecké poznatky a využití léčivek v širokém spektru odvětví jako je například zemědělství, potravinářství, medicína a farmacie. Je známo asi 400 tisíc druhů rostlin. 20 tisíc rostlin má léčivé účinky. Ovšem pouze okolo 5-ti set z nich je prozkoumáno. V EU se užívá přibližně 2 tisíce druhů rostlin. V České republice se využívá okolo 3 sta druhů bylin.

Díky stresu a neustále zvyšujícím se nárokům lidí na sebe samé věnují jedinci, ale i celé skupiny obyvatel zvýšenou pozornost léčivým rostlinám a produktům z nich. Velmi příznivé je, že i zemědělská politika EU se vydala směrem k alternativnímu zemědělství a tím dává nové možnosti pro pěstování léčivých rostlin. Rostliny s léčivými účinky mohou pocházet z pěstování na velkých či malých plochách a nebo ze sběru ve volné přírodě. Velmi velký podíl na produkci mají velkoplošně pěstované druhy. Pro zemědělce je důležité dosáhnout současně nejen požadovanou kvalitu suroviny, ale také dostatečnou efektivitu výroby.

V současné době je markantní rychlý rozvoj pěstování rostliny ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.), po kterém neustále roste poptávka. Tato léčivka má významnou roli v českém i zahraničním farmaceutickém průmyslu. Využívají se hlavně její plody (*Fructus cardui mariae*), které obsahují látky ze skupiny flavonolignanů, označovaných jako silymarinový komplex. Účinky silymarinu byly známy už mnoho set let před naším letopočtem z dob antické medicíny. Využití silymarinu je hlavně k regeneraci a prevenci správné funkce jaterních tkání (má hepatoprotektivní vliv na jaterní buňky, kdy došlo k jejich poškození) a při mnoha dalších onemocněních - při žlučnickových potížích až po blahodárné účinky při léčbě některých druhů rakoviny nebo při zevní aplikaci na popálené tkáně. Každou buňku jater silymarin chrání od toxinů. Zároveň také podporuje samočištění jater od škodlivých látek (alkohol, drogy, léky, těžké kovy, rtuť, pesticidy, otravy houbami).

V dnešní době jsou to choroby velmi rozšířené a často těžko terapeuticky zvládnutelné. Proto je každý další preparát proti těmto nemocem moc důležitý a i z ekonomického hlediska pro firmy lukrativní. Silymarinový komplex je obsahem některých léčivých přípravků – německé léčivo Legalon, švýcarské léčivo Simepar nebo českého přípravku Flavobionu.

Při pěstování ostropestřce mariánského se klade důraz na kvantitu získané drogy, ale také na kvalitu semen - obsah silymarinového komplexu a jeho složení (poměr jednotlivých komponent). Kvalitou se rozumí obsah a složení účinných látek pro potřeby farmaceutického průmyslu. Obecným zájmem je cílené zvyšování obsahu účinných látek v semeni této rostliny. K tomuto byla vytvořena řada technologických postupů. S rozvojem poznání analytických metod a dnešními možnostmi využívání laboratorního přístrojového vybavení a techniky se v poslední době značně urychlil a zdokonalil výzkum metabolických pochodů v rostlinách a prohloubilo se tak v tomto směru celkové poznání. Do provozu jsou dnes v zemědělství zaváděny i zbrusu nové netradiční formy pěstebních opatření a postupů, které ovlivňují nejen růst a vývin rostlin, ale také jejich kvalitativní hodnoty.

Cíl práce

Cílem práce bylo studium vlivu agrotechniky na obsah biologicky účinných látek v rostlině ostropestřec mariánský, agrotechnika, hnojení, ochrana před škůdci a chorobami, chemické složení a účinné látky, farmakologické účinky účinných látek, vliv elicitorů na zvýšení obsahu účinných látek a metody stanovení některých účinných látek v rostlinách ostropestřce mariánského. Dalším úkolem pak bylo vyhodnotit poskytnuté výsledky maloparcelového pokusu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. VYSVĚTLENÍ ZÁKLADNÍCH POJMŮ

2.1.1. LIGNANY

Lignany tvoří jednu z bohatě zastoupených, biogeneticky příbuzných a tudíž i strukturně vymezených a charakteristických skupin fenylypropanoidů. Jejich struktura je podmíněna jejich vznikem z redukované formy základních, biogeneticky klíčových meziproductů šikimátové dráhy, t.j. z alkoholů pocházejících z kyseliny skořicové, *p*-kumarové a dalších biogenetických ekvivalentů. Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8' (viz struktury na Obr. 1). Propojením dalších vazeb C-C a C-O, za spoluúčasti propanových částí molekuly v různém oxidačním stupni, vznikají všechny možné strukturní typy a formy lignanů, přehledně znázorněné na Obr. 1. (HARMATHA, 2005)

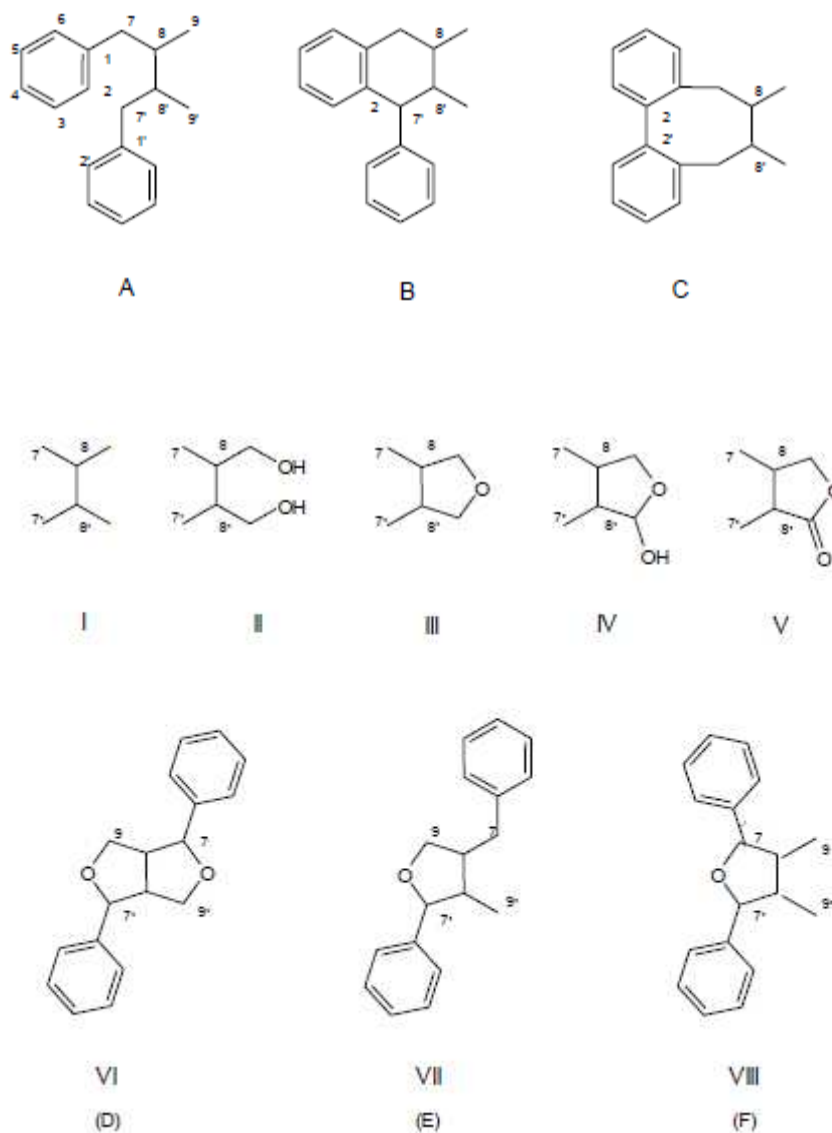
Obr. č. 1: Strukturní typy a formy lignanů.

Typy (A-C) odvozené od způsobu spojení fenylypropanových jednotek:

- dibenzylbutanový typ (A)
- aryltetralinový typ (B)
- dibenzocyklooktanový typ (C)

Formy (I-VIII) odvozené od stupně oxidace (I-V) a od struktury epoxidu (VI—VIII):

- butanová forma (I)
- butandiolová forma (II)
- 9,9'-epoxy forma (III)
- hemiacetalová forma (IV)
- butanolidová forma (V)
- bis-epoxy forma (VI)
- 7,9' / 7',9-epoxy forma (VII)
- 7,7'-epoxy forma (VIII)



Zdroj: Harmatha, 2005.

2.1.2. FLAVONOLIGNANY

Flavonolignany patří mezi nejběžnější rostlinné polyfenoly. V rostlinách jsou tyto látky produkovány jako sekundární metabolity, které mají za úkol např. chránit rostlinu před patogenními organismy nebo před ultrafialovým zářením.

2.1.3. ELICITORY

Elicitory jsou biologicky aktivní sloučeniny, schopné vyvolat u rostliny obrannou reakci. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny, tzv. exogenní elicitory, a sloučeniny, které se uvolňují narušováním

buněčné stěny obou organismů, tzv. endogenní elicitory. Mezi exogenní elicitory patří například některé polysacharidy a specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory jsou například oligomery chitinu nebo glykoproteidy, uvolněné hydrolýzou buněčné stěny patogenu, nebo oligogalaktouronany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky. Elicitory mohou být druhově specifické, ty jsou produkovány pouze určitým druhem patogenu, nebo druhově nespecifické, to jsou například fragmenty buněčných stěn. (MAREČKOVÁ, 2007)

2.2. LÉČIVÉ ROSTLINY

2.2.1. HISTORIE

Vlastnosti léčivých rostlin a bylin rozpoznali a začali používat už primáti. Bylo pozorováno množství lidoopů, které pravidelně konzumovaly určité botanické druhy obsahující chemické látky působící jako analgetika, imunostimulanty, látky s protizánětlivými účinky, proti průjmům, látky podporující zažívání nebo dokonce i plodnost (HALBERSTEIN, 2005).

Existuje rozsáhlý archeologický výzkum, který dokazuje, že léčivé rostliny využívali i naši předci v prehistorické době. V dávných kulturách starověku 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). Historické záznamy ukazují, že první léčitelé si byli dobře vědomi vzájemného propojení těla a mysli ovlivňující uzdravení a rekonvalescenci (HALBERSTEIN, 2005).

V Číně a Indii je možné 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). S dalším příchodem rozvoje přírodních věd se rozdíl mezi východem a západem začaly prohlubovat (SCHUPPAN, et al., 1999).

Staří Egypťané zhruba před 3 – 6 tisíci lety vytvořili přímo propracovaný elaborát, který obsahoval 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 a také se vykuřovaly místnosti. Jako léčebné prostředky se užívalo víno, ricínový olej, marihuana, opium, máta a pivo vyráběné z ječmene a pšenice. Egypťané byli zřejmě první, kteří 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 3 tisíci lety, Dioscorides dokonce napsal 24 knih pod názvem *De Materia Medica*. V nich velice podrobně popsal přes 6 set 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 využít na 132 léčivých bylin pro léčbu specifických chorob epilepsií počínaje, přes dnu až po krvácení z nosu nebo akné (HALBERSTEIN, 2005).

Extrakty ze *Silybum marianum* jsou užívány nejméně 2 tisíce let k léčbě jaterních onemocnění. Čaje připravené ze semen *Silybum marianum* byly užívány za Dioscurida a Plinyea během prvního století př. n. l. k léčbě žlučnickových problémů (TŮMOVÁ, GALLOVÁ, 2006).

Léčivé rostliny jsou tedy lidstvu známy od nejstarších dob. Naši předkové je zjevně užívali ke zbavení se různých nemocí a neduhů, které je sužovaly již od pradávna. Přípravou léčivých odvarů, mastí a mazání se zprvu zabývali kořenáři, mastičkáři a někde i kouzelníci a kněží. Ti 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 objev knihtisku, vynález Johanna Gutenberga. Řada děl byla překládána, 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).

V pozdější době, 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).

Významného 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 velmi přesnou identifikaci jednotlivých rostlinných druhů a jejich základní charakteristiku se seznamem latinských názvů všech druhů, které byly v té době známy. Do těchto knih dodnes nahlíží přední botanici i zahradníci (HALBERSTEIN, 2005).

Jinou silnou publikaci 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).

Biologická studia chemické rozborů a vysvětlily mnohé, co bylo dříve známo jen jako zkušenost, bez logického vysvětlení (PŘÍHODA, 1980).

Postupem času se z rostlin podařilo izolovat řadu léčebně účinných látek, ze kterých se začaly vyrábět nejrůznější léčebné prostředky v nejrůznějších lékových formách. Vědecký výzkum rostlinných účinných látek pokročil natolik, že některé z nich se vyrábějí uměle a plně nahrazují přírodní látky (ANDREJEV, BARINOV, 1990).

20. století v tomto směru slavilo triumf. Velký vzestup farmaceutického průmyslu měl ohromný vliv na léčbu nemocí a prevenci a tím se podařilo zachránit bezpočet lidských životů (RASKIN, et al., 2002).

Systematická botanika popisuje celosvětově 380 tisíc druhů rostlin, zařazených do 15 tisíc rodů. Léčivé účinky jsou popsány přibližně u 15 tisíc druhů (BRANŽOVSKÝ, 2007). Světová organizace pro zdraví (WHO) k roku 1995 zaznamenala na 20 tisíc léčivých rostlin a pouze 250 jich bylo k tomu samému datu

analyzováno k identifikaci účinných látek. Od té doby se uvádí, že nejméně 25 % aktivních látek v současně stanovených syntetických drogách pochází původně z rostlinných zdrojů (HALBERSTEIN, 2005).

Proto léčivé rostliny mají a stále budou mít nepostradatelné místo v léčebné praxi, jak při přímém použití ve formě léčivých čajů, tak i jako suroviny pro průmyslově vyráběné léky (ANDREJEV, BARINOV, 1990).

2.2.2. SITUACE VE SVĚTĚ A EU

Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny LAKR jsou ve světovém měřítku stále středem zájmu – a to především pro zpracování v různých oblastech jako jsou farmaceutický a potravinářský průmysl, ochrana rostlin a další. Pěstování léčivých rostlin celosvětově nabývá na významu – a to ani ne tak z objemového hlediska, ale především z pohledu rostoucích nároků na kvalitu produktu (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

Dle nejnovějších odhadů je jako léčivých světově využíváno přes 50 tisíc rostlinných druhů z celkového počtu 422 tisíc rostlinných druhů (studie Dopad pěstování a sběru LAKR na biodiverzitu Uwe Shippmanna a kol. konkretizuje toto číslo přesně na 52 885 léčivých rostlinných druhů LAKR). Na celém světě se pak obchoduje přibližně s 2 tisíci 5 sty druhy LAKR, přes 4 tisíce druhů patří mezi ohrožené. Nejvíce rostlinných druhů, používaných jako LAKR, pochází z asijského (Čína, Indie, Thajsko a Vietnam) a amerického centra (USA) (BRANŽOVSKÝ, 2010).

V EU se jako léčivých, aromatických a kořeninových rostlin používá asi 2 tisíce druhů, z toho ve Francii cca 900 druhů, v Německu 1,5 tisíce druhů, v Maďarsku 270 druhů, v České republice 300 druhů atd. Celosvětově obchod léčivými rostlinami dosáhl v roce 2009 dle statistické databáze komoditního trhu OSN - COMTRADE obrátu 3,172 mld. USD. Celosvětově bylo dovezeno 1,651 mld. USD a vyvezeno 1,520 mld. USD (BRANŽOVSKÝ, 2010)

2.2.3. SITUACE V ČR

Po výrazném nárůstu ploch pěstování LAKR v letech 2003 a 2004 dochází v posledních letech k opačné situaci – odklonu od pěstování léčivých i kořeninových

a aromatických rostlin. Hlavním důvodem tohoto kolísání je situace v jejich odbytu v tuzemském prostředí. Podle statistik Českého statistického úřadu poklesly sklizňové plochy LAKR v roce 2005 o 28,9% proti roku 2004 na celkových 8355 ha. Tento trend pokračoval i v roce 2006, kdy ČSÚ zaznamenal dalších 29,9% pokles jejich ploch na konečnou hodnotu 5858 ha (bez makoviny). Důvodem tak velkého rozdílu však může být od roku 2004 rovněž odlišný přístup pěstitelů ke statistickému vykazování ploch LAKR v souvislosti s evidencí půdy pro účely získání přímých plateb (BRANŽOVSKÝ, 2007).

Dle údajů Českého statistického úřadu se LAKR pěstovaly v roce 2009 na větších plochách ve srovnání s předcházejícími lety, kdy docházelo v ČR k poklesu pěstebních ploch (viz. Tab. č. 1). Pokles výnosu může být způsoben řadou faktorů, zejména tím, že pěstitelé nepoužívají certifikované osivo, jehož kvalita je garantována semenářskou organizací. Specifická je i odrůdová skladba. LAKR se v našich podmínkách nezkouší. Dalším faktorem, který ovlivňuje výnos, může být v případě LAKR zaplevelení. V rámci minoritních indikací Státní rostlinolékařské správy je registrováno jen omezené množství přípravků, které by zaplevelení řešily. Dalším omezujícím výnosotvorným prvkem je moderní pěstitelský postup, který není u většiny pěstovaných LAKR (s výjimkou kmínu) k dispozici. Samozřejmě je výnos ovlivněn klimatickými podmínkami v daném pěstitelském roce (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

O pěstování LAKR v ČR mají zájem také zahraniční firmy. Příkladem toho je rostoucí plocha ostropestřce mariánského (v roce 2010 až 4000 ha) (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

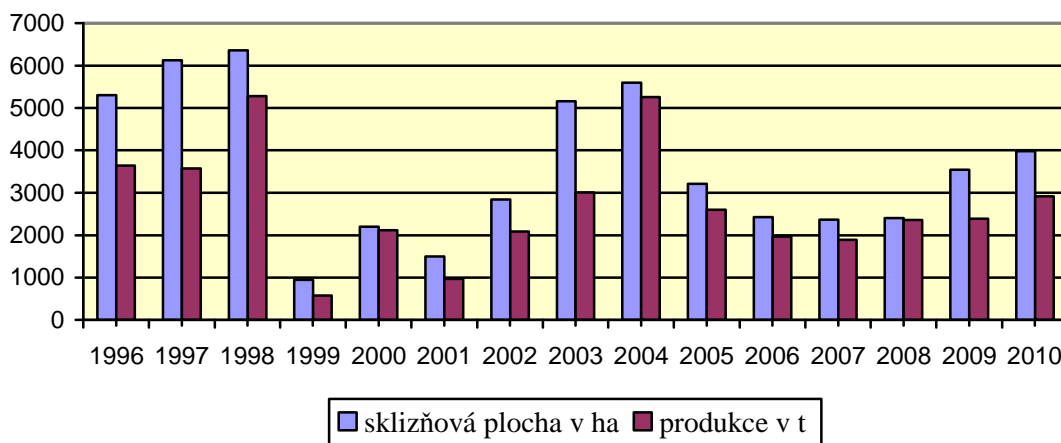
Plocha pěstování ostropestřce mariánského v posledních letech výrazně kolísá (500 – 3 000 ha). Je pěstován výhradně pro farmaceutické zpracování, čímž je dán i požadavek na vysokou kvalitu produktu. Rozsah pěstitelských ploch podléhá silnému vlivu nejistého zájmu odběratele (BRANŽOVSKÝ, 2007).

Tab. č. 1: Vývoj ploch a produkce rostlin skupiny LAKR v ČR.

