

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

2014

Ing. Iveta Marešová

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra aplikované chemie

Doktorská disertační práce

Biomasa jako zdroj lignanů a studium jejich distribuce

Ing. Iveta Marešová

Školitel: prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice

2014

Experimentální část předkládané disertační práce byla realizována na těchto pracovištích:
Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích,
Laboratoř metabolomiky a izotopových analýz, Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Brno, pracoviště České Budějovice,
Laboratory of Wood and Paper Chemistry, Process Chemistry Centre, Åbo Akademi University, Turku, Finsko.

Disertační práce vznikla za finanční podpory výzkumného grantu MŠMT COST LD11016, projektu CzechGlobe Reg. No. CZ.1.05/1.1.00/02.0073 a projektu NAZV QJ1210258.

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Janu Třískovi, CSc., za trpělivost, odborné rady a pomoc během celého doktorského studia. Ráda bych poděkovala všem pracovníkům Laboratoře metabolomiky a izotopových analýz v Českých Budějovicích, kteří mi poskytli zázemí a odbornou pomoc při řešení disertační práce. Děkuji Ing. Martinu Moosovi, PhD. za pomoc při přípravách vzorků a jejich vyhodnocení. Děkuji doc. Ing. Janě Pexové-Kalinové, PhD. za vedení polních pokusů. Poděkování patří pracovníkům Lesní správy Lesů ČR, s. p. v Hluboké nad Vltavou za poskytnutí vzorků dřevin. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Výzkumného ústavu Potravinářského v Praze za poskytnutí vzorků suků ze smrkového dřeva.

Děkuji kolegům z Laboratoře chemie dřeva a papíru Univerzity Åbo Akademi ve Finsku, doc. Annice I. Smeds, PhD., prof. Stefanu M. Willförovi, PhD. a doc. Patriku C. Eklundovi, PhD. za poskytnutí zázemí a odbornou pomoc při izolačních postupech a identifikaci lignanů.

Ráda bych poděkovala prof. Ing. Pavlu Kalačovi, CSc. za ochotu, vstřícnost a pomoc během celého doktorského studia. Poděkování patří také ostatním pracovníkům Katedry aplikované chemie za jejich nápomoc během studia. Také bych ráda poděkovala prof. Ing. Ladislavu Kolářovi, DrSc. a kolegům z Katedry zootechnických a veterinárních disciplín a kvality produktů za vstřícnost a podporu během doktorského studia.

Můj velký dík patří mé rodině, blízkým a manželovi Hojikovi za neutuchající podporu, pomoc, trpělivost a lásku.

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství.

V Českých Budějovicích, dne 12. května 2014

.....

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývala studiem distribuce lignanů v biomase dřevin, zejména smrku ztepilém, v biomase vybraných druhů obilovin a pseudocereálií a v odpadních zemědělských produktech (matoliny, semena bobulí révy vinné). Důležitou součástí práce byl vývoj a optimalizace metod pro přípravu, zpracování a vlastní analýzu vybraných vzorků. Dílčím cílem práce byla identifikace lignanů ve vodním ekosystému.

V rámci studie byly identifikovány neznámé lignany, izolované ze suků smrku ztepilého. Jednalo se o 7*S*-todolaktol A, 7*R*-todolaktol A, dva stereoisomery 9'-hydroxylariciresinolu, 7*S*-isoliovil a 7*R*-isoliovil. Identifikace těchto lignanů byla provedena pomocí metody GC-MS a jejich struktura byla potvrzena využitím techniky NMR. V extraktu suku bylo detekováno několik desítek dalších neznámých lignanů, přičemž tyto lignany tvořily přibližně 6 % sušiny extraktu.

Z hlediska distribuce lignanů, sledované v biomase tří odrůd pohanky seté, pohanky tatarské, čtyř odrůd prosa setého a amarantu, sklizených v letech 2011 a 2012, bylo zjištěno, že nejvíce zásobenou částí jsou kořeny pohanky a dále prosa. V kořenech pohanky tatarské byl zjištěn nejvyšší obsah lignanů 2 500 mg.kg⁻¹ s dominantním lignanem hydroxymatairesinolem (HMR). Významný obsah lignanů byl dále nalezen ve stoncích a slupkách nažek/obílek jak pohanky, tak prosa. Obsah lignanů v celých nažkách/obílkách tvořil pouze 3 % z celkového obsahu lignanů. Mezi jednotlivými analyzovanými částmi rostlin byly zaznamenány významné rozdíly v obsahu lignanů, zatímco mezi odrůdami jak pohanky seté, tak prosa setého nebyly zjištěny výrazné rozdíly v obsahu lignanů v obou sledovaných letech. Nejvíce lignanů z odrůd pohanky seté obsahovala odrůda Jana v roce 2011 (1173 mg.kg⁻¹) a u prosa odrůda Unikum také v roce 2011 (616 mg.kg⁻¹). V pohance pak vedle HMR dominovaly především lignany syringaresinol (SYR), cyklolariciresinol (CLAR) a derivát oxomatairesinolu (dOMR) a v prosu vedle dOMR a SYR, lariciresinol (LAR).

Tato studie je svého druhu první, která přináší poznaky o distribuci lignanů v biomase obilovin a pseudocereálií. Dosažené výsledky ukazují, že vedlejší produkty získané při zpracování těchto plodin mohou najít širší využití v potravinářském případně farmaceutickém průmyslu nebo jako technické produkty.

Klíčová slova: lignany, distribuce, pohanka, prosa, odrůdy, biomasa, sukové dřevo, smrk ztepilý, hydroxymatairesinol, syringaresinol, hydroxylariciresinol, LC-MS, GC-MS, NMR

ABSTRACT

Presented thesis was focused on study of distribution of lignans in wood biomass, especially in Norway spruce, different varieties of cereals and pseudocereals, and in agricultural waste materials (marc, grape seeds). The method development and optimization of sample preparation and analysis was important part of the work. Further aim of the work was identification of lignans in water ecosystem.

Part of the study was focused on identification of unknown lignans isolated from Norway spruce knotwood. Lignans *7S*-todolactol A, *7R*-todolactol A, two stereoisomers of 9'-hydroxylariciresinol, *7S*-isoliovil and *7R*-isoliovil were identified by GC-MS, and their structures were confirmed by NMR. There were detected several tens of other unidentified lignans in knotwood extract, accounting altogether for approximately 6 % of the dry weight of extract.

From the aspect of distribution of lignans, which were studied in biomass of three varieties of common buckwheat, tartary buckwheat, four varieties of millet and amaranthus, harvested in 2011 and 2012, it was found that the most richest part are roots of buckwheat and then millet. The highest lignan content of 2500 mg.kg⁻¹ was found in roots of tartary buckwheat with hydroxymatairesinol (HMR) as predominant lignan. Important amount of lignans was found also in stems and hulls of both buckwheat and millet. The content of lignans in achenes/caryopsis was only 3 % from the total lignan content. The significant differences in content of lignans were recorded among all analyzed parts of plants, while there were no differences in lignans content among of buckwheat varieties and even of millet varieties. The highest lignan content from the varieties of common buckwheat was found in variety Jana in 2011 (1173 mg.kg⁻¹) and from millet in variety Unicum 616 mg.kg⁻¹ (2011). In buckwheat the other dominating lignans, except of HMR, were syringaresinol (SYR), cyclolariciresinol (CLAR) and derivative of oxomatairesinol (dOMR) and in millet beside dOMR and SYR, lariciresinol (LAR).

This study is the first report, which brings broader knowledge about distribution of lignans in biomass of cereals and pseudocereals. The results indicate, that by-products from processing of these crops may have found the potential for use in food or pharmaceutical industry or as technical products.

Keywords: lignans, distribution, buckwheat, millet, varieties, biomass, knotwood, Norway spruce, hydroxymatairesinol, syringaresinol, hydroxylariciresinol, LC-MS, GC-MS, NMR

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE.....	11
3. LIGNANY	12
3.1 Chemická struktura a biosyntéza lignanů	12
3.2 Výskyt a potenciální role lignanů v rostlinách	15
3.3 Lignany v dřevinách	15
3.3.1 Lignany ve smrku	16
3.3.2 Lignany v dalších dřevinách	21
3.4 Lignany v potravinových surovinách a potravinách.....	23
3.5 Lignany v přírodních vodách.....	25
3.6 Lignany u savců a člověka.....	25
3.7 Biologické účinky lignanů	26
3.8 Metody stanovení lignanů.....	29
4. MATERIÁL A METODIKA.....	31
4.1 Chemikálie	31
4.2 Materiál.....	32
4.2.1 Vzorky dřevin pro stanovení lignanů.....	32
4.2.2 Vzorky obilovin a pseudocereálií a podmínky jejich pěstování	33
4.2.3 Odpadní biomasa – matoliny a semena bobulí révy vinné	35
4.2.4 Vzorky přírodních vod.....	35
4.3 Metody stanovení lignanů.....	35
4.3.1 Stanovení lignanů v dřevinách.....	35
4.3.2 Izolace a identifikace neznámých lignanů v sucích smrku ztepilého	42
4.3.3 Distribuce lignanů v obilovinách a pseudocereáliích	45
4.3.4 Stanovení lignanů v matolinách a semenech bobulí révy vinné	47
4.3.5 Stanovení lignanů v přírodních vodách	49
4.4 Statistické zpracování výsledků.....	50
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	51
5.1 Stanovení lignanů v dřevinách.....	51
5.1.1 Metody extrakce lignanů – pilotní pokus	51
5.1.2 Metody extrakce lignanů	52
5.1.3 LC-MS metoda pro identifikaci a kvantifikaci lignanů v sucích smrku ztepilého	54

5.2 Izolace a identifikace neznámých lignanů v suchém smrku ztepilého	59
5.2.1 Zastoupení lignanů v různých frakcích.....	59
5.2.2 Identifikace struktury lignanů.....	65
5.3 Stanovení lignanů v obilovinách a pseudocereáliích.....	78
5.3.1 Stanovení lignanů v pohance	79
5.3.2 Stanovení lignanů v prosu.....	95
5.3.3 Souhrnný obsah lignanů v pohance a v prosu.....	108
5.3.4 Stanovení lignanů v amarantu.....	110
5.4 Stanovení lignanů v matolinách a semenech bobulí révy vinné.....	112
5.5 Stanovení lignanů v přírodních vodách	114
6. ZÁVĚRY	116
7. LITERATURA	119
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	127
9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	130

1. ÚVOD

Lignany patří do široké skupiny rostlinných fenolů, které na sebe v posledních dvou dekádách upozorňují nejen pro své četné biologické účinky, ale také svou strukturní bohatostí a druhovou rozmanitostí. Historie zájmu o lignany začíná koncem 19. století, kdy byly lignany identifikovány ve vzorcích dřevin.

Samotný název lignany byl navrhnout Haworthem v roce 1936. Jako sekundární metabolity cévnatých rostlin vynikají účinky antioxidačními, protinádorovými, antivirovými, antibakteriálními, fungicidními, insekticidními, estrogenními, antiestrogenními a v neposlední řadě i ochrannými účinky proti srdečním chorobám (Ayres a Loike, 1990). Zvýšený zájem o lignany vychází především z možnosti jejich využití ve farmacii a výživě. Některé deriváty lignanů, např. podophyllotoxinu (etoposid a teniposid – firmy Sandoz) byly úspěšně zavedeny do klinické praxe a působí v širokém spektru chemoterapie rakoviny (Harmatha, 2005). Na trhu je dále např. doplněk stravy na bázi hydroxymatairesinolu - HMRlignanTM, vedle dalších kosmetických přípravků.