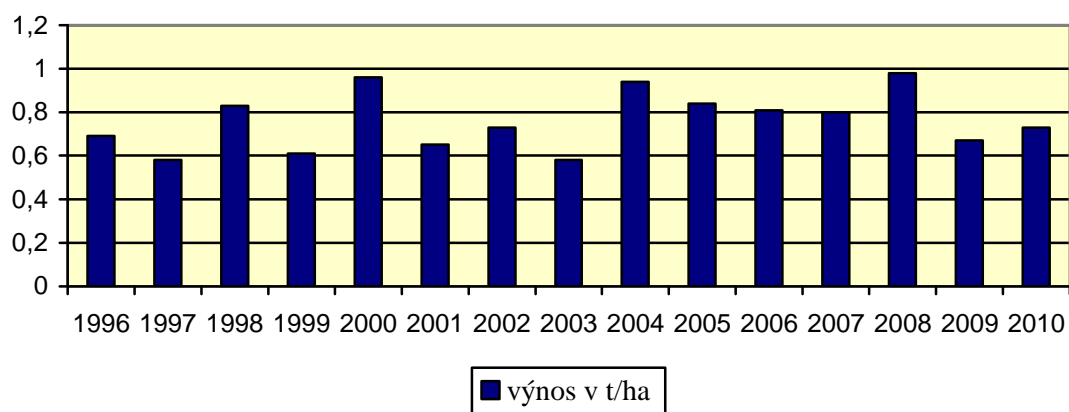
Rok	Léčivé rostliny			Kořeninové a aromatické rostliny		
	Sklizňová plocha v ha	Produkce v t	Výnos v t/ha	Sklizňová plocha celkem v ha	Produkce v t	Výnos v t/ha
1996	5306	3636	0,69	10483	7314	0,70
1997	6127	3570	0,58	7018	5663	0,81
1998	6362	5282	0,83	3315	2039	0,62
1999	950	578	0,61	2557	1565	0,61
2000	2201	2118	0,96	4818	2440	0,51
2001	1500	974	0,65	4871	3292	0,68
2002	2841	2086	0,73	5118	3709	0,72
2003	5162	3003	0,58	6259	4286	0,68
2004	5595	5257	0,94	6153	2546	0,40
2005	3211	2596	0,84	5144	3245	0,63
2006	2429	1963	0,81	3429	2764	0,81
2007	2369	1892	0,80	2815	2033	0,72
2008	2400	2356	0,98	1615	1491	0,92
2009	3539	2387	0,67	2135	1513	0,71
2010	3977	2915	0,73	3887	2690	0,69

Zdroj: Buchtová, Drašnarová, 2003; Dvořáková, 2006; Gramanová, 2009; Branžovský, et al., 2010.

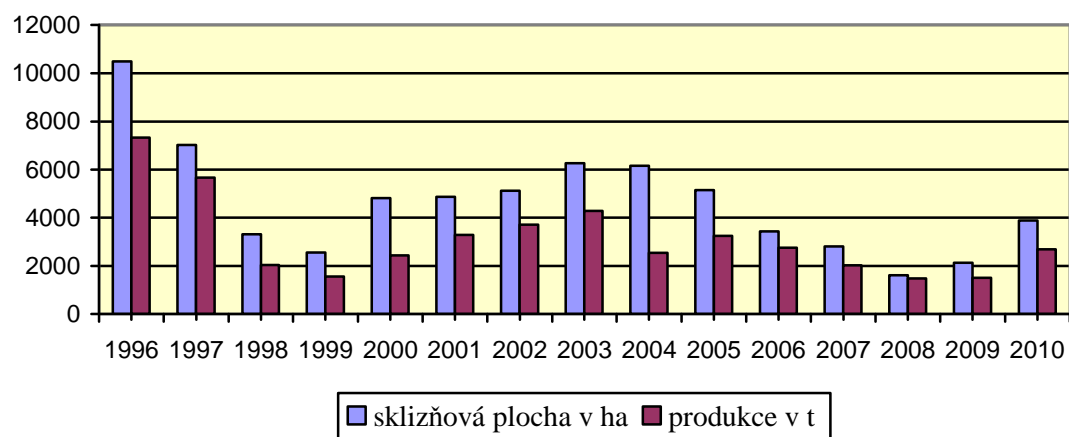
Obr. č. 2: Vývoj sklizňových ploch a produkce léčivých rostlin v ČR.



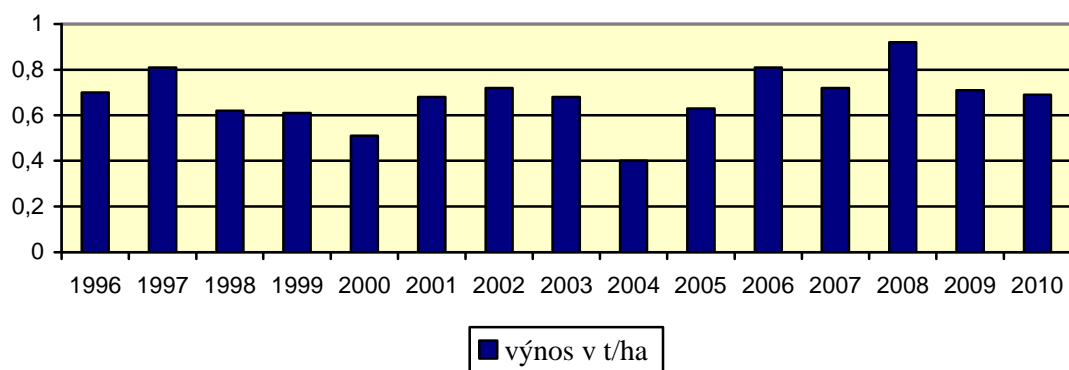
Obr. č. 3: Výnos léčivých rostlin v ČR.



Obr. č. 4: Vývoj sklizňových ploch a produkce kořeninových a aromatických rostlin v ČR.



Obr. č. 5: Výnos kořeninových a aromatických rostlin v ČR.

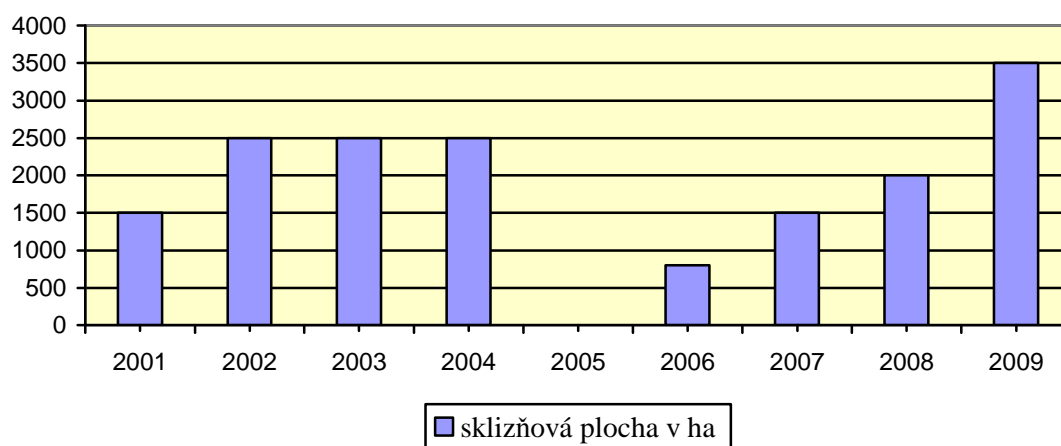


Tab. č. 2: Přehled o pěstování ostropestřce mariánského v ČR.

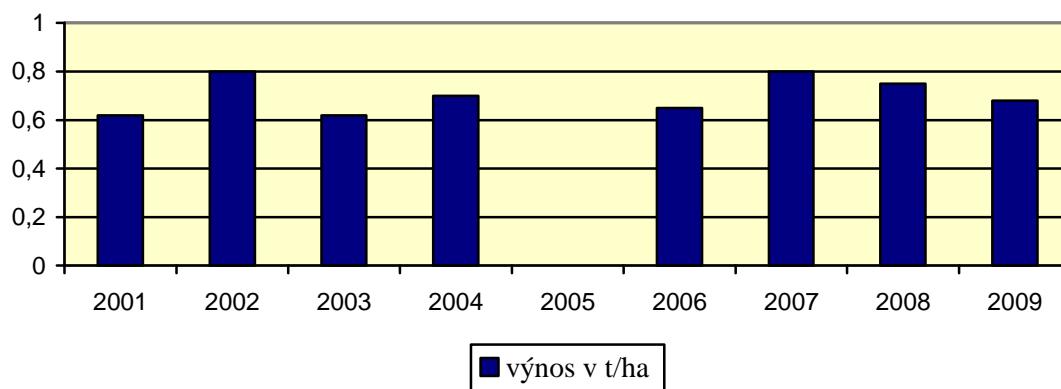
Rok	Ostropestřec mariánský		
	Plocha v ha	Produkce v t	Výnos v t/ha
2001	1500	930	0,62
2002	2500	2000	0,80
2003	2500	1550	0,62
2004	2500	1750	0,70
2005	0	0	0
2006	800	520	0,65
2007	1500	450	0,80
2008	2000	-	0,75
2009	3500	-	0,68

Zdroj: Branžovský, et al., 2010.

Obr. č. 6: Sklizňová plocha ostropestřce mariánského v ČR.



Obr. č. 7: Výnos ostropestřce mariánského v ČR.



Oblast speciálních plodin, mezi něž LAKR patří, v poslední době trápí nedostatek pěstitelů. Narůstá ale počet zpracovatelských firem. Nárůst ploch, tak jak je uvádí Český statistický úřad mezi lety 2008 a 2009 způsobilo především navýšení ploch ostropestřce mariánského. Hlavním důvodem poklesu pěstování léčivých rostlin v období od roku 1995 a 2008 je stagnace výkupních cen při silném nárůstu vstupů, daňová politika a další aspekty, které „zdražují“ produkci léčivých rostlin u pěstitelů. Většina produkce zpracované v ČR je proto z dovozu (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

Co se týče sběru LAKR je možno konstatovat, že zpracovatelské organizace, které mají svoje nákupny, vykazují meziroční mírný nárůst množství vykupovaných LAKR. Přehledy o množství LAKR, získaného ze sběru však nejsou dostupné.

Z přehledů celní správy vyplývá, že v roce 2009 se celkem dovezlo 16 200,4 tun koření a 2487,8 tun rostlin pro voňavkářství a farmacii apod. Vývoz koření činil 1921,2 tun a rostlin pro voňavkářství a farmacii apod. se vyvezlo 5 420,8 tun. Bilance zahraničního obchodu kořením ČR je – 14 279,2 tun, u rostlin pro voňavkářství a farmacii apod. + 2993 tun (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

Dle údajů Českého statistického úřadu se LAKR pěstovaly v roce 2009 na větších plochách ve srovnání s minulými lety, kdy docházelo v ČR k poklesu pěstebních ploch. Snížil se výnos z ha u léčivých i aromatických a kořeninových rostlin, pokles výnosu může být způsoben řadou faktorů. Mezi nejvíce pěstované druhy ze skupiny LAKR patří ostropestřec mariánský (KOCOURKOVÁ, RŮŽIČKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, 2010).

2.3. OSTROPESTŘEC MARIÁNSKÝ (*Silybum marianum* /L./ Gaert.)

2.3.1. PŮVOD A OBJEVENÍ ROSTLINY

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

Rodové jméno *Silybum* vzniklo nejspíše z řeckého slova silybon – střavec, patrně podle tvaru a velikosti úboru. Druhové jméno *marianum* má původ ve staré legendě, kde se traduje, že bílé mramorování na listech pochází od mateřského mléka bohorodičky. Je možný i další výklad, že Marino jméno mělo zdůraznit významné léčivé účinky ostropestřce mariánského (STARÝ, 2000).

Původní areál ostropestřce sahá od Pyrenejského poloostrova přes jižní Evropu po Kavkaz a Írán (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981)

Rostlina pochází ze Středomoří (JANČA, ZENTRICH, 1995), kde je pro svou ostnatost listů často vysazována jako ochranný plot okolo malých zelinářských políček proti kozám, které spásou 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).

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 měla tato rostlina uplatnění především v lidovém léčení i lékařství (SPITZOVÁ, 1981). Využívala se celá rostlina (STARÝ, 2000), listy a kořeny méně (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981), přisuzovala se jí moc všeléku.

V ne zcela přehledném souboru indikací zaujme tvrzení, že droga pomáhá od bolesti v boku, nejspíše způsobených nemocí jater a žlučníku. Až známý německý lékař Radenmancher (1851) vyjádřil jasně, že ostropestřec má účinky proti jaterním onemocněním a k tomu účelu doporučoval velmi slavnou a dlouho používanou tinkturu ze semen - *Tinktura Cardu mariae*. Madaus v Lehrbuch der biologischen

Heilmittel, v učebnici léčiv biologického původu, která vyšla v Lipsku roku 1938, věnuje ostropestřci značnou pozornost.

Bez nadsázky tedy můžeme říci, že od časů, kdy byly léčivé účinky této byliny poprvé nalezeny až do současné doby, kdy se podařilo izolovat aktivní prvky a objasnit alespoň částečně jejich mechanismus účinku, uplynulo více než 2 tisíce let (JEGOROV, 1996).

V současnosti zaznamenává tato rostlina rychlý rozvoj pěstování (SPITZOVÁ, 1997) a stala se naší velkoplošně nejpěstovanější léčivou rostlinou (BUCHTOVÁ, DRAŠNAROVÁ, 2003). Hlavním důvodem je zájem farmaceutického průmyslu o drogu, v tomto případě o plody (semena) – *Fructus cardui mariae* (SPITZOVÁ, 1997). Významným evropským producentem plodů ostropestřce mariánského a léků z něho vyrobených je Polsko. Pěstitelské oblasti v této zemi zaujímají rozlohu asi 2000 ha. V roce 1990 byla v Polsku vypěstována a registrována odrůda SILMA a byly vyvinuty principy agrotechnických postupů tohoto kultivaru (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

2.3.2. BOTANICKÁ CHARAKTERISTIKA

Vědecká klasifikace:

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	vyšší rostliny (<i>Cormobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné rostliny (<i>Rosopsida</i>)
Podtřída:	<i>Asteridae</i>
Řád:	hvězdnicotvaré (<i>Asterales</i>)
Čeleď:	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)
Rod:	ostropestřec (<i>Silybum</i>)
Binomické jméno:	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.

Zdroj: www.wikipedia.cz

Ostropestřec mariánský je především velkoplošně nejpěstovanější léčivou rostlinou v ČR (BUCHTOVÁ, DRAŠNAROVÁ, 2003).

U nás v přírodě je ojedinělý a vzácný. S pěstováním v ČR se začalo začátkem 70. let na Pardubicku (MOUDRÝ).

Tato rostlina je mohutná jednoletá, případně ozimá (STARÝ, 2000), v klimatických podmínkách ČR výjimečně dvouletá bylina (SPITZOVÁ, 1997). Dorůstá výšky 50 až 250 cm (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981) v závislosti na půdních podmínkách (STARÝ, 2000). Někdy roste na kamenitých stráních a rumišťích i divoce (JAROŠ, 1992).

Silná lodyha je dole hustě, nahoře řidčeji olistěná a vyplněná dřevem, podobná benediktu lékařskému (MOUDRÝ). Na konci hlavní osy i bočních výhonků vyrůstají velké bohaté úbory s červenofialovými (STARÝ, 2000), velmi zřídka bledě fialovými (OPLETAL, VOLÁK, 1999) nebo bílými květy o průměru 50 – 80 mm (MOUDRÝ). Květy mají kulovitý zákrov a střechovitě uspořádané, ostnitě zubaté listeny (OPLETAL, VOLÁK, 1999), které vybíhají v mohutné, žlábkovité, nazpět ohnuté ostny (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981).

Ostropestřec mariánský je cizosprašný. Hlavními opylovači jsou včela a čmelák. Proto má uplatnění i jako rostlina medonosná (SPITZOVÁ, 1997). Kvetे od července do září (MOUDRÝ) v závislosti na termínu výsevu (SPITZOVÁ, 1997).

Plodem ostropestřce je nažka 6 až 7 mm dlouhá, hladká, tmavě hnědá nebo šedohnědá s tmavším žíháním (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981). Plody mají chloupkaté chmýří. (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004), jehož štětinky jsou drsné, dole srostlé (JANČA, ZENTRICH, 1995). Droga je bez zápachu a má nahořklou chuť (OPLETAL, VOLÁK, 1999). V jednom úboru se nachází kolem jednoho sta plodů (MAJEROVÁ, 2012). HTS je 25 – 30g (MOUDRÝ). Semena se z rostliny získávají těsně před dozráním, a to i se slupkou, protože účinné obsahové látky se nacházejí bezprostředně pod osemením (JAROŠ, 1992).

Střídavé, podlouhle eliptické, přisedlé, ostře zoubkované, chobotnatě laločnaté listy mají na okrajích pichlavé ostny a jsou tuhé, lesklé a na líci bíle mramorované (MOUDRÝ). Jsou charakteristické tím, že dobře svádějí dešťovou vodu ke kořenům (STARÝ, 2000). Do dvou měsíců po výsevu se vytvoří přízemní růžice listů, přechod do generativní fáze je charakterizován tvorbou rozvětvené květonosné lodyhy. Jednotlivé ostnaté, hákovitě zahnuté koncové úbory se štětinatým lůžkem spočívají jednoduše na konci lodyhy. Zákrovní listy mají dlouhé trny (MOUDRÝ). Korunní lístky jsou trubkovité, červenofialové (KOUDELA, 2009). Kořenový systém je velmi variabilní, zpravidla je mohutně vyvinut kulový kořen (SPITZOVÁ, 1997).

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

Ostropestřec rychle a spolehlivě klíčí (STARÝ, 2000). Právě rychlé klíčení a malá odolnost mladých rostlinek vůči mrazu jsou důvodem, proč u nás tato bylina nezdomečňuje, pouze jen přechodně zplaňuje, zatímco v teplých místech – například v asijských stepích, jihoamerických pampách a jihoaustralských pustinách se stala obtížným plevelem, vyskytujícím se ve velkém množství (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981).

Klíčit začíná 2 - 3 týdny po výsevu, při optimálních podmínkách i po 5 dnech. (KUBÍNEK, 1987). Zprvu vzejde přízemní růžice - velké, chobotnaté listy s početnými, dožluta zbarvenými trny (STARÝ, 2000). Přibližně po dvou měsících přejde rostlina do generativní fáze charakterizované rychlým dlouhým růstem (SPITZOVÁ, 1997).

Semena se sklízí i se slupkou individuálním sběrem, neboť účinné obsahové látky se nalézají pod o semeněním (JAROŠ, 1992). Celé, chmýřité hlavice se uřežou a uloží na větraných, suchých místech, kde dozrávají. Teprve poté se šištice vymlátí a plody zbaví chmýru (JANČA, ZENTRICH, 1995). Nažky dozrávají v závislosti na termínu výsevu od července do září. Délka vegetační doby je v průměru 4 měsíce (SPITZOVÁ, 1997). V chladných a deštivých letech, obzvláště ve vyšších polohách, se sklizeň oddálí až na září. Výhodou teplých nížin je kratší vegetace, větší jistota dozrání za příznivých podmínek pro sklizeň. Výnosy zde bývají vyšší, pokud přijdou srážky včas a v dostatečné míře (KUBÍNEK, 1987).

Ostropestřec mariánský je statný dekorativní bodlák (JANČA, ZENTRICH, 1997). Sušené úbory, uřezávané před rozkvětem, slouží jako dekorativní rostliny do sušených kytic (MOUDRÝ). Suší se obrácené dolů na vzdušných a stinných místech (HUSÁKOVÁ, LHOTSKÁ, 1981). Za zmínku stojí použití ostropestřce na jednoletý živý plot, který vytváří těžko prostupnou překážku. Vždy musíme mít na paměti, že se jedná o rostlinu silně ostnitou, proto při manipulaci s ní postupujeme velmi obezřetně, abychom předešli zbytečnému poranění. (KOUDELA, 2009).

2.3.3. PĚSTOVÁNÍ ROSTLINY

2.3.3.1. AGROTECHNIKA, PŘÍPRAVA PŮDY, OSIVO, SETÍ

Ostropestřec je relativně přizpůsobivý půdním podmínkám, ve srovnání s obilovinami je však citlivější na málo úrodné půdy. Velký význam má dostatek organické hmoty (MOUDRÝ).

Jako suchomilnou rostlinu se doporučuje pěstovat ostropestřec v teplejších slunečních, ne však suchých oblastech, chráněných před větrem. Půda by měla být kvalitní, s neutrální reakcí, bohatá na vápník (MAJEROVÁ, 2012) a dostatečně zásobená živinami a vodou (KOUDELA, 2009).

Na předplodinu není náročný. Jako nejvhodnější lze doporučit jetelovinu nebo organicky hnojenou plodinu. Jako předplodiny jsou vhodné také okopaniny nebo luskoviny. Porost zakládáme přímým jarním výsevem (březen - duben) (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). Před jarním výsevem osivo máčíme v teplé vodě, po osušení ho vysejeme. Za deset dní vyklíčí, čímž se jeho vegetační období zkrátí minimálně o dva týdny. Nemáčené osivo klíčí asi po dvaceti dnech (MAJEROVÁ, 2012). Semena ostropestřce vyséváme do řádků vzdálených 60 cm, do hloubky 2 až 5 cm (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004), na sušších půdách i hlouběji (KOUDELA, 2009) Semena, která zůstanou hluboko v půdě způsobují zaplevelení pozemku v dalších letech. Půdu ostropestřec vyžaduje ve „staré síle“. Připravuje se stejně jako pro jarní obiloviny. Pečlivé urovnání povrchu je důležité pro dodržení stejnoměrné hloubky výsevu. Norma výsevu je 12 kg/ha, u přesných secích strojů lze výsevek snížit na 8-10 kg/ha. Sejeme do hloubky 20-30 mm. Při pozdním výsevů a v suchých podmínkách zvyšujeme normu výsevu i hloubku setí. Teoretický spon se pohybuje podle způsobu kultivace v rozmezí 0,30 x 0,30 m až 0,40 x 0,40 m u porostů které nebudeme plečkovat. Na 1 m² by mělo být 6 až 12 jedinců. Teplota půdy pro setí má být 5°C, půda se nesmí lepit. Sejeme co nejdříve jakmile půda oschne, od konce března až začátek dubna (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

Na lehkých půdách je na jaře hlavní problém rychlá ztráta vody, takže možnost včasného setí je velmi důležitá. Při pokusech prováděných na Sicílii byl ostropestřec mariánský zaset v pozdním podzimu a v Íránu už i v září. V Maďarsku byly nejvyšší výnosy ostropestřce mariánského hlášeny z výsevu v březnu nebo

začátkem dubna. Dříve provedené experimenty provedené v Polsku ukázaly, že oddálení termínu pro výsev od 1. dubna do 22. dubna zapříčinilo snížení výnosu plodů o $0,23 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, ale došlo ke zvýšení obsahu silymarinu z 0,3% na 0,5% (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

Počet postranních odnoží produkovaných rostlinami ostropestřce mariánského závisí na hustotě rostlin a na klimatických podmínkách. Při nízké hustotě (10 rostlin na metr čtvereční) plodina vytvoří 10 – 16 postranních větví. Dvojnásobná výsadba této hustoty snížila počet bočních odnoží až o polovinu. Ve Španělsku byly nejvyšší výnosy nažek hlášeny ve sponu 40-ti až 50-ti rostlin na metr čtvereční, v Německu při 20-ti až 30-ti rostlinách na metr čtvereční. Doporučuje se, aby se v teplejším klimatu rostliny vysazovaly při nižších hustotách než v mírném podnebí. Rostliny pak tvoří více postranních větví, které dosáhly za těchto podmínek zralosti pro sklizeň. V Polsku se doporučuje zasít 15 – 20 kg osiva na hektar, ale klíčivosti vysetého materiálu je obvykle 65 %. Porost by měl mít cca 30 rostlin na metr čtvereční. Setím semen kolem 15. dubna bude zajištěn dobrý vzrůst a přínos plodů a dosáhneme požadované průmyslové úrovně obsahu silymarinu - nejméně 2,0 % v sušině nažky. Na lehkých půdách by se měla dávka osiva zdvojnásobit. (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010). Materiál výsevu byl ošetřen prostředkem Oxafun T75DS/WS (účinné látky carboxin a thiuram) při dávce $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Klíčící schopnost osevňového materiálu, v závislosti na roku, je 65 – 75%, v praxi to bylo o 25 – 35% méně než se očekávalo. Semena byly vysety 3 cm hluboko. Vzdálenost řádků byla 20 cm (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

Hustota rostlin vysetých v prvním termínu výsevu, a to jak po vyklíčení tak i před sklizní byla v experimentu v Polsku nižší, než hustota rostlin ve druhém termínu výsevu v průměru o osm rostlin na metr čtvereční (viz. č. Tab. 3). Dvojitá dávka výsevu měla rovněž za následek poměrný nárůst hustoty rostlin. Rostlinné ztráty od vzrůstu do sklizně byly v průměru 10 %. Největší vliv na výšku rostlin měl počet květenství na rostlině a počet plodů v květenství na postranních výhoncích, a povětrnostní podmínky. Při prvním termínu setí a nižším výsevu vzrostly hodnoty sledovaných parametrů. Podobný trend byl rovněž pozorován u počtu plodů na květenství na hlavním stonku a hmotnosti 1000 zrn. Podíl hmotnosti slupky s plodem nebyly závislé na období růstu a když tak se hodnoty měnily relativně málo, výrazně poklesly v pozdějších termínech setí a při setí dvou dávek setby (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

Tab. č. 3: Hustoty osazení rostlin, výnosové prvky, výnos a chemické složení plodů ostropestřce. Hodnoty v řádcích označených různými písmeny se výrazně liší.

Charakteristika – sledovaný parametr	Rok			Termín výsevu		Hmotnost satby (kg.ha ⁻¹)		Průměr
	2004	2005	2006	31.03 - 08.04	13.04 - 18.04	12	24	
Počet rostlin na m ² po vyklíčení	40,2	42,2	49,2	39,7b	48,1a	29,4b	58,3a	43,9
Počet rostlin na m ² před sklizní	37,4	37,6	43,6	35,8b	43,3a	26,8b	52,3b	39,6
Výška rostliny (cm)	107,5a	106,1a	69,8b	104,4a	84,6b	96,7a	92,3b	94,5
Počet květenství na rostlinu	6,2a	3,6b	2,2c	4,2a	3,8b	4,8a	3,2b	4,0
Počet plodů v květenství na hlavním stonku	114,4a	123,9a	84,5b	124,2	91	109,9	105,3	107,6
Počet plodů v květenství na bočních výhoncích	84,0b	111,2a	89,8b	109,1a	80,8b	99,7a	90,3b	95,0
Hmotnost 1000 ks plodů (g)	31,0a	26,9b	26,1b	28,2	27,8	28,4	27,5	28
Podíl slupky v hmotnosti nažky (%)	49,0	49,0	48,1	49,3a	48,1b	49,0a	48,4b	48,7
Ovoce výnos (t.ha ⁻¹)	1,68a	1,47a	0,55b	1,22	1,24	1,21b	1,25a	1,23
Obsah silymarinu v plodech (%)	2,11b	2,03b	2,41a	1,98b	2,38a	2,18	2,18	2,18
Výnos silymarinu (kg.h ⁻¹)	35,4a	29,8b	13,3c	24,2b	29,5a	26,4	27,3	26,5
Obsah oleje v plodech (g.kg ⁻¹)	192c	221b	237a	213	219	218	214	216
Obsah bílkovin v plodech (g.kg ⁻¹)	159	161	163	159b	162a	161	160	161

Zdroj: Andrzejewská, et al., 2010.

Datum výsevu má vliv na změny ve většině sledovaných parametrů, ale nemá vliv na chemické složení plodů. Taktéž nemá datum výsevu žádný vliv na vzhled rostlin (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

2.3.3.2. PŮDNÍ A KLIMATICKÉ NÁROKY

Na lehkých půdách trpí ostropestřec mariánský nedostatkem vláhy. Zcela nevyhovující jsou půdy mělké, písčité a kyselé (MOUDRÝ). Pěstování kultivaru SILMA se doporučuje na úrodných půdách, které jsou hluboké a bohaté na živiny.

Na takových půdách může být výnos nažek vysoký, může dosahovat až $2,01 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

V příznivých klimatických podmínkách a vhodné poloze pozemku lze ostropestřec pěstovat až do nadmořské výšky 600m. Součet průměrných denních teplot se pohybuje mezi 1800 až 2000°C. Kritické období růstu je fáze přechodu k tvorbě květonosné lodyhy, kdy vyžaduje rostlina dostatek vody (MOUDRÝ).

Celková průměrná denní teplota vzduchu má značný vliv na tvorbu květenství, na sklizeň a na obsah silymarinu. Odložení termínu pro výsev způsobuje, že rostlina dosáhne generativní fáze při vyšších teplotách, což zvyšuje akumulaci flavonolignanů (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

Ihned po výsadbě byl v průběhu experimentu v Polsku na dvouděložné plevele aplikován postřik Stomp 330EC (účinná látka je pendimetalin) herbicid v množství $3 \text{ dm}^3\cdot\text{ha}^{-1}$. Ke zničení plevelu ve druhém nebo třetím týdnu po vyklíčení byl aplikován herbicid Fusilane Forte 150EC (účinná látka je fluazifop-p-butyl) v množství $1 \text{ dm}^3\cdot\text{ha}^{-1}$ (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

ANDRZEJEWSKÁ (et al., 2010) popisuje, že povětrnostní podmínky mají největší vliv na změny na většinu sledovaných parametrů. Nicméně hustota plodin, podíl hmotnosti slupky plodů a celkový obsah bílkovin nejsou závislé na počasí.

2.3.3.3. HNOJENÍ A VÝŽIVA ROSTLINY

Ostropestřec vyžaduje kvalitní půdu, dobře zásobenou humusem a živinami. Na podzim je třeba pozemek přihnojit 5 až 6 kg NPK 1 na 1 ar. Pokud jsou po vzejití listové růžice slabé, přihnojíme ledkem amonným nebo vápenatým, a to 1 až 1,5 kg na 1 ar. (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

Půdu připravujeme podobně jako u jarních obilnin s možností přihnojování fosforečnými a draselnými hnojivy ve středních dávkách. Z důvodů jeho pozdějšího poléhání omezíme dusíkaté hnojivo (MAJEROVÁ, 2012).

ANDRZEJEWSKÁ (et al., 2010) uvádí, že v popisovaném experimentu ostropestřec mariánský pěstoval ve třetím roce po aplikaci hnojiv. Předplodina byla kukuřice na siláž. Předseťové ošetření se skládalo z $50 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ dusíku, $30,5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ fosforu a $58 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ draslíku.

Ostropestřec mariánský vytváří velké množství biomasy a pro její tvorbu odebírá z půdy poměrně velké množství živin. Problematikou optimální výživy této

plodiny se detailně věnují především v oblasti severního Egypta. Na písčitéch půdách této oblasti je popisováno 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 srovnání různých druhů dusíkatých hnojiv (močovina, síran amonný a dusičnan amonný, všechny v dávce 143 kg N na ha) 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 a 140 kg.ha⁻¹) a tří dávek draslíku (46, 71 a 95 kg K na ha) působí nejvyšší dávky nárůst výnosu nažek, výnosu oleje a obsahu oleje v nažkách ve srovnání s nižší hladinou hnojení, avšak nemají významný vliv na obsah flavonolignanů. (OMER, et al., 1993)

Ostropestřec je v Egyptě pěstován také pod závlahami, kde při vysokých dávkách dusíkatých a draselných hnojiv (476 kg N na ha v dusičnanu amonném a 99 kg K na ha v síranu draselném) 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).

Pro podmínky střední Evropy je doporučováno vysévat ostropestřec na půdu ve staré půdní síle. Dávky dusíku by měly být v rozmezí 60 – 90 kg, v regionech bohatších na srážky je výhodné dávku dusíku dělit. Jednu až dvě třetiny aplikovat při předset'ové přípravě a zbytek ve fázi 6-8 pravých listů. Paušálně je možné aplikovat cca 300 – 400 kg NPK předset'ově (Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Rámcová metodika 2, 2003).

Pro pěstování ostropestřce mariánského v podmínkách ČR je doporučováno aplikovat 45 až 60 kg N, 17,5kg 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 je popisována zemědělská výrobní oblast řepařská nebo

obilnářská s hlubší hlinitou půdou a s velmi dobrou zásobou živin (Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o., Rámcová metodika 2, 2003).

Organické hnojení přímo k ostropestřci je vhodné, zapraví se hlubokou orbou na podzim (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

HABÁN a OTEPKA (2009) hodnotili následující faktory experimentu z let 2004 až 2007 s těmito výsledky:

1. Zapracování posklizňových zbytků po předplodině (bez posklizňových zbytků – K, zapracované posklizňové zbytky – R);
2. Pěstování vymrzající meziplodiny (bez meziplodiny – B, s meziplodinou – M);
3. Hnojení průmyslovými hnojivy (bez hnojení – O, varianta hnojení – F).

Nejvyšší úrody nažek ostropestřce mariánského byly zaznamenané v roce 2006: od 1 426,5 kg/ha (varianta RBO – zapracované posklizňové zbytky, bez meziplodiny a bez hnojení průmyslovými hnojivy) do 1 832,0 kg/ha (variant KBF – bez zapracování posklizňových zbytků, bez meziplodiny a s aplikací průmyslových hnojiv).

Nejvyšší obsah látek silymarinového komplexu v sušině nažek ostropestřce mariánského byl zaznamenaný v roce 2007: od 15,14 mg/kg (RMF – zapracované posklizňové zbytky, s meziplodinou a hnojením průmyslovými hnojivy) do 20,01 mg/kg (KBO – bez zapracování posklizňových zbytků, bez meziplodiny a bez hnojení průmyslovými hnojivy).

Nejvyšší celková úroda silymarinu z hektaru byla zaznamenaná na hodnocených variantách v roce 2006, a to na variantě bez zapracování posklizňových zbytků od 16,45 kg/ha (KMF – s meziplodinou a hnojením průmyslovými hnojivy) do 24,62 kg/ha (KMO – s meziplodinou a bez hnojení průmyslovými hnojivy).

2.3.3.4. KULTIVACE BĚHEM VEGETACE

Ostropestřec má velmi dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům. Velmi mu škodí odběrem vláhy plevele vytrvalé jako pýr, pcháč aj. Základem ničení plevelů je mechanická kultivace, obvykle ve fázi 6 pravých listů. Po zapojení porostu již plečkování nelze provádět (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

Kultura roste poměrně rychle. V řádcích vyjednotíme rostliny na vzdálenost dvacet centimetrů, tedy do sponu 40 x 20 cm. Porost zbavíme plevelů a podle potřeby zavlažujeme. Spon 0,45 x 0,20 lze plečkovat mechanizací určenou pro cukrovku (MAJOROVÁ, 2012).

Během května a června malé záhony okopáváme, dokud se porosty nezapojí (KOUDELA, 2009).

2.3.3.5. SKLIZEŇ

Na úrodných půdách a zejména po letním dešti vegetativní hmota značně přibývá a rostliny tvoří květenství na četných bočních výhoncích, čímž se prodlužuje vegetativní růst, ovlivňuje vyváženost zrání a tím je sklizeň těžší (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

Plody sklízíme v době plné zralosti (tj. když jsou úbory zralé na hlavní ose stonku). Ostropestřec dozrává většinou v průběhu srpna až září (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). 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. Při vlhkém počasí se úbory zavírají, to je vhodné pro sklizeň (MOUDRÝ). Před sklizní musíme porost ošetřit desikantem, čímž docílíme vyrovnanosti zrání plodů na mateční rostlině (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). Zralost avizuje pápěří, které se dá lehce vytáhnout prsty. Dobu sběru nesmíme promeškat, protože zralá semena vyzobávají ptáci (MAJOROVÁ, 2012). Vlastní sklizeň provádíme asi za 10 dnů. Ostropestřec se v malém kosí, ve velkém sklízí mlátičkou (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004). Sklizeň porostu se provádí sklízecí mlátičkou (OPLETAL, VOLÁK, 1999). U sklízecí mlátičky se demontují pera přiháněče, vytřasadla se nahradí vytřasadly pro sklizeň kukuřice a zvětší se mezera mezi mláticím košem a bubnem. Rostliny totiž bývají v době sklizně ještě zelené (MOUDRÝ).

Při pokusech v Polsku byl podle ANDRZEJEWSKÉ (et al., 2010) ostropestřec mariánský sklizen kombajnem (Wintersteiger, Riedl, Rakousko). Sklizeň nastala 2. a 9. srpna 2004, 29. července a 2. srpna 2005 a 21. a 25. července 2006 (první termín odpovídá datu pro rostliny s dřívějším termínem sadby).

Tab. č 4.: Energetická výtěžnost fytomasy z ostropestřce mariánského.

Spalné teplo (s popelovinami) MJ.kg ⁻¹	Výnosy suché hmoty t.ha ⁻¹	GJ.ha ⁻¹
19,892	20,10	399,82

Zdroj: Petříková - VÚRV Praha-Ruzyně, CZ-Biom.

2.3.3.6. POSKLIZŇOVÉ OŠETŘENÍ

Po výmlatu se plody vyčistí, dosuší a zbaví chmýru. Droga má šedomodrou barvu, je bez pachu a chutná nahořkle. Skladuje se v suchu, je třeba ji zabezpečit proti škůdcům.

Sklizená semena podle potřeby dosušíme a skladujeme na vzdušném místě v suchu a chladu (KOUDELA, 2009).

Plody v úborech se suší v jedné vrstvě na stinném, dobře větraném místě. Usušené plody se z úborů vymlátí a zbaví se nečistot. Semena si zachovávají klíčivost dva až tři roky. Správně usušené zdravé plody jsou oválného tvaru, lehce zploštělé, šest až sedm milimetrů dlouhé, 1,5 milimetrů silné, hladké s lesklým žlutavým horním okrajem, bez zápachu, olejnaté, mírně nahořklé chuti (MAJEROVÁ, 2012).

Získaný výnos z experimentu byl čištěn a nažky se sušily při 50°C a až 8% vlhkosti (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010) v sušičkách obilí, nebo na roštech .

2.3.3.7. CHOROBY A ŠKŮDCI

Ochrana léčivých rostlin proti škodlivým činitelům je jedním z nejdůležitějších faktorů pro úspěch v pěstování těchto rostlin. Proto je nutné věnovat jejich ochraně zvýšenou pozornost. Použité přípravky musí být vždy v souladu s platným „Seznamem registrovaných prostředků na ochranu rostlin“ a za dodržení ochranných lhůt (MUŠKA, 2007).

Ostropestřec mariánský patří mezi nejvýznamnější plodiny z LAKR. Jeho pěstební plocha je poměrně stabilizovaná. Odběratelé požadují vysokou kvalitu suroviny, a proto upřednostňují odběr od stálého a osvědčeného pěstitele. Ze živočišných škůdců škodí především mšice (*Aphidoidea*) (MUŠKA, 2007).

Z chorob, především v podhorských oblastech, je to plíseň šedá (*Botrytis cinerea*), která způsobuje totální destrukci dozrávajících semen v úboru. Uvádí se také napadení houbou z rodu *Fusarium* spp., kdy vadnutí způsobuje například *Fusarium oxysporum*. Na odumírání a padání klíčnicích rostlin se nejvíce podílí *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani*. Na uvedené škodlivé činitele není registrován žádný přípravek (MUŠKA, 2007).

Čas od času je zaznamenán výskyt padlí čekankového a v poslední době i skvrnitosti způsobené druhy rodu *Alternaria* a *Septoria*. V posledních letech byl zaznamenán i žír housenek polyfágních škůdců a babočky bodlákové (SPITZOVÁ, 1997).