Výskyt lignanů není vázán na určité rostlinné části, ale nacházejí se prakticky všude. Nejčastěji je však nalezneme v dřevě a kůře stromů, v kořenech, listech, květech, plodech a semenech rostlin. Z hlediska struktury jsou lignany tvořeny dvěma fenylpropanovými jednotkami, které jsou spojeny přes centrální (β) uhlíky obou postranních řetězců (Slanina, 2000). Tvoří tak nejčastěji dimery. Lignany se vyskytují jednak ve volné formě v podobě aglykonů zejména v dřevinách a dále pak vázané na širokou skupinu sacharidů v případě zemědělských produktů.

Lignany a další rostlinné polyfenoly se běžně vyskytují v jádrovém dřevu stromů, přičemž lignany jsou obsaženy převážně v měkkých dřevinách (jehličnany), zatímco flavonoidy v dřevinách s tvrdým jádrem. Neobvykle vysoký obsah lignanů 6-24 hm. % byl zjištěn skupinou finských vědců v sucích smrku ztepilého (*Picea abies*), jehož dominantním lignanem (70-85 %) je 7-hydroxymatairesinol (HMR). HMR společně s dalšími lignany (matairesinol (MR), sekoisolariciresinol (SEC), lariciresinol (LAR), cyklolariciresinol (CLAR), α -conidendrin (CONI)), by tak mohl být využit jako vedlejší produkt při průmyslovém zpracování dřeva (Holmbom et al., 2003).

Nejbohatším zdrojem lignanů v potravě je podle soudobých poznatků lněné a sezamové semínko. Lignany jsou hojně obsaženy v semenech lesních plodů, dále v celozrnných

obilovinách, luštěninách a jiných druzích zeleniny, v některých druzích ovoce, ořechách, ve víně (zejména červeném), čaji a kávě.

Výše uvedené a některé další rostlinné lignany jsou hydrolyzovány a metabolizovány střevní mikroflórou na enterolignany enterolakton (EL) a enterodiol (ED). Tyto enterolignany, jinak také nazývané savčí lignany, jsou přítomny v tělních tekutinách lidí a zvířat. V organismu účinkují jako fytoestrogeny a pravděpodobně působí preventivně proti vzniku některých civilizačních chorob (Slanina, 2000; Willför et al., 2006). Enterolignany byly nalezeny také v dřevinách a rostlinách a rovněž ve vodě, kde byly zaznamenány i další běžné lignany (Smeds et al., 2007b).

Distribuce lignanů v rostlinách není dosud přesně zmapována. Po objevu lignanů v jádrovém dřevu suků některých smrků byly studie zaměřeny především na distribuci lignanů v hlavních dřevinách. Pouze několik málo studií (Smeds et al. 2007, Smeds et al.; 2012) se zabývalo otázkou distribuce lignanů v potravinových surovinách, kdy byl porovnán obsah lignanů v otrubách či obalech a celých zrnech, případně v semenech a celých plodech. Informací o distribuci lignanů v biomase zemědělsky využívaných rostlin, například v kořenech, stoncích či listech obilovin a pseudocereálií, je velice málo.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem předložené disertační práce je studium distribuce lignanů v biomase dřevin, zejména smrku ztepilém, v biomase vybraných druhů obilovin a pseudocereálií, v prosu, pohance a amarantu a v odpadních zemědělských produktech.

Důležitou součástí disertační práce je vývoj a optimalizace metod pro přípravu a zpracování vzorků a jejich analýzu. Identifikace a kvantifikace lignanů bude zaměřena na analýzu hlavních lignanů, jako je hydroxymatairesinol (HMR), sekoisolariciresinol (SEC), matairesinol (MR), lariciresinol (LAR) a cyklolariciresinol (CLAR). Vedle stanovení těchto hlavních lignanů v různých matricích je dalším cílem práce identifikace minoritních lignanů pomocí moderních instrumentálních metod. Dílčím cílem práce je identifikace lignanů ve vodním ekosystému.

3. LIGNANY

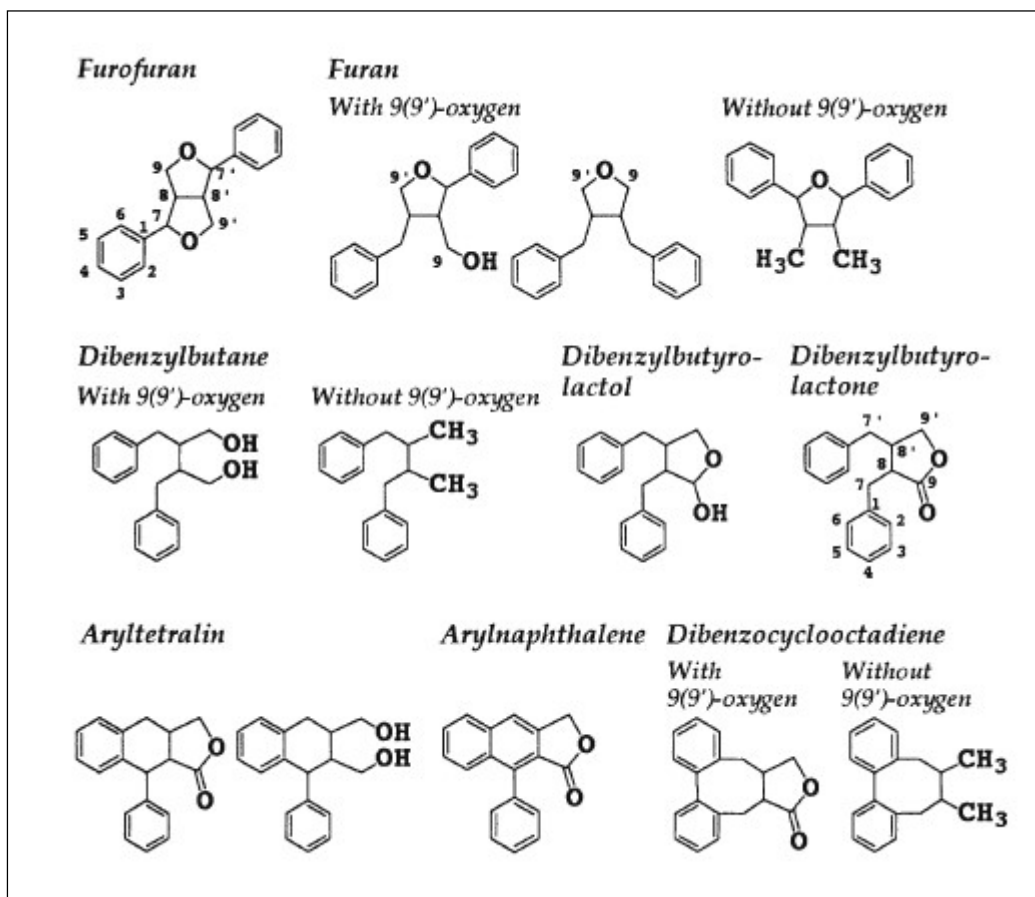
3.1 Chemická struktura a biosyntéza lignanů