Nejvážnější chorobou je tracheomykóza – cévní vadnutí. Příznaky choroby se projevují masově od fáze listové růžice. Je to postupné vadnutí, žloutnutí až hnědnutí celé rostliny. U dospělých rostlin dochází k zasychání pupat. Proto je osivo vhodné mořit např. Fundazolem a používat biologicky hodnotné osivo, které časně zasejeme. Ve fázi kvetení bývá ostropestřec napadám plísní šedou (*Botrytis cinerea*). Prevencí proti této chorobě je včasný výsev. Zasetá semena mohou vyzobávat bažanti, zralá semena jsou atraktivní i pro četné ptáky (MIKEŠOVÁ, LUTOVSKÁ, 2004).

Na internetovém zdroji <http://tilia.zf.mendelu.cz> jsou uvedeni tyto škůdci: kovařík tmavý (*Agriotes obscurus*), mšice maková (*Aphis fabae*), štítonoš zelený (*Cassida viridis*), štítonoš černoskvrnný (*Cassida murraea*), nosatčík, bažanti, myši, vrabci, zvonci.

2.4. CHEMICKÉ SLOŽENÍ A ÚČINNÉ LÁTKY V ROSTLINĚ

2.4.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA LIGNANŮ

Lignany přitahovaly pozornost badatelů již odedávna. Jednak proto, že jsou hodně rozšířené v rostlinné říši, a také proto, že se vyznačují širokou škálou biologických účinků (HARMATHA, 2005). Je to poměrně rozsáhlá skupina sekundárních metabolitů cévnatých rostlin se zajímavými fyziologickými účinky. Skládají se ze dvou fenylpropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců. 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).

Existují důkazy, že lignany hrají nezanedbatelnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, rostlinami navzájem a rostlinami a hmyzem. To znamená, že mají svůj význam v obranném systému hostitelských rostlin a ovlivňují tak symbiózu organismů na ekologické úrovni (HARMATHA, 2005).

Lignany ovšem vykazují velmi rozmanité spektrum účinků i na vyšší organismy, včetně člověka. Šíře jejich biologických vlastností předpokládá také šíři mechanismů účinku. Tato šíře podněcovala již odedávna jejich výzkum, v současnosti se soustřeďuje především k prozkoumání strukturně aktivních vtaů, o zmapování místa jejich působení, no a v konečném důsledku i o vývoj nových farmakologických preparátů. Příkladem mohou být lignany yatein a podophyllo toxin a jeho cíleně modifikované deriváty etoposid a teniposid, které dospěly až k aplikaci v klinické medicíně. Tato léčiva působí v širokém spektru chemoterapie rakoviny (HARMATHA, 2005).

Biologické účinky a původ fytoestrogenů lignanového typu a enterolignanů rostlinného původu jsou dosud předmětem zájmu, především z hlediska potravinářského, farmakologického, či analytického (HARMATHA, 2005).

Lignany s fytoestrogenními účinky jsou bohatě zastoupeny v běžné rostlinné stravě: sóji, rýži, obilninách, vlákninách, ořšcích, ovoci, v menší míře ovšem také v nápojích, nutričně a gastronomicky tak významných, jakým je bílé a červené víno. Lidstvo využívá tyto zdroje v celé své historii, ovšem s různou intenzitou. Některé zdroje jsou nepostradatelné a tudíž i trvalé, některé se ve vlnách vytrácejí a vracejí, ovlivňované buď ekonomickou nutností nebo mediální/reklamní popularizací. Příkladem může být sekoisolariciresinol diklukosoid ze lněných semen (s obsahem 0,9-3 %, podle kultivaru). Tato semena, jako vedlejší produkt lnu, byla v minulosti běžnou potravou a krmivem, stejně jako lněný olej, který byl ovšem průmyslovou revolucí degradován jen na výrobu fermeží, linolea a margarínů. Přestože světová produkce lněných semen je stále asi 2,5 miliónů tun ročně (čtvrtina z toho v Kanadě), nutriční využití lněných produktů vázlo. Až nyní se tyto produkty vracejí do povědomí lidí, hodně popularizované jako téměř všelčící nutraceutika, aniž by byly jejich deklarované farmakologické a medicínální účinky uspokojivě objasněny (HARMATHA, 2005).

Lignany byly nalezeny v krvi a moči savců, včetně člověka. Tyto živočišné lignany vznikají ve střevech savců mikrobiální transformací rostlinných lignanů, účinkují v organismu jako fytoestrogeny (SLANINA, 2000).

Nepolární charakter lignanů jim umožňuje snadnou prostupnost buněčnými membránami a schopnost ovlivnit v buňkách řadu biologických dějů. Některé lignany se využívají jako léčiva, např. cytostatika etoposid a teniposid. Vykazují také výraznou antivirovou aktivitu, včetně aktivity vůči HIV (SLANINA, 2000).

Lignany jsou bezesporu reprezentativní a významnou skupinou biologicky účinných sekundárních metabolitů polyfenolického typu a zároveň fenylpropanového původu. Jejich bohatá strukturní variabilita a různorodá biologická účinnost již odedávna poutá nemalou pozornost fytochemiků a periodicky, v určitých etapách, také botaniků, farmakologů, chemických ekologů a nyní i odborníků pro kvalitní a bezpečnou výživu. V současnosti roste zájem o informace kolem bioaktivních polyfenolů i u veřejnosti, která hodlá poučeně využívat fytofarmaka, či nutraceutika, tj. biologicky aktivní potravinové doplňky, schopné preventivně chránit zdraví před přibývajícými chronickými chorobami a zdravotními problémy z nadměrného životního a výkonnostního stresu. Současná vlna zájmů je sice orientována právě na zmíněná hlediska a na využití těchto látek pro lepší kvalitu výživy, nicméně již víc než dvě dekády také na studium a využití v oblasti chemické ekologie a ochrany rostlin vůči škodlivým organismům a nepříznivým ekologickým vlivům. Lignany, spolu s dalšími sekundárními metabolity, posloužily totiž jako významné chemické znaky pro botanickou klasifikaci v dobách, kdy proteomika a genomika nebyly ještě dostatečně rozvinuté a dostupné pro tyto účely (HARMATHA, 2006).

V současnosti je známo více jak 200 lignanů nacházejících se ve více než 70 čeledích rostlin. Mohou se vyskytovat v rostlinách ve formě glykosidů, většinou jsou však přítomny ve formě aglykonů. Lignany se nacházejí hojně u nahosemenných rostlin (jehličnany) a u dvouděložných rostlin. Byly nalezeny prakticky ve všech částech rostlin, typická je jejich přítomnost ve dřevě a kůře stromů a v pryskyřicích. U některých druhů byl nejvyšší obsah lignanů nalezen v semenech (SLANINA, 2000).

2.4.2. FLAVONOLIGNANY

V roce 1952 Herzog a Hagedorn zjistili, že aktivní složkou semen ostropestřce mariánského jsou právě látky flavonoidní povahy. Struktura dvou falvanonů – silybinu a silydianinu byla objasněna v roce 1960 Janiakem a Hänselem. Dalšími prvky směsi flavonoidů, souhrnně označované jako silymarin, jsou silychristin a isosilybin. 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).

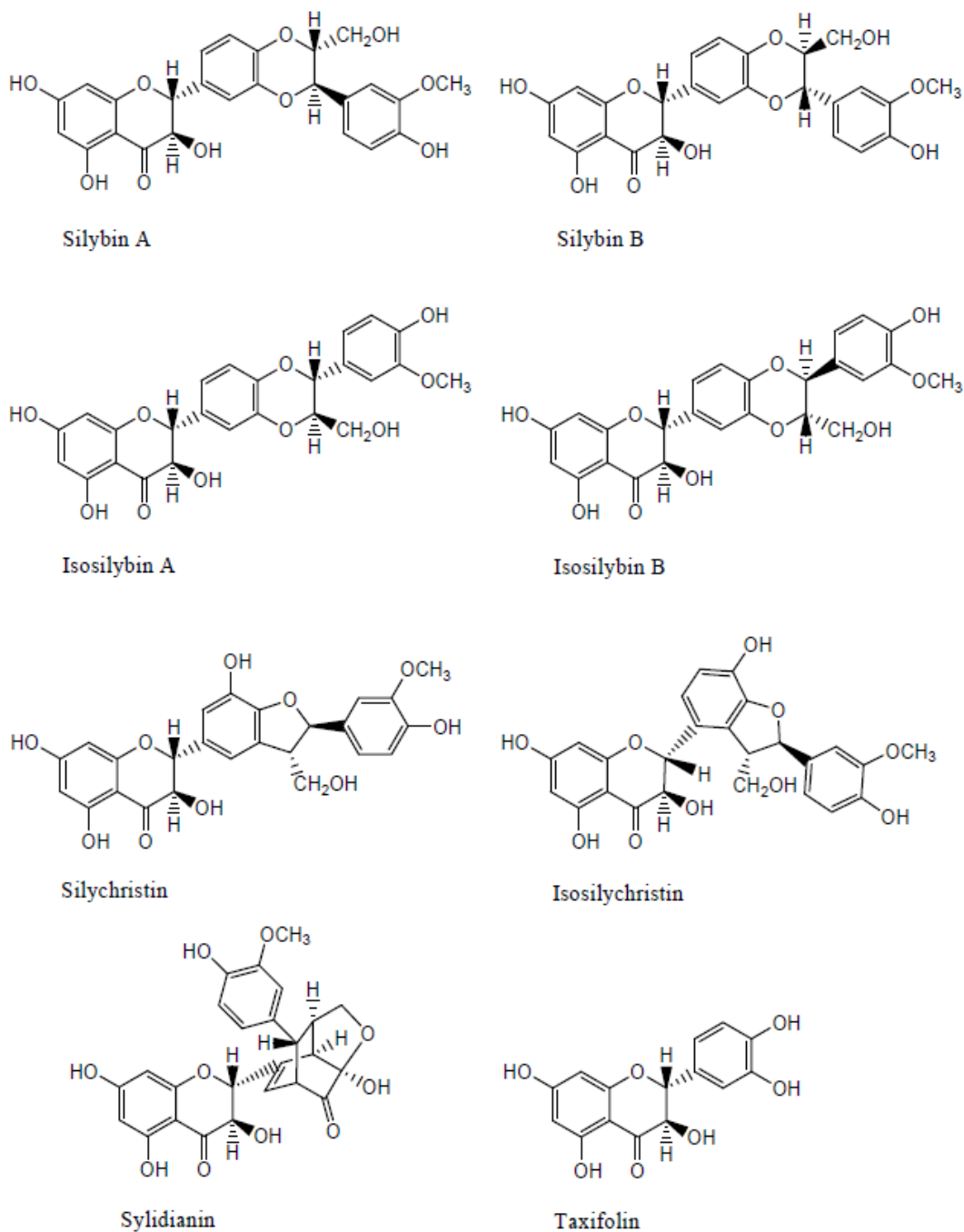
Silybin, silydianin, silychristin a iso-silybin tvoří spolu s taxifolinem a kvercetinem podstatnou část flavonoidů extrahovaných ze semen fialově kvetoucího ostropestřce. Jako minoritní složky byly izolovány analogické flavony odvozené od kvercetinu, např. dehydrosilybin, které pravděpodobně vznikají v důsledku snadné oxidace flavanonů na flavony. Z bíle kvetoucí variety *Silybum marianum* byly izolovány 3-deoxy-flavanolignany silandrin, silyrnonin, silyhermin a neosilyherminy A a B, které se v semenech fialově kvetoucího ostropestřce nevyskytují (JEGOROV, 1996).

U ostropestřce mariánského se účinné látky ze skupiny flavanolignanů označují 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. Bíle kvetoucí varieta obsahuje navíc silandrin, silymonin, silyhermin a neosilyhermin A a B (KŘEN, WALTEROVÁ, 2005).

Farmaceutický průmysl využívá obsahu flavanolignanů (silybin, silymarin, silydianin a silychristin) v jejich semenech, které mají hepatoprotektivní efekt. Vedle toho obsahují nažky ostropestřce také 26 až 28 % bílkovin, 25 až 35 % oleje s vysokým podílem kyseliny linolové (55 až 72 %) a olejové (15 až 26 %) a 8 až 12 % nasycených mastných kyselin. (SCHUSTER, 1992). V pokusech ČZU v Praze

bylo dosaženo průměrné olejnatosti 24,5 %, přičemž značné rozdíly byly způsobovány rozbory nestejně zralých nažek. (BARANYK, et al., 1995). Vedle toho obsahují semena ještě histamin, thyramin, hořčinu, sacharidy, malé množství silice (INDRÁK, CHYTILOVÁ, 1992), tokoferol (0,6%) a steroly, jako kampesterol, stigmasterol, beta-sitosterol (OPLETAL, VOLÁK, 1999).

Obr. č. 8: Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu.



Zdroj: Tůmová, Tůma, 2009.

Silymarin je směs nejméně 7 flavonolignanů a flavonoidu taxifolinu získaná z extraktu semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* [L.] Gaertn, Asteraceae). Silymarin má chemopreventivní účinky a je aktivní složkou řady fytopřípravků a doplňků stravy. Farmakologicky nejvíce studovaným flavonolignanem silymarinu je silybin (v silymarinu do 60 %), který je směsí dvou stereoisomerů, A a B v poměru 1:1. V práci Jančové a kol. byly sledovány metabolické přeměny silybinu v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (JANČOVÁ, et al., 2008).

Silymarin (SM) je extrakt ze semen ostropestřce mariánského. Jeho polyfenolová frakce obsahuje flavonolignany silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, dehydrosilybin, silydianin, silychristin, isosilychristin a flavonoid taxifolin. Vedle těchto látek je v SM stále chemicky neidentifikovaná polymerní frakce. Silymarin je v humánním lékařství znám jako rostlinné hepatoprotektivum, má výrazný antioxidační a protizánětlivý účinek. Z flavonolignanů SM je silybin používán jako léčivo u intoxikací muchomůrkou zelenou (VOSTÁLOVÁ, 2008).

Znalost metabolických přeměn silybinu významně přispívá k jeho použití jako chemoprotektiva snižujícího riziko vzniku některých nádorových onemocnění (JANČOVÁ, et al., 2008).

2.4.3. VLIV AGROTECHNIKY NA CHEMICKÉ SLOŽENÍ A OBSAH ÚČINNÝCH LÁTEK

Hlavní součásti silymarinu jsou silybinin a silychristin (viz. Tab. č. 5). Zpožděním termínu výsevu v uvedeném pokusu se zvýšil obsah taxifolinu ve všech složkách silymarinu, zejména pak silybinin a silychristin. Hodnota variačního koeficientu ukazovala podobný stupeň stability taxifolinu i pro většinu flavonolignanů, jen variační koeficient pro isosilybinin měl mírně nižší hodnoty. Proporce mezi flavonolignany se měnily z roku na rok, i když ne výrazně, zatímco termín setí neměl vliv na kvantitativní vztahy mezi složkami silymarinu. (viz. Tab. č. 6).

Tab. č. 5: Obsah taxifolinu a flavonolignanů v plodech ostropestřce v závislosti na daném výzkumném roku a termínu setby (%).

Rok	Termín setby	Taxifolin	Flavonolignany				Celkem
			Silychristin	Silydianin	Silybinin	Isosilybinin	
2004	31.03-08.04	0.23	0.59	0.30	0.81	0.24	1.95a
	13.04-18.04	0.28	0.69	0.33	0.97	0.28	2.26b
2005	31.03-08.04	0.24	0.58	0.27	0.60	0.21	1.65a
	13.04-18.04	0.37	0.87	0.37	0.88	0.28	2.40b
2006	31.03-08.04	0.28	0.82	0.35	0.90	0.26	2.33a
	13.04-18.04	0.28	0.88	0.37	0.97	0.27	2.48a
2004 - 2006	31.03-08.04	0.25	0.66	0.31	0.77	0.24	1.98a
	13.04-18.04	0.31	0.81	0.36	0.94	0.28	2.38b
Průměr		0.28	0.74	0.33	0.85	0.26	2.18
CV (%)		19.0	19.0	16.5	17.0	13.9	-

Zdroj: Andrzejewska, et al., 2010.

Tab. č. 6: Poměry flavonolignanů v závislosti na termínu pro výsev a výzkumných let.

Rok	Termín výsevu	Poměr Silydianin/Silychristin	Znamenající pro roky	Poměr Silydianin/(Silybinin + Isosilybinin)	Znamenající pro roky
2004	31.3. – 8.4.	1:2,0	1:2,0	1:3,5	1:3,6
	13.4. – 18.4.	1:2,1		1:3,8	
2005	31.3. – 8.4.	1:2,1	1:2,2	1:3,0	1:3,1
	13.4. – 18.4.	1:2,4		1:3,1	
2006	31.3. – 8.4.	1:2,3	1:2,4	1:3,3	1:3,3
	13.4. – 18.4.	1:2,4		1:3,4	
2004 - 2006	31.3. – 8.4.	1:2,1	1:2,2	1:3,3	1:3,3
	13.4. – 18.4.	1:2,3		1:3,4	

Zdroj: Andrzejewska, et al., 2010.

2.4.4. METODY STANOVENÍ ÚČINNÝCH LÁTEK V ROSTLINĚ

Vyšší rostliny jsou nejen důležitým zdrojem potravin, dřeva, vlákniny, olejů, ale také poskytují nejbohatší výběr přírodních látek, z nichž mnohé jsou využívány v medicíně, kosmetice a potravinářství. Odhaduje se, že asi 30 000 známých přírodních produktů je z více než 80 % rostlinného původu a asi třetina vyráběných léčivých přípravků obsahuje biogenní látky rostlinného původu nebo z nich získané

deriváty. Mnohé z těchto látek nelze získat ekonomicky únosnou organickou syntézou a jejich výroba pomocí genového inženýrství v mikrobiálních systémech není zatím řešitelná, protože vznikají mnohostupňovými syntézami. Jednou z možností, jak získat požadované rostlinné látky, je i využití rostlinných explantátových kultur (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

SPIJKOVÁ (2010) uvádí, že látky účinné nebo látky v droze obsažené se stanovují různými postupy. Největší problém stanovení účinných látek drog je jejich separace od velkého množství složek extraktu, látek vedlejších i balastních a zajištění vhodných standardů. U drog, které obsahují komplex chemicky blízké příbuzných účinných látek a jeho dělení je obtížné nebo z hlediska posouzení kvality drogy neúčelné, se kvalita drogy posuzuje stanovením komplexu látek, vyjádřený obsahem jedné ze složek. Stále nejrozšířenější metodou využívanou pro stanovení obsahu je spektrofotometrie. Je aplikována u 46 drog, zejména obsahujících třísloviny, anthraglykosidy, flavonoidy, antokyaniny, proantokianiny, hydroxyskořicové kyseliny. Stanovení obsahu některých látek v drogách je prováděno titračně a mezi používanými metodami se můžeme setkat také se stanovením gravimetrickým. Siličné drogy se hodnotí podle obsahu silice zjištěného destilací s vodní párou ve zvláštním přístroji a za podmínek, které jsou lékopisem přesně definované. Toto tradiční stanovení je u několika siličných drog již doplněno stanovením složek silice plynovou chromatografií. Zřetelný je nárůst drog, jejichž kvalita se hodnotí stanovením obsahových látek pomocí HPLC. Většinou jde o drogy do lékopisu nově zařazené, u některých však tato metoda nahrazuje dříve užívaný postup. Stanovené látky jsou různých struktur – terpeny, kumariny, flavonoidy, deriváty hydroxyskořicových kyselin, fenolické látky, saponiny a další. Stanovení obsahu není zatím vyžadováno u 21 drog. Jejich kvalita je posuzována specifickými zkouškami a stanovením látek extrahovatelných vodou. I když lze dosavadní zkoušky těchto drog považovat z hlediska bezpečnosti za vyhovující, je jen otázkou času, kdy i u těchto drog bude jejich kvalita posuzována přesnějšími postupy.