Lignany tvoří významnou skupinu rostlinných fenolů, která z hlediska struktury reprezentuje bohatou a různorodou třídu látek fenylypropanoidového (C₆-C₃) původu. Lignany vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek, které jsou spojeny přes centrální uhlíky obou postranních řetězců v polohách C-8 a C-8' (*obr. 1*). (Slanina, 2000; Harmatha, 2005; Willför et al., 2006).

Strukturní variabilita lignanů se v případě jiného C-C spojení fenylypropanoidových jednotek, než je vazba přes centrální uhlíky alifatických řetězců, rozšiřuje o další příbuzné sloučeniny, především o neolignany. Další transformace dávají pak vznik norlignanům či coninoidům, které patří mezi lignanové deriváty s nižším počtem uhlíků obsahující mnohdy i konjugované dvojně vazby. Jako hybridní lignany nebo lignoidy bývají také někdy označovány flavanolignany či kumarinolignany, v nichž jedna část molekuly je tvořena fenylypropanovou jednotkou a druhá část jinou přírodní látkou (Slanina, 2000; Harmatha, 2005).

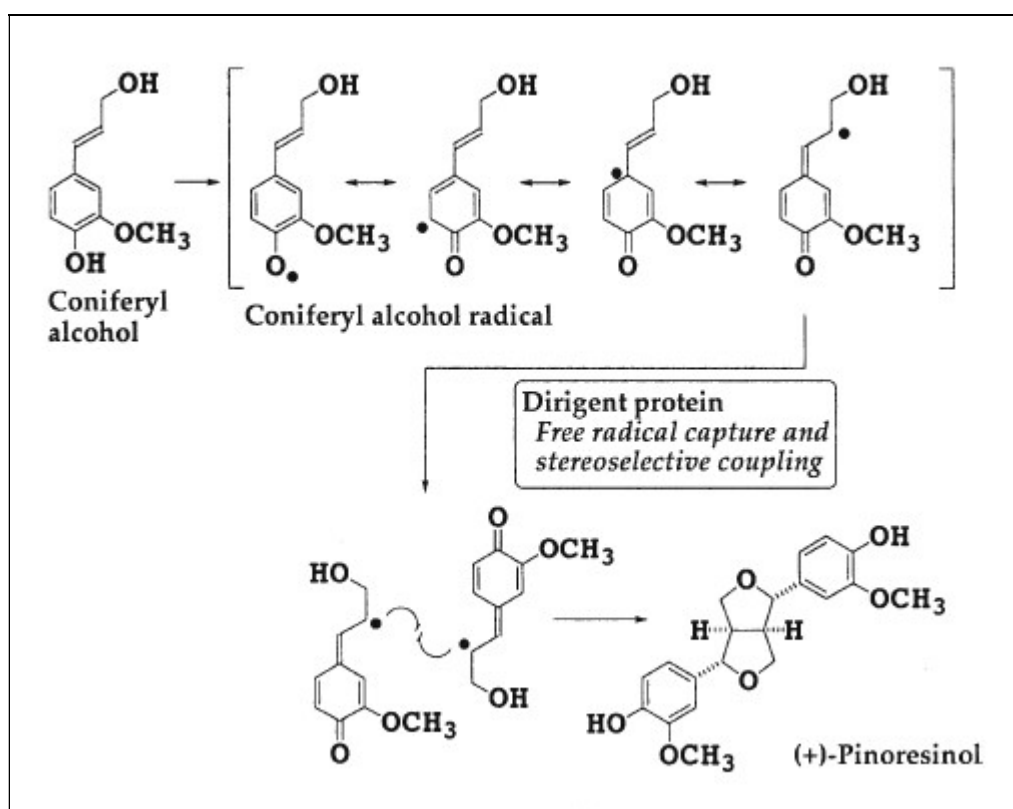
Lignany mohou být tvořeny třemi a čtyřmi fenylypropanovými jednotkami, analogicky je pak nazýváme seskvilignany a dilignany, nebo oligolignany, ačkoliv nejnovější doporučení IUPAC doporučují názvy seskvineolignany a dineolignany s ohledem na přítomnost neolignanového typu vazby (Umezawa, 2003).

Podle způsobu oxidace propanových jednotek a jejich následné cyklizace mohou být lignany rozděleny do osmi skupin: furofuranová, furanová, dibenzylbutanová, dibenzylbutyrolaktonová, aryltetralinová, arylnaftalenová, dibenzocyklooktadienová a dibenzylbutyrolaktolová (*obr. 1*) (Umezawa, 2003; Harmatha, 2005).



Obrázek 1. Základní struktury lignanů (Suzuki, Umezawa, 2007).