Rostlinné drogy mají ve farmacii významné postavení. Z tohoto vyplývá význam kontrolování jejich kvality. K zajištění kvality, standardnosti a bezpečnosti lékopisných drog slouží přesně dané postupy. Kritéria pro hodnocení rostlinných drog se postupně zpřísnují. I přes výrazné pokroky v metodice stanovení je stále v lékopisných postupech využíváno několik konvenčních metod, které umožňují

standardizaci pouze v určitých hranicích. S obrovským rozmachem instrumentálních metod analýzy jsou při studiu přírodních látek využívány stále modernější a přesnější metody, které jistě najdou uplatnění i v lékopisných zkouškách rostlinných drog (SPILKOVÁ, 2010).

ANDRZEJEWSKÁ (et al., 2010) popisuje stanovení flavonolignanů v souladu s metodou Evropského lékopisu (2008). Pět gramů mletých semen ostropestřce mariánského bylo vloženo na savý papír. Extrakce byla provedena po dobu 4 h pomocí Soxhletova přístroje s petroléterem. Vzorek byl na vzduchu sušen, přeložen do 100 ml baňky s kulatým dnem a extrahoval se čtyřikrát 20,0 ml methanolu v páře po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Kombinované extrakty methanolu se pomocí rotační odparky ve vakuu kompletně odpařily. Pevný zbytek se rozpustil v 20,0 ml methanolu a přemístil se do 25 ml odměrných baněk, objem každého vzorku byl přinesen do 25 ml metanolu. Analýzy byly provedeny pomocí Agilent Technologies 1100 kapalinového chromatografu za následujících podmínek: sloupec: Lichrospher RP18 (0.250m x 4 mm, 5 μ m; Merck), teplota kolony 25 ° C, mobilní fáze: eluent A - methanol: kyselina fosforečná pH 2.5 (40:60 V / V),

eluent B - methanol: kyselina fosforečná pH 2,5 (53:47 V / V),

eluční přechod 0-15 min 33% B, 15-30 min 33 50% B, 30-40 min 50% B, 40-45 min 50 - 33% B,

průtok: 1,0 ml / min, objem nástřiku: 10,0 μ L,

detekce: DAD λ = 288.0 nm.

Následující referenční roztoky byly použity: silybinin (PhytoLab GmbH & Co), silydianin (PhytoLab GmbH & Co), silychristin (PhytoLab GmbH & Co) a taxifolin (Carl Roth GmbH & Co) v methanolu v těchto koncentracích: 0,5, 0,10 a 0,25 mg ml⁻¹. Retenční časy analýz byly (min): taxifolin - 4,8, silychristin - 7,4, silydianin - 9,1, silybinin A a B - 20,8 a 23,5, isosilybinin a B - 30.4 a 32.4 (ANDRZEJEWSKÁ, et al., 2010).

2.4.4.1. CHROMATOGRAFIE

Chromatografie patří mezi nejrozšířenější analytické dělicí metody poskytující kvalitativní a kvantitativní informaci o jednotlivých složkách směsi. Slouží k identifikaci, separaci a stanovení velkého množství jak organických tak anorganických látek (SCHNEEDORFEROVÁ, 2009).

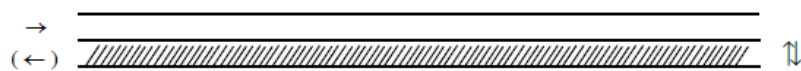
Chromatografie je dnes považována za významné odvětví separačních metod. Posunula výrazně meze detekce látek i manipulace s nimi, jakož i jejich spektrum. Lze analyzovat či preparovat látky od nejlehčích plynů až po homologické polymery, biomolekuly, buňky, viry či částice, často i s přihlédnutím k isotopové, isomerní, iontové či chirální povaze, ba i k velikosti a tvaru (JANÁK, 2011). Ovlivňuje výrazně metodickou úroveň chemického výzkumu a kontroly v řadě úseků základních věd, jako je chemie, biologie či medicína. Dokázala řešit řadu problémů v aplikované sféře, jako je kontrola životního prostředí, jakost potravin, čistota či metabolizace léčiv, některé otázky kriminalistiky, vesmírného programu i řízení některých chemických výrobníků (petrochemie apod.). Vyvolala i vznik průmyslové výroby nové třídy vědeckých a měřicích přístrojů (JANÁK, 2011).

Její vývoj určují dva milníky: Objev učiněný M. S. Cvetem (1872–1919) v letech 1903–1906 a zavedení principu rozdělovací (partition) chromatografie a konceptu teoretického patra A. J. P. Martinem (1910–2002) v roce 1941. Vývoj mezi Cvetem a Martinem lze nazvat klasickou érou chromatografie, charakterizovanou použitím adsorbentů a postupným vylepšováním, často pokusem a chybou. Údobí po Martinovi lze kvalifikovat jako inspirativní vývoj chromatografie. Rozdělovací princip znamenal přechod od dvojrozměrného povrchu adsorbentu k trojrozměrnému prostoru v kapalně fázi obklopující sorbovanou molekulu. To znamenalo dalekosáhlou linearizaci užitečné části sorpčních isoterem a velké rozšíření možných sorpčních médií s různými sorpčními vlastnostmi. Koncept teoretického patra pak umožnil hodnocení rozlišovací schopnosti (JANÁK, 2011).

Podobně prosazení plynové chromatografie (1952) otevřelo cestu k rozvoji teoretického popisu díky ideálnějšímu chování molekul v plynném stavu. Zvládnutí její teorie přispělo nejen ke zvýšení separačního výkonu z úrovně nejvýše set teoretických pater klasických verzí k 10^6 pater nových variant (viz. Tab. č. 7), ale vyvolalo také znovuzrození kapalinové chromatografie a dalších technik na vyšší úrovni. Vývoj chromatografie ovšem není izolovaný proces. Probíhá současně s vývojem dalších separačních a spektrálních metod, zejména s elektroforézou a hmotnostní spektrometrií. Ty se vzájemně ovlivňují nebo dokonce hybridizují. Charakter příslušné isotermy pak ovlivňuje i provedení a formát chromatografického experimentu (viz. Tab. č. 8). Chromatografii charakterizují v podstatě tyto hlavní

procesy: sorpce, distribuce mezi alespoň dvěma fázemi, difuze a přenos hmoty, přičemž tyto procesy jsou porušovány tokem nebo pohybem fáze či fází (JANÁK, 2011).

Tab. č. 7: Principy a metody chromatografie a analogických technik.



Směr toku (rovnováhy)	Fáze	Chromatografie
→	kapalina plyn superkritické fluidum elektrický tok	"Cvetova" papírová tenkovrstevní plynová superkritická fluidní elektro
←	sorbent	hypersorpce
→	kapalina	protiproudě roztrpávání „denuder“
↓ ↑	adsorpce	kapalina – pevná látka (gel) plyn – pevná látka superkritické fluidum – pevná látka
	chemisorpce	ionto-výměnná afinitní tvorba komplexů
	absorpce (rozdělování)	kapalina – kapalina plyn – kapalina
	omezená difuze fyzikální pole	gelová exkluze frakcionace tokem v silovém poli

Zdroj: Janák, 2011.

Tab. č. 8: Základní a realizační typy chromatografické separace.

Rovnováha (izoterma)	Provedení experimentu	Formát experimentu	Sprážené techniky
lineární	zónové (eluční)	kolona	vícerozměrné
nelineární	frontální vytěšňovací	drážka plocha	kombinace se spektrálními metodami

Zdroj: Janák, 2011.

Chromatografie umožňuje dělení a identifikaci velkého počtu organických a anorganických látek. Do této skupiny metod patří například HPLC – vysokotlaká kolonová kapalinová chromatografie, GLC – plynová chromatografie, TLC – chromatografie na tenké vrstvě (DVOŘÁKOVÁ, 2006).

Pohyblivou fází tvoří plyn (nebo kapalina), fáze nepohyblivá, označovaná jako sorbent, může být velmi rozdílné formy - mohou jí být částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů. Může to také být kapalina umístěná na povrchu inertního nosiče či film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry (DRBAL,

KŘÍŽEK, 1999). Tato fáze vytváří tzv. chromatografické lože různých tvarů, kterými protéká fáze mobilní (KOPŘIVA, 2002).

Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami vzorku dochází k vzájemným interakcím, které rozhodují o průběhu separačního procesu. Podle typů interakcí můžeme dělit jednotlivé chromatografické metody (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná aj.). Názvy jednotlivých metod 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).

Tab. č. 9: Dělení chromatografických metod podle druhu skupenství mobilní a stacionární fáze.

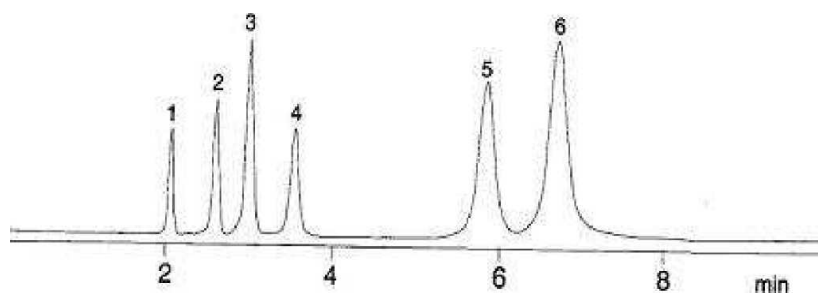
Fáze mobilní	Fáze stacionární	Separací mechanismus	Metoda	Symbol
plyn	kapalina	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
plyn	tuhá látka	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina	kapalina	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
kapalina	kapalina	sítový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
kapalina	tuhá látka	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
kapalina	tuhá látka	chemisorpce	iontově výměnná chromatografie	IEC

Zdroj: Schneedorferová, 2009.

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. č. 9). Identifikace píku se provádí podle analýzy předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, podle

tzv. standardní směsi, za stejných experimentálních podmínek (CHROMATOGRAFIE, 2012).

Obr. č. 9: Ukázka chromatogramu.

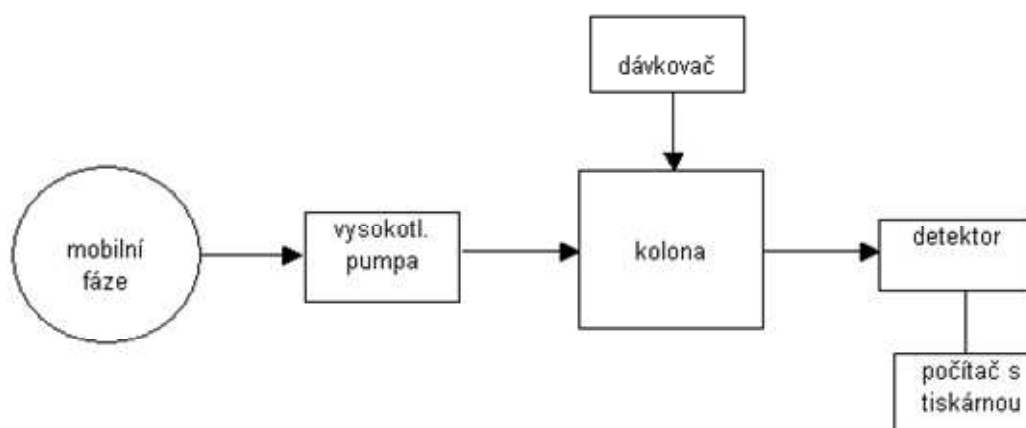


Zdroj: Chromatografie, 2009.

2.4.4.1.1. HPLC – VYSOKOTLAKOVÁ KOLONOVÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf.

Obr. č. 10: Schématický náčrt kapalinového chromatografu.



Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Metoda HPLC existuje jako tzv. „normální“ a „reversní“. Při normální HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Při reversní HPLC je naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Reversní HPLC bývá též označovaná jako RP HPLC (reverse phase HPLC). Tato HPLC technika je již řadu let používána mnohem častěji než normální HPLC.

Mobilní fázi v RP HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Na rozdíl od GLC zde mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (kvalitu separace).

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm) na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN a pod).

Vysokotlaká bezpulzní pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi (viz. stacionární fáze), které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze zajišťuje právě vysokotlaká pumpa.

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače.

Kolona - zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce typicky 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči.

V metodě HPLC je dostupná opět řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem, stejně jako v případě GLC, i když se jedná o jiné typy detektorů. Na rozdíl od GLC zde však není k dispozici tak univerzální detektor, jakým je v GLC detektor FID. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní

spektrometr, refraktometrický detektor a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence).

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo ul). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a tisknut v podobě chromatogramu.

HPLC analýza je ve srovnání s GLC analýzou mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Je však citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny a jiné), které by při použití plynové chromatografie degradovaly a byly by tak neanalyzovatelné. Analýzy některých směsí a látek je možné provádět jak metodou HPLC tak GC (např. mastné kyseliny).

Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram, který vizuálně vypadá stejně jako chromatogram pořízený metodou GLC. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík, stejně jako v metodě GLC. Pro vyhodnocení chromatogramu (kvalitativní a kvantitativní analýza) platí stejné principy jako byly popsány u GLC (shoda retenčních časů, kalibrace).

Analýzou HPLC se zjišťuje přítomnost vitamínů rozpustných ve vodě v tucích, kortikoidů, kortikosteroidů, antidepresiv, karbonylových sloučenin (environmentální analýzy), třaskavin, výbušnin a pod. (CHROMATOGRRAFIE, 2012)

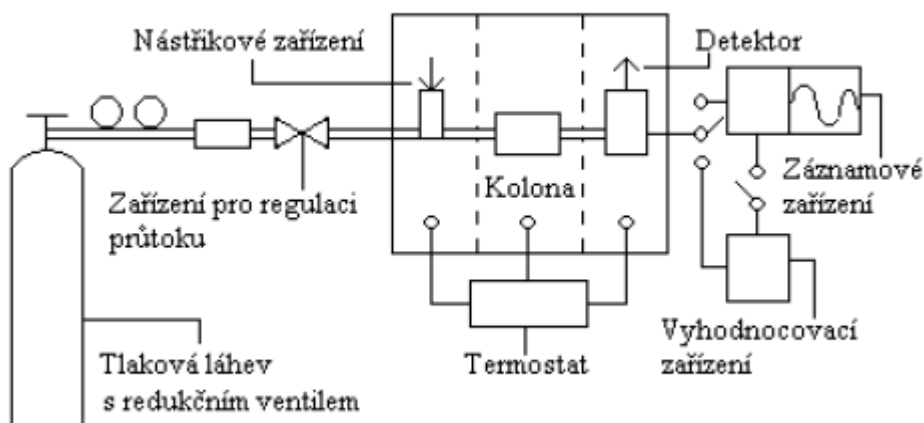
2.4.4.1.2. GC – PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE

GC je jednou z nejvýznamnějších analytických instrumentálních metod. Mezi její charakteristiky patří jednoduchost, citlivost a vysoká separační účinnost. Využívá

se k identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i látek, které lze definovaným způsobem převést v páry. Podle druhu stacionární fáze dělíme GC na GLC (Gas-Liquid Chromatography), kde je stacionární fáze kapalina zakotvena na nosiči a GSC (Gas-Solid Chromatography), kde je touto fází tuhá látka. Není velký rozdíl v pracovním postupu ani konstrukci zařízení, ale v principu dělení. V případě GSC se látky dělí na základě rozdílné adsorpční schopnosti jednotlivých složek směsi či síťovém efektu a u GLC je principem rozdělování látek mezi nosným plynem a kapalinou zakotvenou na inertním nosiči (SCHNEEDORFEROVÁ, 2009).

Plynový chromatograf se skládá z několika základních částí (viz. Obr. č. 9). Zdrojem nosného plynu bývá nejčastěji tlaková nádoba spojena se zařízením na čištění plynu, regulaci a měření tlaku. Následuje zařízení pro dávkování vzorku, které jej vpraví do proudu nosného plynu a pokračuje s ním do kolony. Z kolony pokračuje rozdělená směs do detektoru, poté následuje vyhodnocovací zařízení. Důležitou součástí chromatografu je termostat potřebný k udržení přesné teploty dávkovače, kolony a detektoru (SCHNEEDORFEROVÁ, 2009).

Obr. č. 11: Blokové schéma plynového chromatografu.



Zdroj: Schneedorferová, 2009.

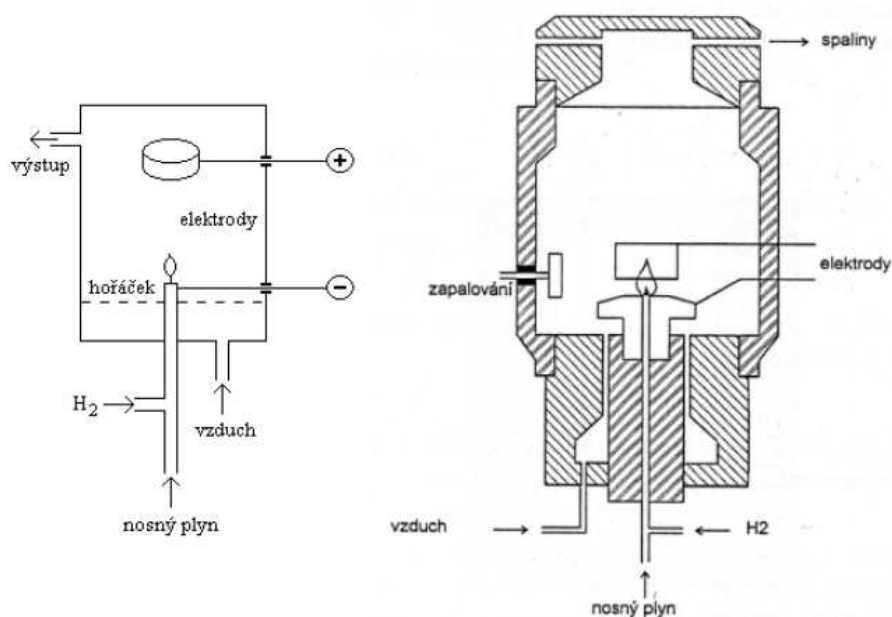
Obvykle je zdrojem nosného plynu ocelová tlaková láhev s redukčním ventilem plněna např. dusíkem, vodíkem, heliem, argonem nebo oxidem uhličitým. Nosný plyn musí být vhodný pro použitý detektor. Mezi podmínky, které by měla splňovat dávkovací zařízení, patří: rychlý převod kapalných a pevných vzorků v plynné (v malém objemu). Vzorek musí zachovat během převodu stejné

kvalitativní i kvantitativní vlastnosti. Úspěšnost analýzy závisí, mimo jiné, na správném výběru kolony. V GC se používají dva základní typy kolon: náplňové a kapilární. Kapilární kolony se vyrábějí ze syntetického taveného křemene a jsou potaženy polyamidovým obalem (zvyšuje pružnost). Stacionární fáze je tvořena tenkým filmem na vnitřním povrchu kolony. Jejich délka se pohybuje mezi 20 – 200 m a jejich vnitřní průměr je 0,1 – 0,3 mm. Náplňové kolony obsahují adsorbent – silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta (GSC) nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází (GLC). Nejrozšířenějšími nosiči v GC jsou křemeliny (mechanicky pevné, inertní vůči vzorku a stacionární fázi, tepelně stabilní). Tyto kolony jsou proti kapilárním kratší, dosahují délky desítek centimetrů až několika metrů a jejich vnitřní průměr je 3 – 8 mm. Náplňové kolony jsou vhodnější ke kvantitativnímu stanovení (mají větší sorpční kapacitu, ale menší dělicí schopnost) a kapilární kolony se lepe hodí ke kvalitativní analýze (k separaci složitých směsí) (SCHNEEDORFEROVÁ, 2009).

V GC hraje velmi důležitou roli hodnota a stabilita teploty. Pro přesnost měření je nezbytné udržování konstantního teplotního režimu nástřiku, kolony, detektoru a regulátoru tlaku. Tyto části často vyžadují různé teploty, protože jejich rozdílná teplota ovlivňuje analýzu. S rostoucí teplotou kolony roste rychlost analýzy, ale klesá kvalita separace.

Jednou z nejdůležitějších součástí chromatografu je detektor, který slouží k vyhodnocení analýzy. Výsledkem je chromatogram, který představuje závislost signálu detektoru na čase resp. množství plynu prošlého kolonou. K nejčastěji užívaným patří: tepelně vodivostní detektor – katarometr (TDC), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD) a velmi významnou aplikaci je použití hmotnostního spektrometru (MS) jako detektoru k identifikaci látek rozdělených chromatografií (SCHNEEDORFEROVÁ, 2009).

Obr. č. 12: Schéma plamenového ionizačního detektoru



Zdroj: Schneedorferová, 2009.

2.4.4.1.3. TLC – CHROMATOGRFIE NA TENKÉ VRSTVĚ A PC – PAPIŘOVÁ CHROMATOGRFIE

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC, thin layer chromatography) může být typu kapalina-kapalina nebo kapalina-tuhá látka. V obou případech je mobilní fází kapalina. Stacionární fází je v případě TLC chromatografie buď kapalina zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu nebo pevná látka (adsorbent) v podobě tenké vrstvy. V papírové chromatografii je mobilní fází kapalina. Stacionární fází je v PC také kapalina, která je ovšem zakotvena v chromatografickém papíru. Používanými mobilními fázemi jsou například: cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen a pod. Stacionárními fázemi mohou být: silikagel, oxid hlinitý, iontoměniče apod. Jako podložní materiál se pro stacionární fáze používají skleněné desky nebo hliníkové fólie.

Analýza TLC a PC se provádí stejným způsobem. Na tenkou vrstvu nebo chromatografický papír se na startovní místo nanese kapka analyzované směsi. Tenká vrstva (papír) se jedním koncem ponoří do mobilní fáze, tak, aby startovní pozice kapek analytu zůstaly nad hladinou mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou přičemž dochází k transportu a dělení analyzované směsi. Analýza se

ukončuje, když čelo mobilní fáze dorazí do blízkosti protilehlého konce tenké vrstvy (papíru). Čelo mobilní fáze je označeno a tenká vrstva (papír) je vysušena. Vysušená vrstva, na které jsou patrné skvrny jednotlivých složek směsi v různé vzdálenosti od startu představuje chromatogram této metody (CHROMATOGRFIE, 2012).

2.5. Vliv elicitorů na zvýšení obsahu účinných látek

2.5.1. ELICITORY

Elicitory jsou biologicky aktivní sloučeniny, schopné vyvolat u rostliny obrannou reakci. Jako elicitory mohou sloužit jednak některé metabolity vylučované patogeny, tzv. exogenní elicitory, a sloučeniny, které se uvolňují narušováním buněčné stěny obou organismů, tzv. endogenní elicitory. Mezi exogenní elicitory patří například některé polysacharidy a specifické enzymy a peptidy. Endogenní elicitory jsou například oligomery chitinu nebo glykoproteidy, uvolněné hydrolýzou buněčné stěny patogenu, nebo oligogalaktouronany uvolňované z buněčné stěny napadené buňky. Elicitory mohou být druhově specifické, ty jsou produkovány pouze určitým druhem patogenu, nebo druhově nespecifické, to jsou například fragmenty buněčných stěn (MAREČKOVÁ, 2007).

2.5.2. ELICITACE

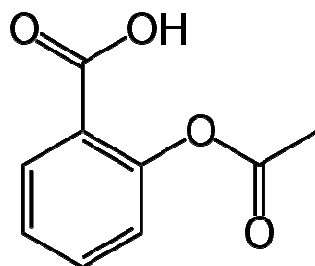
Vzhledem k tomu, že až na výjimky je charakteristickým problémem kultivace rostlinných explantátů v kulturách *in vitro* nízká produkce sekundárních metabolitů těmito kulturami, jednou z metod, kterou je možné dosáhnout zvýšené produkce sekundárních látek je metoda elicitace. Elicitací vyvolaný stres aktivuje obranné reakce rostliny či rostlinného explantátu, které vedou, mimo jiné, ke změně transkripce genů kódujících enzymy ovlivňující biosyntézu sekundárních metabolitů. Elicitace rostlinných kultur za účelem zvýšené produkce sekundárních látek je v současné době studována především pro svoji jednoduchost. Navíc se jedná o metodu ekonomicky výhodnou bez velkých nároků na prostory. Základním předpokladem úspěšné elicitace je mimo jiné nalezení vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doby jeho působení na rostlinnou kulturu *in vitro*. Elicitor

stojí na počátku všech obranných reakcí jako spouštěcí faktor (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

2.5.3. ELICITACE KYSELINOU ACETYLSALICYLOVOU (ASA)

Kyselina acetylsalicylová (*Acidum acetylsalicylicum* - ASA) je jednoduchá chemická sloučenina se sumárním vzorcem $C_9H_8O_4$. (www.wikipedia.org)

Obr. č. 13: Kyselina acetylsalicylová.



Zdroj: www.wikipedia.org.

Obr. č. 14: Prostorový model molekuly kyseliny acetylsalicylové.



Zdroj: www.wikipedia.org.

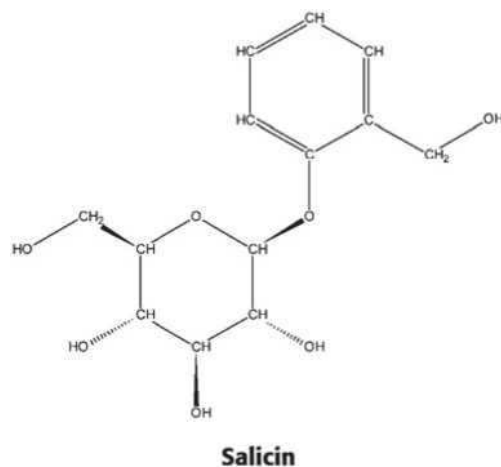
Skládá se z 60 % uhlíku, 35,5 % kyslíku a 4,5 % vodíku. Při běžné teplotě se ASA jeví jako bílý krystalický prášek, jehož bod tání je 136 °C a bod varu 140 °C, o hustotě 1,40 g/cm³. Z hlediska farmacie a medicíny jde o nejstarší synteticky připravené léčivo. Jeho kulturně historický, terapeutický i ekonomický význam je nesmírný. ASA je základem velmi důležité skupiny celosvětově rozšířených léků, z nichž je více než 100 let nejznámější *Aspirin*[®]. V současné době jeho výroba (včetně generických analogů) představuje v celosvětovém měřítku okolo 45 tisíc tun ročně (NOVÁKOVÁ, 2011).

ASA je produktem moderní vědy, avšak kyselina salicylová (jejímž je ASA derivátem) patří mezi přírodní léčiva, která lidstvo užívá již od dob prehistorických. Analgetické a antipyretické účinky rostlinných salicylátů podle všeho znali již Keltové, Germáni, Indiáni v Severní Americe a podobně i Číňané a starověké civilizace Středního východu. První písemná zpráva o jejich medicínském užití je zmíněna již v tzv. Ebersově papyru (1550 př. n. l.). Hipokratés před 2,5 tisíci lety zmiňuje užití odvaru z topolové a vrbové kůry, hlavního zdroje salicylátů (NOVÁKOVÁ, 2011).

Účinky rostlinných salicylátů při léčbě různých chorob znali i významní lékaři v dobách rozkvětu Říše římské. Plinius starší v *Naturalis Historia* konstatoval léčivý účinek odvaru z topolové kůry na bolesti způsobené ischiasem, dnou a podobnými chorobami. Asi nejslavnější lékař starověku - Galén - v 2. st. n. l. popsal protizánětlivé účinky salicylátů z vrbového listí při zraněních či kožních chorobách. (NOVÁKOVÁ, 2011).

Tradiční poznatky o léčivých vlastnostech rozmanitých přírodních salicylátů se ve středověku nepodařilo zásadním způsobem rozšířit. Teprve v roce 1767 předložil reverend Edward Stone Královské lékařské akademii výsledky svých pozorování, v nichž (z dnešního hlediska) již poměrně přijatelným způsobem prokázal léčebné účinky látek, získaných z kůry vrby bílé (*Salix alba*). První úspěšné pokusy o izolaci účinné látky z rostlinných zdrojů - tedy ASA, jsou pak zaznamenány až po více než půl století. V roce 1828 se Johannu Buchnerovi podařilo extrahovat z vrbové kůry žlutě zbarvenou látku, kterou nazval salicin podle latinského rodového názvu vrby *Salix* (NOVÁKOVÁ, 2011).

Obr. č. 15: Vzorec salicinu, glykosidu izolovaného z vrby bílé.



Zdroj: Nováková, 2011.

Roku 1829 se francouzskému farmaceutovi Henrimu Lerouxovi podařilo získat glykosid salicin v čisté krystalické formě. V roce 1838 pak italský chemik Raffaele Piria připravil vlastní účinnou látku, kyselinu salicylovou, která je produktem oxidace aglykonu salicylalkoholu, přírodního glykosidu salicinu. Salicylalkohol se při podávání odvaru z vrbové kůry uvolňoval hydrolyzou glykosidu působením kyseliny chlorovodíkové v lidském žaludku a oxidací se postupně z části přeměňoval na kyselinu salicylovou. Salicin, který se získával také z natě tužebníku jilmového (*Filipendula ulmaria*), měl ale vedlejší účinky: byl velmi hořký, dráždil žaludek a způsoboval průjemy, někdy dokonce smrt. Ani přeměna kyseliny salicylové na kyselinu acetylsalicylovou, kterou ze salicylanu sodného a acetylchloridu připravil v roce 1853 francouzský chemik Charles Frederic Gerhardt, nevedla k podstatnému zlepšení vlastností, protože výchozí látka, připravená z rostlinného materiálu, nebyla příliš čistá. Jeho objev pak upadl v zapomnění.

Teprve v roce 1874 došlo k objevu levné výroby kyseliny salicylové z fenolu, který učinil německý chemik Hermann Kolbe, čímž nastartoval použití kyseliny salicylové jako antirevmatika a antipyretika. Až v roce 1897 německý chemik Felix Hoffmann, který pracoval pro německou firmu Bayer, vyrobil znovu derivát kyseliny salicylové esterifikací fenolické skupiny. Jím připravená, tentokrát čistá kyselina acetylsalicylová měla mnohem méně vedlejších účinků. Kyselina acetylsalicylová se tak stala první syntetickou léčivou látkou. Dne 6. března 1899 byla patentována pod obchodním názvem *Aspirin*[®].

První klinické experimenty s novým léčivem provedl J. Wohlgemut v Leydenské univerzitní klinice v Berlíně již v roce 1899. Celkem 10 pacientům byla podávána průměrná dávka od 1 až do 3 gramů ASA denně. Předmětem léčby byly akutní revmatické choroby, ev. juvenilní revmatoidní artritida. Některým pacientům byla ASA podávána v roztoku etanolu (vzhledem k její obtížné rozpustnosti ve vodě). Výsledky ukázaly vysokou účinnost nového léku. Z dnešního hlediska je zajímavé, že experiment nezaznamenal zvýšenou dráždivost žaludeční sliznice alkoholovým roztokem ASA.

Kyselina acetylsalicylová je derivátem kyseliny salicylové, která je ve formě glykosidu salicinu obsažena ve vrbové kůře (*Salicis cortex*). Použití kyseliny salicylové a jejích derivátů, tedy i kyseliny acetylsalicylové, umožnila až Kolbeho-Schmittova syntéza (r. 1874). V prvním stupni této syntézy se pomocí běžně

dostupného fenolu a oxidu uhličitého za vysokého tlaku a za přítomnosti nadbytku hydroxidu sodného připraví disodná sůl kyseliny salicylové, z níž se volná kyselina uvolní pomocí kyseliny sírové.

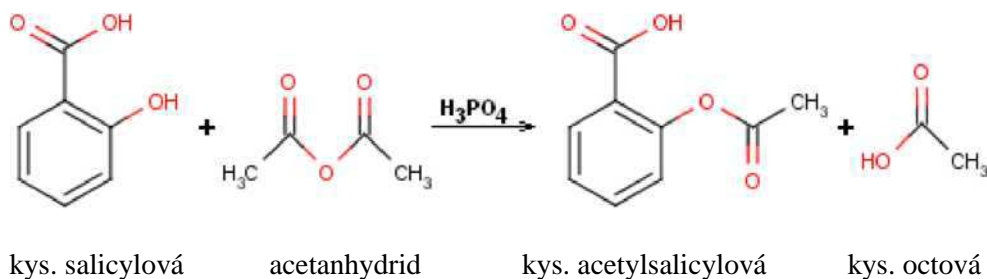
Schéma č. 1: Kolbeho-Schmittova syntéza.



Zdroj: www.wikipedia.org

Zahříváním kyseliny salicylové s acetanhydridem za přítomnosti kyseliny fosforečné dochází k esterifikaci fenolické skupiny, čímž vzniká kyselina acetylsalicylová.

Schéma č. 2: Vznik kyseliny acetylsalicylové z kyseliny salicylové.



Zdroj: www.wikipedia.org

2.5.4. ELICITACE METHYLVILOGENEM (PARAQUAT)

Methylviologen neboli paraquat lze zařadit mezi bipyridilové herbicidy, které jsou využívány jako kontaktní herbicidy či vysušovadla polí. Základní mechanismus působení oxidativního stresu bipyridilů je dán tím, že po jejich působení dochází ke vzniku volných hydroxylových radikálů, které jsou toxické a reagují s membránovými lipidy (peroxidace lipidů). Působením methylviologenu se zvyšuje v rostlinách či kulturách *in vitro* množství aktivních forem kyslíku (ROS).

Jako zdroj ROS je často používán ke sledování působení oxidačního stresu na rostliny a může tudíž ovlivnit produkci sekundárních látek. Vliv methylviologenu byl testován na kultuře *Silybum marianum in vitro*. Jako droga se používá v terapii *Cardui mariae fructus* (usušený zralý plod druhu *Silybum marianum* (L.) Gaertn.). Musí obsahovat nejméně 1,0 % silymarinu, počítaného jako silybin (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

TŮMOVÁ a TŮMA (2009) popisují pokus, kde byl ke zjištění statistické významnosti vlivu elicitoru na obsah flavonolignanů použit t-test rozdílů dvou průměrů. Pro zvolenou hladinu významnosti $P = 0,05$ a pro 4 stupně volnosti $v = 4$ je kritická hodnota testovacího kritéria 2,78.

V kalusové kultuře *Silybum marianum* (L.) Gaertn. došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu flavonolignanů pouze po 6 hodinové elicitaci methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a to o 1 250 %. Po 12, 24, 48, 72 a 168 hodinách se obsah flavonolignanů zvýšil jen nepatrně nebo naopak významně poklesl. U zbývajících testovaných koncentrací elicitoru při aplikaci k suspenzní kultuře byl nárůst produkce flavonolignanů minimální.

V suspenzní kultuře *Silybum marianum* byla produkce flavonolignanů po aplikaci u všech tří koncentrací methylviologenu nepatrná, jen jednou dosáhla stejné produkce ve srovnání s kontrolním vzorkem, a to po 6 hodinové elicitaci methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. V kalusové kultuře *Silybum marianum* byl detekován pouze silychristin. Dále byly nalezeny v kalusových kulturách *Silybum marianum* po elicitaci prekurzorem konyferylalkoholem, taxifolin a silydianin, a to silydianin u kontrolních vzorků i v živném médiu, taxifolin pouze v živném médiu. Po elicitaci suspenzní kultury *Silybum marianum* chitosanem nebyla detegována žádná ze složek silymarinového komplexu. V kontrolních vzorcích média byl však detegován taxifolin. V buňkách kontrolních vzorků kalusové kultury ani v kalusové kultuře *Silybum marianum* se neprokázala po elicitaci UV zářením žádná ze složek silymarinového komplexu, jen vysoké koncentrace fenolových kyselin.

Ve studii popisované TŮMOVOU a TŮMOU (2009) byla detekována v kalusové kultuře kromě taxifolinu, silychristinu ještě další složka silymarinového komplexu - isosilybin B a to pouze v nepatrném množství (0,002 %) po 6 hodinovém působení elicitoru methylviologenu o koncentraci $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$.

V suspenzní kultuře byly dle TŮMOVÉ a TŮMY (2009) zjištěny tyto složky silymarinového komplexu:

- **isosilybin A** (po působení methylviologenu - MV) 12 hodin o koncentraci $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a po působení 72 hodin MV o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$),
- **isosilybin B** (po 12 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a po 48 h působení MV o $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$),
- **silybin A** (po 72 h působení MV o $c_1 = 2,19 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$)
- **silychristin** (po 6 a 72 h působení MV o $c_2 = 2,19 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$),
- **a taxifolin** (u všech tří koncentrací MV).

Všechny složky byly zastoupeny pouze v minimálních množstvích.

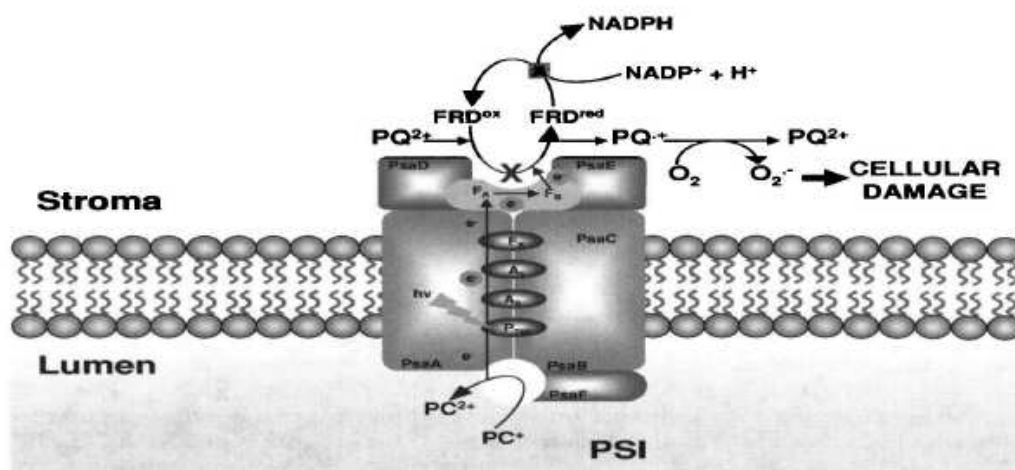
V kontrolních vzorcích suspenzní i kalusové kultury *Silybum marianum* nebyl taxifolin zaznamenán vůbec, pouze v kontrolách suspenzních kultur bylo detekováno nepatrné množství silybinu A a B. Všechny složky silymarinového komplexu zjištěné jak u suspenzních, kalusových kultur, tak v živném médiu byly prokázány pouze v nepatrných množstvích.

Při náhodném odběru vzorků média při kultivaci suspenzní kultury byl stanoven pouze silybin A (0,001 %) po 12 hodinovém působení methylviologenu o koncentraci $c_3 = 2,19 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

U suspenzních i kalusových kultur *Silybum marianum* po působení různých koncentrací methylviologenu bylo zajímavé zvýšení obsahu taxifolinu. Dá se tedy předpokládat, že methylviologen působí jako stresový faktor vyvolávající zvýšenou tvorbu obranných látek - flavonoidů (v tomto případě taxifolinu). Důvodů nízké produkce flavonolignanů v kultuře *Silybum marianum* může být několik. Jedním z nich mohlo být stáří kultury. V této studii byly použity kalusové a suspenzní kultury v 34. až 40. pasáži. V jiné studii byla použita kalusová a suspenzní kultura v 10. až 25. pasáži. Obsah flavonolignanů však prokazatelně klesal a již ve 34. pasáži byla jejich produkce nulová. TŮMOVÁ a TŮMA (2009) dále popisují použití nově odvozené kultury a zahájení elicitačních pokusů již od 5. pasáže. TŮMOVÁ a TŮMA (2009) také uvádějí studii, kde byl pozorován pokles produkce flavonolignanů kulturou *Silybum marianum* v závislosti na jejím stáří. Dalším faktorem mohla být volba živného média nebo volba růstových regulátorů. Podle typu a koncentrace auxinů může docházet k pozitivnímu nebo negativnímu ovlivnění biosyntézy nebo akumulace sekundárních produktů. Dalším důvodem mohl být

nevhodně zvolený elicitor. Předpokladem úspěšné elicítace je použití vhodného elicitoru, jeho koncentrace a optimální doba působení. Podle TŮMOVÉ a TŮMY (2009) dosáhl Sachez-Sampedro a kol. ve sve studii největší produkce silymarinu použitím elicitoru methyljasmonátu v koncentraci 100 μM , a to o 600 % oproti kontrole. TŮMA a TŮMOVÁ (2009) neopomenuli ani na práci Chena a kol., kde ve sve studii sledovali vztah mezi působením reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a produkcí fytoalexinu v kulturách *Salvia miltiorrhiza*. Jako původce superoxidového anionu použili methylviologen. Působení methylviologenu (MV) na rozdíl od působení peroxidu vodíku spustilo produkci fytoalexinu kryptotanshinonu ve všech sledovaných kulturách. Zarověň MV inhiboval tvorbu biomasy a snížil obsah fenolových kyselin.