Lignany v každé skupině se dále liší svým oxidačním stavem jak na aromatickém jádře, tak na propylovém postranním řetězci. Na základě oxidačního stavu uhlíku C-9 a (C-9'), které jsou koncové, mohou být lignany členěny na podskupiny: lignany s 9(9')-kyslíkem, lignany bez 9(9')-kyslíku, a dikarboxylové kyseliny lignanů. Rozdělení lignanů do těchto tří podskupin má význam především z hlediska studia biosyntetických drah lignanů, přičemž biosyntéza lignanů s 9(9')-kyslíkem je zatím nejvíce prostudována. Tento typ lignanů vzniká stereoselektivní dimerizací dvou koniferylalkoholů za spolupůsobení tzv. řídicího proteinu, kdy vzniká nejprve pinoresinol (PIN) (*obr. 2*), PIN je následně redukován pinoresinol/lariciresinolreduktasou přes lariciresinol (LAR) na sekoisolariciresinol (SEC), který je oxidován na matairesinol (MR) sekoisolariciresinoldehydrogenasou. Přeměna koniferylalkoholu na MR byla demonstrována na velkém počtu rostlinných druhů, což silně podtrhuje domněnku, že se jedná o hlavní biosyntetickou dráhu lignanů. Mnoho dalších druhů lignanů je tvořeno z lignanů této hlavní dráhy, a zároveň z nich vycházejí i substituční modifikace aromatického jádra (Umezawa, 2003b; Suzuki, Umezawa, 2007).



Obrázek 2. Biosyntéza lignanů usměrněná řídicím proteinem (Suzuki, Umezawa, 2007).

Koniferylalkohol není prekurzorem pouze lignanů, ale také ligninů, při jejichž biosyntéze nedochází pouze k dimerizaci fenylypropanových jednotek, ale probíhají i jejich oligomerace a další přidružené reakce. Těchto reakcí se účastní i *p*-kumarylalkohol a sinapylalkohol, kdy vznikají spojení i neolignanového typu. Každá z připojených jednotek poskytuje funkční místa pro další možná spojení nebo derivatizaci. Vzniká tak postupně různě velké sesíťování, které tvoří makromolekuly ligninu. Některé volné funkční skupiny mohou být glykosylovány nebo vázány na celulosu za vzniku lignocelulosových komplexů. Ty jsou pak základním stavebním prvkem dřevitých rostlin a umožňují stromům jejich mohutný vzrůst, pevnost, tvar a jiné charakteristické vlastnosti (Harmatha, 2005).

3.2 Výskyt a potenciální role lignanů v rostlinách

Záznamy o lignanech ve stromech sahají až na konec 19. století. Samotný název lignany byl navrhnout Haworthem v roce 1936. Dnes je již nezpochybnitelné, že lignany tvoří poměrně rozsáhlou skupinou sekundárních metabolitů cévnatých rostlin. Nacházejí se nejčastěji v dřevě a kůře stromů, v kořenech, listech, květech, plodech a semenech rostlin. K dnešnímu dni bylo zaznamenáno až několik stovek lignanů. Vyskytují se buď ve volné formě nebo glykosidově vázané na širokou skupinu sacharidů. Jednotlivé zastoupení lignanů v rostlinných matricích není dosud přesně zmapováno, zejména díky náročné analýze různých glykosylovaných lignanů a značné variabilitě prezentovaných informací v literatuře (Willför et al., 2006). V těchto aspektech se vedle odlišných metod stanovení odráží i možný vliv genetických faktorů nebo podmínek pěstování, které se následně projeví ve stanoveném obsahu některých lignanů u konkrétního druhu (Smeds et al., 2007).

Předmětem diskuze je stále biologická úloha lignanů v rostlinách. Existují ovšem důkazy, že lignany hrají nezanedbatelnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, rostlinami navzájem a rostlinami a hmyzem, a to buď přímo, nebo zprostředkovaně, formou synergismu s jinými účinnými látkami rostlin. Předpokládá se tedy, že plní svoji úlohu v obranném systému rostlin a ovlivňují tak symbiózu organismů na ekologické úrovni. Lignany pravděpodobně zasahují i do regulace růstu rostlin, kdy se jejich prekurzory stávají meziprodukty nebo komponenty při tvorbě ligninu (Harmatha, Dinan, 2003; Harmatha, 2005; Willför et al., 2006).

3.3 Lignany v dřevinách

Stromy svým mohutným vzrůstem a dlouhověkostí nepochybně potřebují dostatečně bohatou a účinnou zásobu přírodních látek, aby překonaly všechny nepříznivé okolnosti v průběhu jejich vegetace. Dřeviny tak obsahují značné množství látek, které jsou rozpustné ve vodě nebo lipofilní povahy. Lipofilní látky jsou např. ve smrku tvořeny převážně mastnými kyselinami, pryskyřičnými kyselinami, steroly, sterylestery a triglyceridy. V hydrofilním extraktu dřevin se vyskytují látky polyfenolového charakteru, mezi které patří lignany. Lignany se vyskytují zejména v jádrovém dřevu stromů. Jehličnany, měkké dřeviny, obsahují ve svém jádru převážně lignany, zatímco dřeviny s tvrdým jádrem převážně flavonoidy. Stilbeny jsou dále typické pro borovice a jsou obsaženy také v kůře stromů (Willför et al., 2004; Willför et al., 2006).

Castro et al. (1996) ve své přehledné studii shromáždila dostupné informace od roku 1967 do roku 1994 o distribuci lignanů v řádu borovicotvaré (*Pinales*). Zaznamenala tak výskyt lignanů v pěti ze šesti čeledí toho řádu. Velice podrobnou fylogenetickou distribucí rostlin, které produkují lignany, se zabýval Umezawa (2003). Ten pomocí databázového vyhledávání vybral 66 typických lignanů a zmapoval tak celkem 132 čeledí celé rostlinné říše.