Obr. . 16: Mechanismus herbicidního ıinku methylviologenu; PSI – fotosystem, PC - plastocyanin, FRD - feredoxin, PQ - plasto-chinon, NADP - nikotinamidadeninukleotid, NADPH - nikotinamidadeninukleotid redukovany, Cellular damage - poškození buňky



Zdroj: TŮmova, TŮma, 2009.

2.6. FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY ÚČINNÝCH LÁTEK

2.6.1. VYUŽÍVÁNÍ OSTROPESTRČE MARIÁNSKÉHO V MEDICÍNĚ

U silymarinového komplexu byla prokázána antioxidační, antihepatotoxická, antiflogistická a protialergická aktivita. Hepatoprotektivní účinky se projevují u alkoholem indukované, akutní a chronické virové hepatitidy, hepatitidy navozené organickými látkami, toxiny a drogami. Dále byly prokázány účinky antitumorové. Se stabilizací buněčných membrán souvisí antialergická aktivita (stabilizuje buněčnou stěnu žírných buněk), což souvisí s antioxidačním účinkem silymarinu, jeho schopností vychytávat volné radikály a inhibovat lipidovou peroxidasu. Působí jako choleretikum a slabé spasmolytikum. Silymarin se dobře vstřebává z trávicí soustavy a rychle se vylučuje žlučí (max. hladina asi 1 h po podání). Vlivem zpětné resorpce z tlustého střeva se silymarin zadržuje v enterohepatálním oběhu a tím je podmíněn jeho ochranný účinek proti hepatotoxinům a při jaterních cirhózách. Byly přesně určeny struktury silybinu A a B a popsány některé zcela nové mechanismy účinků na signální procesy ve zdravých a nádorových buňkách (TŮMOVÁ, TŮMA, 2009).

2.7. NÁVRH TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTŘCE MARIÁNSKÉHO

V letech 2004 – 2005 provedla DVOŘÁKOVÁ (2006) pod vedením profesora KUŽELA poloprovozní a maloparcelový pokus. Během této doby ověřovala účinek různých elicitorů na obsah účinných látek v semenech ostropestřce mariánského. Pro oba pokusy bylo využito osivo blíže nespecifikované odrůdy ostropestřce mariánského.

2.7.1. VYHODNOCENÍ MALOPARCELOVÝCH POKUSŮ

V roce 2004 DVOŘÁKOVÁ (2006) provedla poloprovozní experiment na 26-ti parcelách ve Valticích na Moravě, kde jedna parcela byla kontrolní (stříkána pouze čistou vodou) a ostatní byly použity pro samotný výzkum (tam byly provedeny aplikace 25-ti odlišných elicitorů a směsí různých koncentrací). Pokus byl proveden pouze jeden rok a proto nejsou výsledky práce, uváděné pouze pro bližší představu, stěžejní pro stanovení zásadních agrotechnických postupů a metod pěstování pokusné rostliny.

V pěstebních podmínkách převažuje písčítá půda. Předplodinou ostropestřce mariánského byla cibule na konzum, po jejíž sklizni následovala podzimní orba a na jaře smykování. Hnojem se pozemek v minulých letech nehnojil. Ostropestřec byl vyset 21. března 2004 neseným secím strojem. Na pozemek byl aplikován herbicid Alafon ($1,2 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$) a během vegetace byl použit Fusilade na pýr ($3,1 \text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$).

Na 26 parcel, kde 1 byla o rozloze 10 m^2 , byl aplikován elicitory a jeho směsí zádočným postřikovačem. První aplikace elicitoru proběhla 8. června 2004 (porost byl ve fázi těsně před květem). Druhá aplikace následovala 28. června 2004. Třetí aplikace nebyla realizována. Sklizeň semen proběhla 7. srpna 2004. Semena byla sklizena speciálně uzpůsobeným vysavačem. Pro velkoplošné pěstování by sklizeň musela probíhat výhradně pomocí techniky používané pro sklizeň obilovin.

Další, tentokrát maloparcelový pokus byl proveden v roce 2004 a následně i v roce 2005 na Benešovsku. 22. dubna 2004 byly založeny 4 pokusné parcelky, každá zaujímala 1 m^2 . Semena rostliny byla vyseta do sponu $50 \times 50 \text{ cm}$ (4 rostliny na 1 m^2). Hloubka setí byla 3 cm. Klíčivost byla zjištěna na 76 %. Plocha experimentu o rozloze 4 m^2 zahrnovala 16 rostlin. První postřik elicitem (ASA)

proběhl 18. června 2004 (množství 1 l na m²). Druhé ošetření proběhlo 5. července 2004, Třetí 22. července 2004 a čtvrtá aplikace byla provedena 9. srpna 2004. 29. srpna 2004 došlo k totální likvidaci všech rostlin. Plocha pro experiment v roce 2005 zaujímala 35 m². Navýšení plochy zajistilo přesnější výsledky experimentu. 21. dubna 2005 byla semena rostliny vyseta do sponu 50 x 50 cm (4 rostliny na 1 m², hloubka setí 3 cm). Bylo použito shodné osivo jako v roce předchozím. Zkouška prokázala klíčivost na hodnotě 70 %, což znamená 6-ti % pokles klíčivosti semen oproti roku minulém. Na celkové ploše bylo pozorováno 48 rostlin (12 rostlin zůstalo bez ošetření elicitem, na zbylé rostliny byly aplikovány příslušné dávky elicitoru ASA). První aplikace proběhla 21. června 2005. Druhé ošetření bylo 11. července 2005 a třetí proběhlo 1. srpna 2005. První květy vykvetly 7. července 2005, postupná sklizeň začala 6. srpna 2005 a totální likvidace celých rostlin i s nedozrálými květy, z důvodu deštivého počasí v měsíci srpnu, byla provedena 18. srpna 2005. Půda (půdní typ – hnědá půda) je zde jílovitě-hlinitá, dobře zásobena živinami a každý třetí rok je hnojena hnojem. Následuje podzimní orba a na jaře smykování. U odebraných vzorků půdy analýza stanovila, že půda je neutrální, obsah celkového uhlíku je CO_x = 2,8 % (vysoký obsah – důvodem byla zřejmě předplodina hnojená vysokou dávkou hnoje s kompostem). Množství základních živin v půdě bližší analýza stanovila na : N_{tot} = 0,18 %, P = 398 mg.kg⁻¹, K = 257 mg.kg⁻¹, Mg = 156 mg.kg⁻¹ a Ca = 2977 mg.kg⁻¹. Půda je dobře zásobena organickou hmotou a živinami i bez anorganického hnojení. Předplodinou byly v obou letech brambory. Během pokusu se nepřihnojovalo ani nebyly provedeny jiné zásahy proti chorobám a škůdcům. Porost byl ošetřován pouze mechanickým okopáváním, pletím a zálivkou. Aplikace kyseliny acetylsalicylové (dále jen ASA) o třech různých koncentracích byla provedena v roce 2004 o objemu 1 l a v roce 2005 o objemu 10 l. Úbory s plody z jednotlivých rostlin byly skladovány odděleně v papírových pytlích při pokojové teplotě a následně ručně oddělovány z okvětí a čištěny od chmýru a dalších nežádoucích příměsí.

2.7.1.1. Vliv elicitorů na obsah účinných látek

Část semen získaných z experimentů byla využita k přípravě extraktů a následným analýzám. Do varné baňky s plochým dnem o objemu 25 ml se navázil 1 g jemně namleté drogy ostropestřce mariánského. K droze byly přidány 2 ml vody

a směs se nechala stát. Poté bylo přidáno 46 ml směsi objemových dílů acetonu, methanolu až po rysku na varné baňce. Tato směs byla hodinu míchána pomocí ultrazvuku. Pak následovala 12ti hodinová macerace. Nakonec bylo z každého vzorku pipetou odebráno 100 μ l směsi a naředěno s 1000 μ l vody.

Extrakty vzorků byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jako mobilní fáze byla užitá směs methylycyanidu a vody s přídavkem kyseliny fosforečné. 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 silydianin.

Z vyhodnocených výsledků poloprovozního experimentu DVOŘÁKOVÉ v roce 2004 (Valtice) můžeme zjistit, že prakticky ve všech případech (až na jednu výjimku) došlo při aplikaci elicitorů ve srovnání s kontrolou, k navýšení obsahu účinných látek. Ovšem v sedmi případech aplikace elicitorů se jejich použití jeví jako neúčinné, protože při porovnání s kontrolou elicitor nezpůsobil statisticky významnou změnu koncentrace účinných látek. Naopak v osmnácti případech lze potvrdit průkazný pozitivní vliv elicitorů. V pěti případech vedlo použití elicitorů dokonce k 40ti % navýšení koncentrace účinných látek.

V maloparcelovém experimentu provedeném v roce 2004 (Benešov) byl aplikován elicitor ASA ve třech různých koncentracích. Po aplikaci ASA v nízké koncentraci došlo oproti kontrole k nepatrnému poklesu účinných látek o necelá 3 %, po aplikaci střední koncentrace ASA se hladina účinných látek mírně zvýšila (přibližně na 8 %) a po aplikaci vysoké koncentrace ASA došlo opět k poklesu obsahu účinných látek – naměřené hodnoty byly o 15 % nižší než hodnoty prokázané u kontroly. Posouzení hodnot ukázalo ve všech případech statistickou neprůkaznost výsledků (pouze 4 opakování). Aplikace elicitoru ASA ve třech různých koncentracích se jeví po statistickém vyhodnocení jako neúčinná.

Z výsledků experimentu provedeným v roce 2005 bylo zjištěno, že aplikací elicitoru (ASA) nízké koncentrace došlo k nepatrnému snížení obsahu účinných látek (o necelé 0,5 %). Tento výsledek je srovnatelný s hodnotou získanou z roku 2004 – nebyla prokázána žádná změna. Aplikace elicitoru střední koncentrace (ASA) již však oproti kontrole způsobila významnější nárůst obsahu účinných látek, a to přibližně o 22,5 %. V porovnání s předešlým rokem je to 15-ti % nárůst hodnot. Po aplikaci vysoké koncentrace ASA došlo téměř k 43 % poklesu obsahu účinných látek. Tento pokles byl prokázán i v předešlém roce.

Při celkovém zhodnocení poloprovozního experimentu uskutečněném v roce 2005 byly po aplikacích elicitoru ASA zjištěny menší i výraznější poklesy nebo naopak navýšení hodnot obsahů účinných látek. Statistická průkaznost dat na 5-ti % hladině významnosti dvouvýběrovým t-testem s nerovností rozptylů však nebyla prokázána ani v případě vysoké koncentrace elicitoru ASA, kde došlo oproti kontrole k nežádoucímu cca 43 % poklesu obsahu účinných látek. Tuto statistickou neprůkaznost lze odůvodnit velkou rozdílností hodnot, kterou vykazují jednotlivé analyzované vzorky semen z parcel ošetřených shodnými koncentracemi elicitoru.

Při výnosech z 1 m² a při zachování stejné hustoty rostlin lze stanovit teoretický maximální hektarový výnos v rozmezí 3,8 – 6,3 t. Při velkoplošném pěstování je ovšem ruční způsob sklizně s minimálními ztrátami nereálný. V praxi je uváděn výnos 0,8 – 1,2 t.ha⁻¹.

V roce 2005 došlo u maloparcelového experimentu k navýšení parcel. V důsledku častých srážek a méně příznivého počasí v letních měsících dosahoval výnos semen v porovnání s rokem předešlým nižších hodnot. Podstatné množství semen v poupatech zplesnivělo. Došlo také k nižší výtěžnosti obsahu účinných látek – ve srovnání s rokem 2004 pokles o 20 000 µg.g⁻¹. Z výnosů dosažených na 1 m² lze stanovit teoretický maximální výnos na hektar v rozmezí 4,6 – 4,9 t.

2.7.1.2. TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ OSTROPESTRŤCE MARIÁNSKÉHO

DVOŘÁKOVÁ (2006) ve své práci dále uvádí, že se názory na pěstování a optimální agrotechniku v odborné literatuře i ve srovnatelných podmínkách u mnoha autorů různí. Návrh technologie pěstování je jedním z několika možných řešení, vyhovující především podmínkám pěstování v České republice. Metodiku pěstování ovlivňuje několik faktorů – pěstební podmínky, ale i způsob hospodaření a finanční možnosti pěstitele.

Agroekologické podmínky pěstování jsou velmi důležité. Ostropestřec mariánský je na půdní podmínky relativně adaptabilní. Široké klimatické podmínky ČR zkoumané plodině vyhovují. Výhodnější je setí rostliny do hlubších hlinitých půd s velmi dobrou zásobou živin, především v řepařské nebo obilnářské zemědělské výrobní oblasti. Práce na půdě by měli začít včasnou a kvalitní podmínkou po sklizené předplodině. Následovat bude hluboká orba (0,25 – 0,30 m). Pokud je to možné, zapraví se tím k rostlině organické hnojení. Hnůj má pozitivní účinky na růst

kultury a pomáhá ke stabilizaci úrody. Pro podmínky ČR je některými autory doporučeno aplikovat na podzim na 1 hektar asi 200 kg NPK. Toto hnojivo udržuje půdu v dobrém výživném stavu. Jiní autoři ovšem tvrdí, že těmito živinami rostlinu nehnojíme, nýbrž usilujeme o vytvoření trvalé optimální hladiny živin v půdě. Výsledky z experimentů různých autorů potvrzují, že podstatně větší vliv na výnos plodů ostropestřce než běžné půdní podmínky a hnojení, má množství srážek během kritického období. Na základě těchto údajů se lze domnívat, že je možno ostropestřec mariánský úspěšně pěstovat intenzivním i extenzivním způsobem.

Při intenzivním způsobu pěstování se při předset'ové přípravě zapravují do půdy průmyslová hnojiva. Spolu s herbicidy a dalšími agrotechnickými zásahy musí být hnojení průmyslovými hnojivy pečlivě voleno a registrováno z důvodu sklizně kvalitní drogy. Na jaře se aplikují především dusíkatá hnojiva. Pro jarní produkční přihnojování je vhodné aplikovat dusičnan amonný. Doporučuje se zapravovat do půdy. Doporučená dávka pro ostropestřec je 150 – 200 kg.ha⁻¹. Pro hubení plevelů v ostropestřci je nejvhodnější použití přípravků na bázi účinné látky trifluralinu (Synfloran 48 EC – doporučená dávka pro ostropestřec je 1,5 l.ha⁻¹, dále Treflan 48 EC a Triflurex 48 EC).

U extenzivního způsobu pěstování ostropestřce mariánského jsou při jarní předset'ové přípravě veškeré aplikace průmyslových hnojiv a chemických prostředků proti plevelům vynechány.

Nejvhodnější termín setí se jeví agrotechnická lhůta mezi 15. – 25. dubnem. Včasný výsev je nejúčinnější ochranou před chorobami a zajistí dostatek vláhy pro počáteční vývoj rostlin. Výsev se provádí secím strojem do širokých řádků. Spon je v rozmezí 0,30 x 0,30 m až 0,40 x 0,40 m. Na 1 m² připadá 6 – 12 ks rostlin (60 – 120 tisíc na 1 hektar). Množství výsevu se pohybuje mezi 5 – 8 kg.ha⁻¹. Hloubka výsevu je 2 – 3 cm.

Během vegetace se porost ostropestřce při intenzivním způsobu pěstování ošetřuje hlavně dusíkatými hnojivy a postřiky proti plevelům. Při aplikaci hnojiva před setím se tento proces zpravidla již neopakuje. Mechanická kultivace meziřádků je ve velkoplošných podmínkách hůře proveditelná, proto je využívána především herbicidní ochrana. Jsou vhodné kombinace Synfloranu 48 EC s přípravkem Alafon 45 SC (přijímaný rostlinami přes kořeny a listy). Je vhodné přípravek aplikovat ihned po zasetí v dávce 1 l.ha⁻¹. K hubení jednoděložných jednoletých a vytrvalých plevelů lze použít Agil 100 EC v dávce 1,2 l.ha⁻¹.

Ostropestřec má dobrou konkurenční schopnost vůči plevelům a proto se může pěstovat i extenzívním způsobem. Pro ničení plevelů je zde využívána mechanická kultivace, při silném zaplevelení je vhodné plečkování. Při vytvoření souvislého porostu je růst jednoletých plevelů prakticky vyloučen.

Sklizet limituje výnos i kvalitu drogy. Komplikací je zde nerovnoměrné dozrávání semen. Obsah účinných látek a biologická hodnota závisí právě na stupni zralosti semen. V omezených případech lze před sklizní při intenzívním způsobu pěstování využít desikaci. Toto je ovšem pro extenzívní pěstování vyloučeno. Pro sklizeň se používá stejná technika jako u obilovin. Na malých pozemcích je možné využití motorového vysavače.

2.7.1.3. EKONOMICKÉ ZHODNOCENÍ NAVRHOVANÉ TECHNOLOGIE

Podle DVOŘÁKOVÉ (2006) rozsah pěstování rostlin ostropestřce v provozních podmínkách závisí na odbytových možnostech a především na nákupních cenách rostlin vykupovaných od pěstitelů. Ekonomické výsledky výroby jsou závislé na vztahu nabídky a poptávky. Pro pěstitele jsou to faktory: pěstitelská plocha, hektarový výnos a požadovaná kvalita produktu, dále jsou to náklady na hektar a zisk z hektaru nebo jedné tuny.

Rostou ceny hnojiv, přípravků na ochranu rostlin, pohonných hmot, energie, musí se přihlídnout na pořizování nových strojů a technologií, stejně tak na odvody daní a jiných poplatků. Proto se pěstitelé snaží regulovat provozní náklady na plochu hektaru snížením použití hnojiv a chemických přípravků, případně spojováním nebo vypouštěním pracovních operací. Pro pěstování ostropestřce je možné od státu získat podporu ve formě různých dotací.

V 80. letech byl uváděn průměrný výnos ostropestřce $0,75 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, při optimálních podmínkách i přes $1,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Náklady na 1 hektar kultury se odhadovaly na 5 – 7 tisíc korun. Při ceně 21 Kč za 1 kg drogy I. jakosti a průměrném výnosu činil zisk asi 10 tisíc Kč $\cdot\text{ha}^{-1}$. Výnos ostropestřce $0,4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ se dá srovnat se ziskem z výnosu $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ pšenice nebo ječmene.

Pro podporu pěstování léčivých rostlin poskytuje dotační politika Mze ČR prostředky z:

- Přímé platby – platby na plochu; „top-up“ národní doplňkové platby
- Operačního programu „Rozvoj multifunkčního zemědělství“
- Programu HRDP (Horizontální plán rozvoje venkova)
- Národní podpory „state-aid“
- Podpůrného a garančního rolnického a lesnického fondu (PGRLF)

DVOŘÁKOVÁ (2006) provedla ekonomické zhodnocení navrhované technologie pěstování ostropestřce mariánského, které bylo provedeno na základě normativů jednotlivých pracovních operací (Normativy pro zemědělskou a potravinářskou výrobu vydané Mze ČR v roce 2003).