Finští autoři provedli několik podrobných studií extraktivních - biologicky aktivních fenolických látek, jak hydrofilní tak lipofilní povahy, které popisují několik desítek průmyslově důležitých druhů dřevin (Ekman et al., 2002; Holmbom et al., 2003; Willför et al., 2003; Willför et al., 2003b; Willför et al., 2003c; Nuopponen et al., 2004; Nuopponen et al., 2004b; Willför et al., 2004; Willför et al., 2004b; Willför et al., 2004c; Eklund et al., 2004; Willför et al., 2005; Pietarinen et al., 2006; Willför et al., 2007; Holmbom et al., 2008).

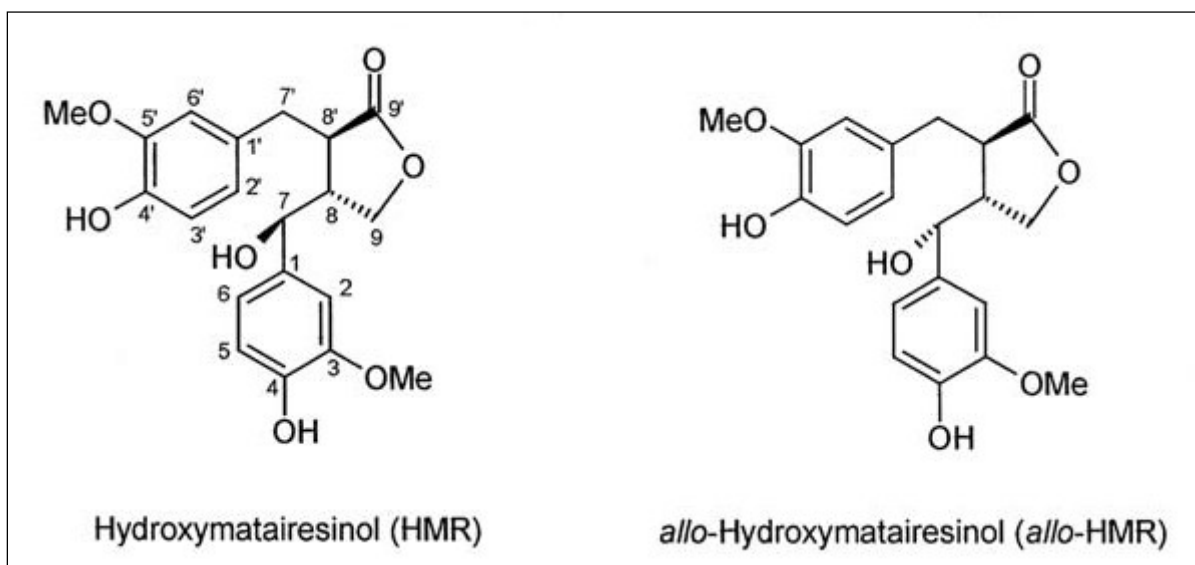
3.3.1 Lignany ve smrku

Smrk ztepilý (*Picea abies*) patří mezi naše nejdůležitější dřeviny. Již v 50. letech minulého století byly v této dřevině popsány hlavní zástupci lignanů (Freudenberg a Knof, 1957). Až poměrně nedávno byl skupinou finských vědců objeven neobvykle vysoký obsah lignanů v sucích smrku ztepitého, který činil 6-24 hm. %, s nejvíce zastoupeným lignanem 7-hydroxymatairesinolem (HMR) (70-85 %). HMR se v sucích vyskytuje ve dvou hlavních stereoisomerních formách v poměru přibližně 3:1. Eklund et al. (2002) prokázali struktury obou isomerů, zatímco hlavní isomer má 7*S*,8*R*,8'*R* konfiguraci, minoritní isomer nazývaný 7-*allo*-hydroxymatairesinol má 7*R*,8*R*,8'*R* konfiguraci (**obr. 3**) (Holmbom et al., 2003; Willför et al., 2003). Mezi další hojně obsažené lignany v sucích smrků patří α -conidendrin (CONI), sekoisolariciresinol (SEC), lariciresinol (LAR), pinoresinol (PIN) a matairesinol (MR) (**obr. 4**) (Ekman, 1976; Willför et al., 2003). Suky smrku tvoří přibližně 2 % hmotnosti sušiny dřevní hmoty (Hakkila, 1998). Bylo zjištěno, že některé suky obsahují až stonásobně vyšší koncentrace lignanů než jádrové dřevo samotného stromu (Willför et al., 2004). Lignany (4-8 %) byly nalezeny i v sucích velmi mladých smrkových porostů. Kromě lignanů jsou v sucích obsaženy také oligolignany v množství 2-6 % (Willför et al., 2003).

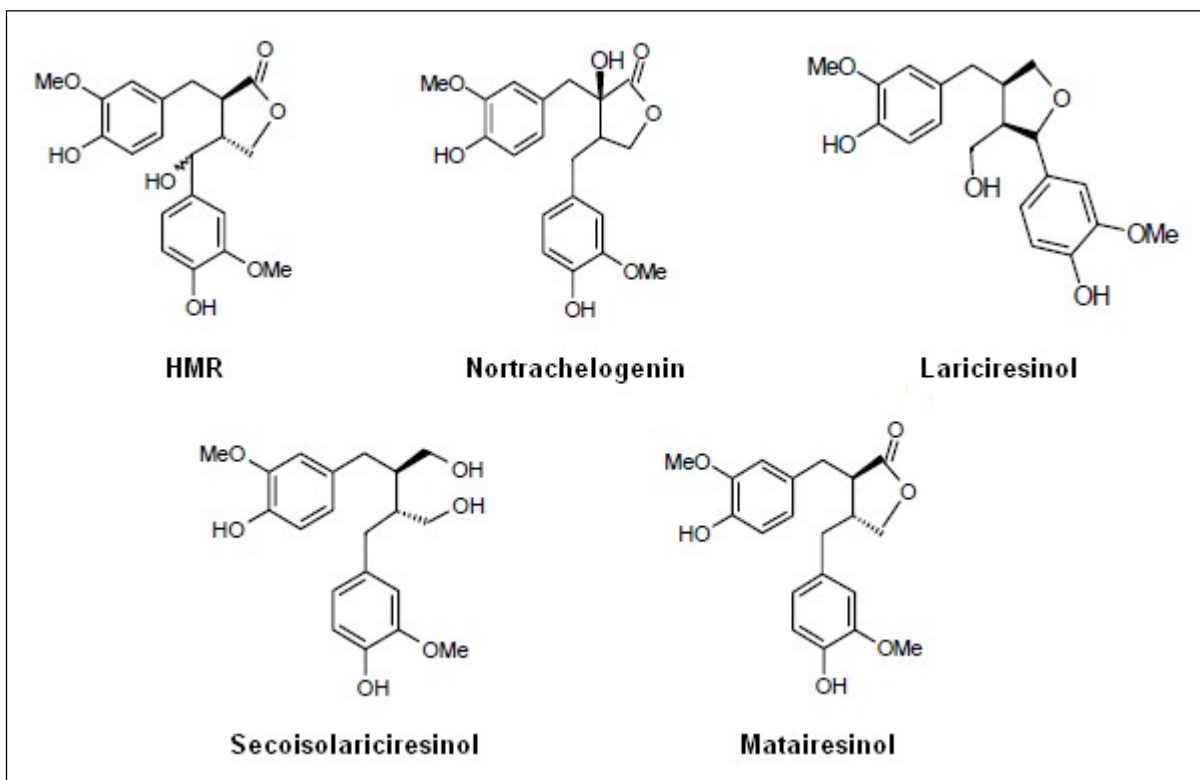
Mezi jednotlivými sukami v rámci jednoho stromu, mezi smrkami stejného druhu i mezi jednotlivými druhy smrků existují značné rozdíly v obsahu lignanů. Obsah lignanů v sucích je v radiálním směru ze středu jádra stromu k vnější větvi přibližně konstantní, excentricky z pohledu soku se obsah lignanů ve směru jádro – vnější dřevo zřetelně snižuje, stejné je to i u

samotné větve. Dramatický pokles obsahu lignanů nastává v rostoucím směru větve ve vzdálenosti 10-20 cm od úpatí větve, kdy je obsah lignanů přibližně stejný jako v okolním kmenovém dřevu (méně než 0,05 %). Poměr dvou epimerů HMR se liší v závislosti na různých sucích i v rámci jednoho suku. Byly nalezeny rozdíly i mezi jednotlivými stanovišti (Willför et al., 2003).

V severním Finsku byl ve studii sedmi smrků ztepilých (různé stáří, dvě lokality) identifikován lignan nortrachelogenin (NTG) a jeho enantiomer wikstromol (WIK) v kontrastu se vzorky smrků z jižního Finska, kde po těchto liganech nebyly ani stopy. Množství lipofilních extraktivních látek izolovaných ze suků těchto stromů bylo minimální ve srovnání s extrakty hydrofilními. Některé již neživé suky obsahovaly více pryskyřičných kyselin a volných diterpenylových alkoholů než běžné kmenové dřevo. Naopak bělové dřevo stromů obsahovalo větší množství esterifikovaných mastných kyselin než suky těchto stromů (Willför et al., 2003; Willför et al., 2005b).



Obrázek 3. Strukturální vzorce dvou isomerů 7-hydroxymatairesinolu (HMR) (Holmbom et al., 2003).



Obrázek 4. Hlavní obsahové lignany v sucích měkkých dřevin.