V úvahu připadala teorie, že by se pěstováním ostropestřce zabýval intenzivně hospodařící zemědělský subjekt, který vlastní veškerou technickou základnu na ploše na ploše přibližně 1 až 5 ha. Podle DVOŘÁKOVÉ byly náklady na pracovní operace během pěstování ostropestřce mariánského vyčísleny na 5 685,- Kč. Náklady na osivo a hnojivo byly celkem 1 432,- Kč a náklady na herbicidy celkem 2 057,- Kč. Celkové náklady na pěstování ostropestřce mariánského při intenzivním způsobu hospodaření činí 9 174,- Kč.ha⁻¹. Průměrný výnos při velkoplošném pěstování se pohybuje v rozmezí 0,8 až 1,2 t.ha⁻¹. Výkupní cena byla udávána ve výši 24 Kč na 1kg drogy. Při průměrném hektarovém výnosu 1 t byla tržba z prodeje semen 24 000,- Kč z 1 ha. V roce 2005 bylo možno uplatnit nárok na poskytované dotace na plochu (SAPS) ve výši 2 110,70 Kč.ha⁻¹. Bylo tedy možno získat celkem 26 110 Kč,- z 1 ha. Po odečtení nákladů, vyplývajících z intenzivního způsobu pěstování plodiny, od předpokládaných výnosů z prodeje semen a poskytnuté podpory od státu může zisk činit 16 936,- Kč.ha⁻¹. Při ploše o velikosti 5 ha by zisk činil částku 84 680,- Kč.

V případě extenzivního způsobu pěstování odpadají na náklady na průmyslová hnojiva a herbicidy. A rovněž je možné získat podporu od státu. Je nutné ovšem uvažovat o navýšení částky nákladů za agrotechnická opatření zaměřená na mechanickou regulaci plevelů. V důsledku aplikace hnoje dojde rovněž k navýšení nákladů. Náklady na pracovní operace během pěstování extenzivním způsobem byly 6 960,- Kč.ha⁻¹. Náklady na osivo a hnůj byly 4 184,- Kč.ha⁻¹. Celkové náklady na pěstování extenzivním způsobem v rámci ekologického

hospodaření byly 11 144,- Kč.ha⁻¹. Průměrný výnos se při extenzivním způsobu hospodaření pohybuje ve stejných hodnotách jako při intenzivním způsobu hospodaření. Tržba z prodeje semen při výnosu jedné tuny z hektaru bude také 24 000,- Kč.ha⁻¹. Dotace na plochu (SAPS) byla 2 110,70 Kč a v rámci agroenvironmentálních opatření Horizontálního plánu rozvoje venkova bylo možné uplatnit nárok na dotaci na ekologicky obhospodařovanou ornou půdu, která byla 3 520 Kč.ha⁻¹. Celkové výnosy z hektaru by dosahovaly celkem 29 631,- Kč. Po odečtení nákladů od předpokládaných výnosů z prodeje semen a poskytnutých dotací mohlo být dosaženo zisku ve výši 18 487,- Kč.ha⁻¹. Z pěti hektarů obhospodařovaných extenzivním a zároveň ekologickým způsobem by zisk činil 92 435,- Kč. V případě, že by při extenzivním způsobu pěstování bylo vynecháno organické hnojení, které se v praxi většinou nevyužívá, mohl by být zisk z hektaru až o 5 200,- Kč vyšší a dosahoval by celkem 23 687,- Kč.ha⁻¹.

3. ZÁVĚR

Z provedených výzkumů je zřejmé, že výnos plodů ostropestřce mariánského závisí především na povětrnostních podmínkách. Datum setby neovlivní výnos nažek, ale dvojitá dávka osiva zvýší výnos.

Rozsah kolísání složky silymarinu v plodech je také závislý na změnách v podmínkách pěstování a na termínech setí. Dvoutýdenním zpožděním termínu pro výsev se obsah silymarinu zvýšil o 0,4% a výnos o 5,3 kg.ha⁻¹. Obsah oleje v plodech závisí na povětrnostních podmínkách a rozdíl mezi rokem, kdy průměrná denní teplota vzduchu v průběhu posledního měsíce (července) pěstování ostropestřce mariánského byla 16,6°C a rokem , kdy příslušná teplota byla 22,4°C činil 45g. Teplota vzduchu změnila celkový obsah bílkovin jen velmi málo, ale ukázalo se, že v pozdějším termínu setby byl obsah bílkovin v celkovém objemu plodů ostropestřce mariánského významně vyšší.

I přes různé vlhkostní a tepelné podmínky, byly zjištěny některé významné korelace. Následující negativní korelace byla pozorována:

- a) mezi obsahem silymarinu a výnosem plodů,
- b) mezi obsahem silymarinu a hmotností 1000 zrn,
- c) mezi obsahem silymarinu a podílem hmotnosti oplodí nažky.

Nicméně, pozitivní je korelace mezi olejem, bílkovin a obsahem silymarinu.

Ostropestřec mariánský se dokonale přizpůsobí různým podmínkám mírného podnebí. Roste dobře a má dobrý výnos na různých typech půdy, včetně lehkých půd. Ostropestřec mariánský velmi silně reaguje na tepelně-vlhkostní podmínky. Rozdíly ve výnosech plodů mezi sledovanými roky mohou být až desetinásobné. Jak vodní přebytek tak její deficit také zabrání hromadění silymarinu. V ostropestřci mariánském se hromadí nejvíce flavonolignanů při vlhkosti půdy 60 - 65% plné vodní kapacity.

Z pohledu zvýšení ekonomické efektivity pěstování Ostropestřce mariánského je kritickou operací způsob jeho pěstování. Jako ideální variantu navrhuji maloplošný intenzivní způsob pěstování s ruční sklizní semen speciálním vysavačem ve fázi optimální zralosti.

4. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

ADAMS, M., 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, S., BARINOV, V. *Lékárna na dosah ruky*. 1990. 189 s. ISBN 80-7022-059-7.

ANDRZEJEWSKÁ, J., et al. *Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate*. Ind. Crops Prod. 2010, doi:10.1016/j.indcrop.2010.10.027.

ARNDT, T. *Silymarin* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www.o-zdravi.cz/clanky/tisk/?id=1241>

BARANYK, P., et al. *Olejnatost vybraných druhů alternativních olejnin*. Rostlinná výroba, 1995, roč. 41, č. 9, s. 433-438. ISSN 0370-663X.

BERÁNKOVÁ, J. *Ostropěstřec mariánský – nadějný lék na rakovinu* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=118&ch=1&typ=1&val=89914>.

BRANŽOVSKÝ, I. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny – příležitost pro zemědělce*. Úroda, 2007, roč. 55, č. 8, s. 43-45. ISSN 0139-6013.

BRANŽOVSKÝ, I., et al. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny*. Ministerstvo zemědělství, Situační a výhledová zpráva. 2010, 49 s. ISBN 978-80-7084-908-8.

BUCHTOVÁ, I., DRAŠNAROVÁ, Z. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny: Situační a výhledová zpráva*. MZe ČR, 2003. ISBN 80-7084-199-8. Dostupný z WWW: <www.mze.cz/attachments/LAKR_04_03.PDF>.

DRBAL, K., KRÍŽEK, M. *Analytická chemie*. 1999. 185 s. ISBN 80-7040-352-7.

DRAŠNAROVÁ, Z. *O léčivých, aromatických a kořeninových rostlinách v ČR*. Úroda. 2005, roč. 53, č. 3, s. 54-55. ISSN 0139-6013.

DVOŘÁKOVÁ, J. *Studium vlivu elicitorů na obsah některých účinných látek v rostlině Ostropěstřec mariánský - *Silybum marianum* (L.) Gaertn.* Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra obecné produkce rostlinné. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel CSc. 2006, 72 s.

GAŽÁK, R., SEDMERA, P., KŘEN, V. *Antiradikálová aktivita flavonolignanů silybinu a 2,3 - Dehydrosilybinu – studium mechanismu a syntéza nových derivátů*. Chemické listy. 2008, č. 102, s. 634. ISSN 1213-7103.

- GAŽÁK, R., et al.** *Nové přístupy k získání opticky čistých stereoisomerů silybinu a 2,3-dehydrosilybinu.* Chemické listy. 2010, č. 104, s. 539. ISSN 1213-7103.
- GRAMANOVÁ, H.** *Technologie pěstování Ostropestřce mariánského Silybum marianum ve vztahu ke kvalitě produktu a jeho zpracování.* Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra agroekologie. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel CSc. 2006, 59 s.
- HABÁN, N., OTEPKA, P.** *Production and quality of milk thistle (Silybum marianum [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion.* Horticultural Science. 2009, roč. 36, č. 2, s. 69-74. ISSN 0862-867X.
- HALBERSTEIN, R., A.** *Historical and Cross-Cultural Usage Patterns.* Annals of Epidemiology. Medicinal Plants. 2005, vol. 15, no. 9, s. 686-699.
- HARMATHA, J.** *Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů.* Chemické listy. 2005, č. 99, str. 622-632. ISSN 1213-7103.
- HONSOVÁ, H.** *Léčivé rostliny nám pomáhají.* Agromagazín. 2010, č. 14, s. 6-7.
- Silybum marianum – ostropestřec mariánský** [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K595.php>
- HUSÁKOVÁ, M.** *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny v ČR.* Zahradnictví. 2009, č. 5, s. 42-43. ISSN 1213-7596.
- HUSÁKOVÁ, J., LHOTSKÁ, M.** *Ostropestřec mariánský - okrasná a léčivá rostlina.* Živa: časopis pro biologickou práci. 1981, roč. 28, č. 4. ISSN 0044-4812. s. 133.
- Chromatografie** [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc >.
- 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.
- JANÁK, J.** *Zamyšlení nad chromatografií.* Chemické listy. 2011, č. 105, s. 292-293. ISSN 1213-7103.
- JANČA, J., ZENTRICH, J., A.** *Herbář léčivých rostlin.* 5. díl. 1997. 216 s. ISBN 80-85876-32-9.
- JANČOVÁ, P., et al.** *Metabolické přeměny silybinu.* Chemické listy. 2008, č. 102, s. 633-634. ISSN 1213-7103.
- JAROŠ, Z.** *Léčivé látky z rostlin.* Dona. 1992. 79 s. ISBN 80-85463-04-0.

- JEGOROV, A.** *Falvanolignany - novověká chemie léčivé rostliny známé již před Kristem*. Chemické listy. 1996, č. 90, s. 859-862. ISSN 1213-7103.
- KLEČKOVÁ, J.** *Konference LAKR tentokrát v Suchdole*. Zahradnictví. 2011, č. 1, s. 28 – 29. ISSN 1213-7596.
- KOCOURKOVÁ, B., RŮŽIČKOVÁ, G., PŘIBYLOVÁ, Z.** *Stav pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (LAKR) v České republice*. Sborník ze „XVI. Semináře s mezinárodní účastí, 25.-26.11.2010. 2010.
- KOPŘIVA, Z.** *Leuzea saflorová (Leuzea carthamoides) jako alternativní rostlina*. 2002. 67 s. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Stanislav Kužel CSc.
- KOUDELA, M.** *Ostropestřec mariánský*. Zahrádkář. 2009, č. 9, str. 23.
- KŘEN, V., et al.** *Silybin a silymarin – nové možnosti aplikace v biomedicíně aneb starého psa lze (někdy) naučit i novým kouskům*. Chemické listy. 2006, č. 100, s. 566-567. ISSN 1213-7103.
- KUBÍNEK, J.** *Ostropestřec mariánský – metodika pěstování*. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR. 1987, 21 s.
- MAJEROVÁ, I.** *Ostropestřec mariánský* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www.floranazahrade.cz/zdravi/ostrestrec/htm>.
- MAREČKOVÁ, M.** *Vliv elicitorů obranné reakce na hladinu fytohormonů*. 2007, 66 s. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. Vedoucí diplomové práce Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.
- MIKEŠOVÁ, I., LUTOVSKÁ, M.** *Léčivé rostliny*. 2004, 233 s. ISBN: 80-86569-68-3.
- MIKULA, P.** *Zavlečené rostliny – sklízíme, co jsme zaseli* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz>.
- MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ.** *Zemědělství 2009*. isbn 978-80-7084-924-8.
- MOUDRÝ, J.** *Ostropestřec mariánský (Silybum marianum)* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/database/index.php?n1=1&n2=3&n3=0&n4=0&poloha=1>
- MUŠKA, F.** *Ochrana léčivých rostlin proti škůdcům a chorobám v ČR*. Agromanuál. 2007, č. 3, s. 51. ISSN 1801-7673.
- NOVÁKOVÁ, V.** *Kyselina acetylsalicylová*. 2011, 61 s. Vysoká odborná škola MILLS, s.r.o. Čelákovice. Vedoucí absolventské práce PharmDr. et Mgr. Helena Kutilová.

NEUBAUER, Š., KLIMEŠ, K., ČERNÁ, L. *Léčivé rostliny: Pěstování léčivých rostlin na malých plochách*. 1. díl, 1984. 153 s.

OMER, E., 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, E., 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.

OMER, E., 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, E., 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.

OPLETAL, L., VOLÁK, J. *Rostliny pro zdraví*. 1999, 175 s. ISBN 80-7151-074-2.

Ostropestřec mariánský [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://www.beltina.cz/bylinka/ostropestrec-mariansky/>

PROŠKOVÁ, J. *Léčivé, aromatické a kořeninové rostliny*. Farmář, 2008, č. 3, s. 30-31.

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

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

SCHNEEDORFEROVÁ, I. *Analýza mastných kyselin v diglyceridech a triglyceridech tělních tekutin pomocí plynové chromatografie*. 2009, 74 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, Katedra laboratorních metod a zdravotnické techniky. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Aleš Tomčala.

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

SCHUSTER, R., M. *The Hepaticae and Anthocerotae of North America east of the hundredth meridian*. 1992, 854 s. ISBN 0-914-86820-9.

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

SLANINA, J. *Biologická a farmakologická aktivita ligninů*. Chemické listy. 2000, č. 94, s. 111-116. ISSN 1213-7103.

SPILKOVÁ, J. *Kontrola kvality rostlinných drog*. Sborník ze „XVI. Semináře s mezinárodní účastí, 25.-26.11.2010, 2010.

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

SPITZOVÁ, I. *Vliv desikantů na biologickou hodnotu semen a kvalitu drogy ostropestřce mariánského (Silybum marianum /L./ Gaertn.)*. Zahradnictví. 1994, roč. 21, č. 2, s. 93-101. ISSN 0862-867X.

SPITZOVÁ, I. *Ostropestřec mariánský – staronová léčivá rostlina*. Úroda. 1997, č. 8, s. 28 – 29.

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

SUKOVÁ, I. *Zamítnutá tvrzení o probiotiku Synbio a podpůrném přípravku při kojení – Silymarin BIO-C* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Dostupný z WWW: <http://agronavigator.cz>.

TŮMOVÁ, L., GALLOVÁ, K. *Terapeutické účinky Silybum marianum* [online]. 2012 [cit. 2012-09-02]. Praktické lékárenství. 2006, č. 4, s. 185-187.

TŮMOVÁ, L., TŮMA, J. *Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře Silybum marianum přidávkem elicitoru Paraquat*. Chemické listy, 2009, č. 103, s. 503-510. ISSN 1213-7103.

VÁŇA, P. *Rady bylináře Pavla: přírodní léčba bylinami a životním magnetismem*, 1991. 119 s. ISBN 80-900298-0-9.

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

VOSTÁLOVÁ, J. *Nové biologické aktivity silymarinu a jeho obsahových složek*. Chemické listy. 2008, č. 102, s. 632-633. ISSN 1213-7103.

WALTEROVÁ, D., KŘEN, V. *Chemie a biologická aktivita flavonolignanů ze Silybum marianum*. Chemické Listy. 2000, č. 94, s. 1036. ISSN 1213-7103.

Rámcová metodika 2. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o. 2003.

5. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT

Obr. č. 1: Strukturní typy a formy lignanů	10
Obr. č. 2: Vývoj sklizňových ploch a produkce léčivých rostlin v ČR.	17
Obr. č. 3: Výnos léčivých rostlin v ČR.	18
Obr. č. 4: Vývoj sklizňových ploch a produkce kořeninových a aromatických rostlin v ČR.	18
Obr. č. 5: Výnos kořeninových a aromatických rostlin v ČR.	18
Obr. č. 6: Sklizňová plocha ostropestřce mariánského v ČR.	19
Obr. č. 7: Výnos ostropestřce mariánského v ČR.	19
Obr. č. 8: Chemická struktura hlavních složek silymarinového komplexu	37
Obr. č. 9: Ukázka chromatogramu	45
Obr. č. 10: Schématický náčrt kapalinového chromatografu	45
Obr. č. 11: Blokové schéma plynového chromatografu	48
Obr. č. 12: Schéma plamenového ionizačního detektoru	50
Obr. č. 13: Kyselina acetylsalicylová	52
Obr. č. 14: Prostorový model molekuly kyseliny acetylsalicylové	52
Obr. č. 15: Vzorec salicinu, glykosidu izolovaného z vrby bílé	53
Obr. č. 16: Mechanismus herbicidního účinku methylviologenu	58
Tab. č. 1: Vývoj ploch a produkce rostlin skupiny LAKR v ČR.	17
Tab. č. 2: Přehled o pěstování ostropestřce mariánského v ČR.	19
Tab. č. 3: Hustoty osazení rostlin, výnosové prvky, výnos a chemické složení plodů ostropestřce.	27
Tab. č. 4: Energetická výtěžnost fytohmoty z ostropestřce mariánského.	32
Tab. č. 5: Obsah taxifolinu a flavonolignanů v plodech ostropestřce v závislosti na daném výzkumném roku a termínu setby.	39
Tab. č. 6: Poměry flavonolignanů v závislosti na termínu pro výsev a výzkumných let.	39
Tab. č. 7: Principy a metody chromatografie a analogických technik.	43
Tab. č. 8: Základní a realizační typy chromatografické separace	43
Tab. č. 9: Dělení chromatografických metod podle druhu skupenství mobilní a stacionární fáze.	44

Schéma č. 1: Kolbeho-Schmittova syntéza.	55
Schéma č. 2: Vznik kyseliny acetylsalicylové z kyseliny salicylové	55

6. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Fotodokumentace

Poloprovozní experiment 2004, Valtice - Seva Flora, s. r. o.



první aplikace elicitorů; 8. 6. 2004



druhá aplikace elicitorů; 28. 6. 2004



stav porostu 28. 6. 2004



stav porostu 18. 7. 2004



vyzrálá semena; 18. 7. 2004 motorový vysavač Partner - Tornádo BW 25

Maloparcelkový experiment 2005



založení experimentu; 29. 4. 2005



stav porostu 28.5.2005



fáze přizemní růžice; 1. 6. 2005



stav porostu 21.6.2005



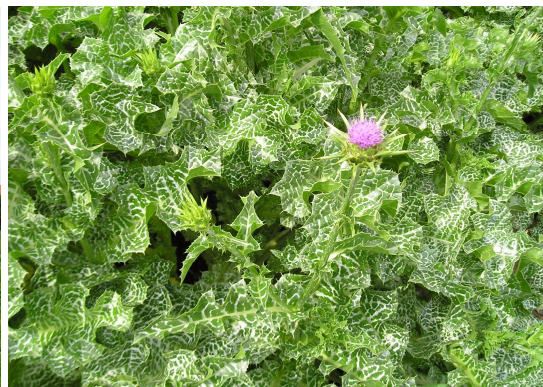
první aplikace elicitoru; 21. 6. 2005



fáze porostu 21. 6. 2005



druhá aplikace elicitorů; 11. 7. 2005



stav porostu 11. 7. 2005



detail květu



stav porostu 25. 7. 2005



třetí aplikace elicitorů; 1. 8. 2005



fáze zralosti; 6. 8. 2005