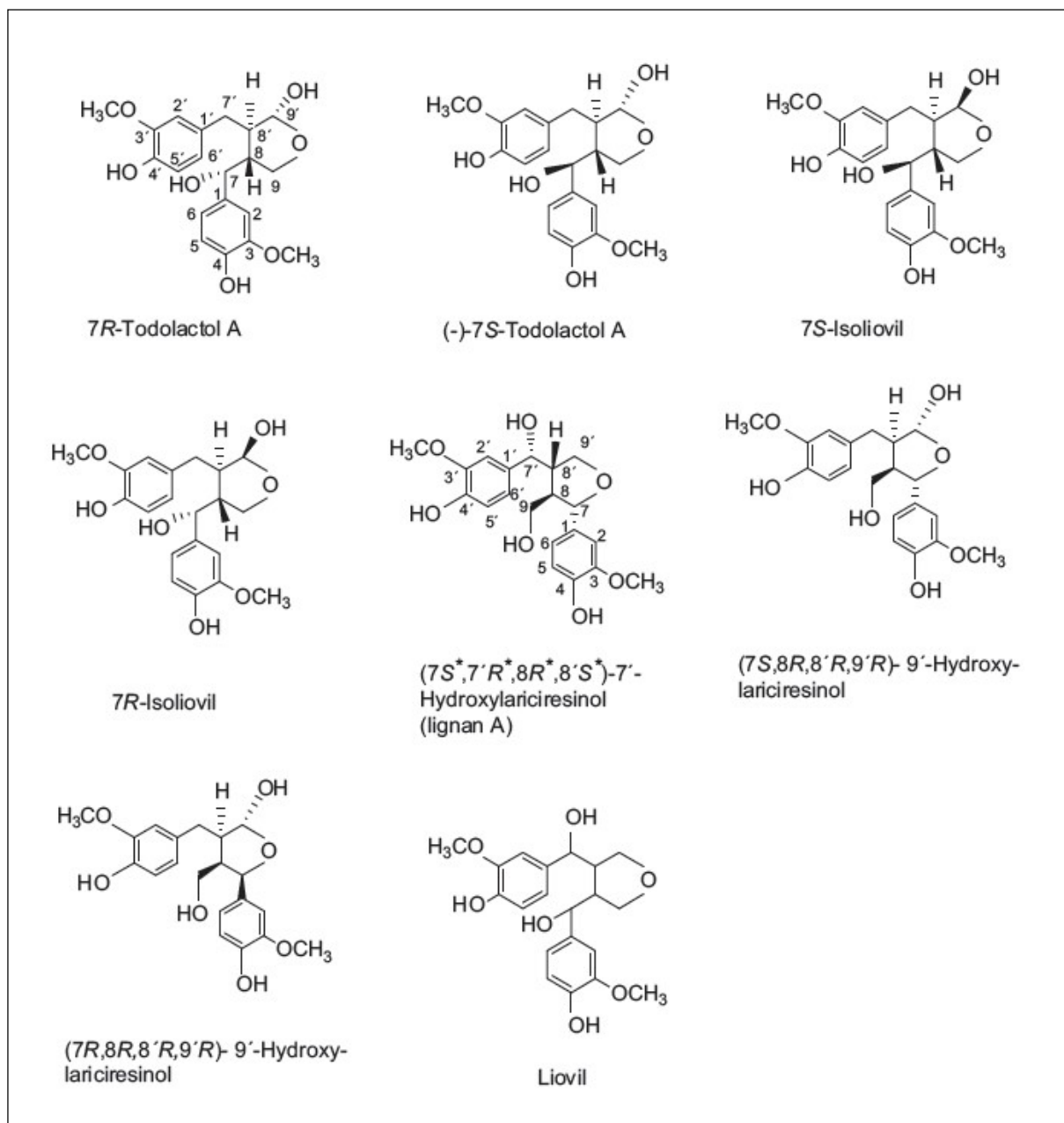
Piispänen et al. (2008) ve své studii sledoval variabilitu lignanů v pokusných porostech smrku ztepilého s dlouhodobým dusíkatým hnojením (roky 1961-2000, hnojeno každých pět let) ve dvou odlišných lokalitách, sever a jih Finska a rozdílem teplotních sum 520 (počet stupňů, dny > 5°C) a nadmořských výšek 165 m. Ze studie vyplývá, že dlouhodobé dusíkaté hnojení nemělo významný vliv na obsah lignanů v sucích pokusných stromů (z celkem dvaceti vyzrálých stromů, pěti velikostních tříd, dvou kontrol) v obou lokalitách. Zajímavý je ovšem výsledek porovnání celkových koncentrací lignanů v sucích stromů z obou stanovišť, kdy se jednoznačně ukázala bohatší zásobenost lignany v severském pokusném porostu (cca 14 % vs 5,4 %). Obsah HMR v sucích kontrolních porostů severní lokality přitom negativně koreloval s velikostí průměru větve, ale podobné korelace nebyly zaznamenány u hnojených porostů nebo u porostů jižní lokality. Proč je obsah lignanů vyšší u stromů rostlých v drsnějších klimatických podmínkách severu Finska je předmětem odborných diskuzí. Nehostinné podmínky severu by mohly sloužit jako podnět k bohatší produkci lignanů ve stromech – sucích, jež mohou hrát důležitou úlohu při obranné reakci na stresovou situaci vyvolanou nepříznivými přírodními podmínkami např. s možností mikrobiálního ataku.

Ze studií finských autorů vyplývá, že lignan HMR je dominantním lignanem v sucích těchto druhů smrků: smrku ztepilém (*Picea abies*), smrku sivém (*P. glauca*), smrku korejském (*P. koraiensis*), smrku černém (*P. mariana*) a smrku omorika (*P. omorica*), zatímco liovil (LIO) a sekoisolariciresinol dominuje v smrku sítku (*P. sitchensis*) a smrku pichlavém (*P. pungens*). Vedle lignanů obsahují tyto dřeviny ve svých sucích významné množství lignanům příbuzným oligolignanů, složených převážně ze tří až čtyř fenylpropanových jednotek (Willför et al., 2004).

Mezi další lignany, teprve nedávno identifikované ve dřevě smrku ztepilého, patří 7'-hydroxylariciresinol. Ekman (1976) tento lignan pojmenoval jako lignan A (**obr. 5**). Relativní konfigurace této sloučeniny byla již částečně objasněna Anderssonem et al (1975), ale potvrzena byla až Ekmanem (1976) pomocí metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Využitím metody GC-MS (Ekman, 1976) byl dále ve dřevě smrku popsán lignan nazvaný liovil (divanillyl tetrahydrofuranový (THF) lignan, hydroxylovaný v polohách C-7 a C-7'). Tento lignan byl dříve identifikován Freudenbergem a Knofem (1957) ve smrku ztepilém a Freudenbergem a Weingesem (1959) v modřínu opadavém (*Larix decidua*). O dvě desetiletí později byly v jedli španělské (*Abies pinsapo*) popsány dva stereoisomery 7'-hydroxylariciresinolu (Barrero et al., 1994), jeden z nich byl také nalezen ve slunečnici roční (*Helianthus annuus*) (Macias et al., 2004) a v jedlovci (*Tsuga dumosa*) (Zhao et al., 2005). Třetí stereoisomer 7'-hydroxylariciresinolu byl v glykosylované formě popsán v rostlině *Trachelospermum liukiense* (Abe a Yamauchi, 1990) a později jako aglykon (pojmenovaný tanegool) ve slunečnici roční (Macias et al., 2004). Willfür et al. (2004b) se podařilo identifikovat lignan A také v jedlích a v dalších druzích smrků (Willför et al., 2004).

Eklund et al. (2004) vyizolovali ze smrku ztepilého butyrolaktonový lignan lariciresinolového typu nazvaný iso-HMR. V dalších druzích smrků a tisů byly identifikovány butyrolaktolové lignany (divanillyl (THF) lignany hydroxylované v polohách C-7 a C-9') zvané todolaktol A a isoliovil (Miller et al., 1982; Ozawa a Sasaya, 1988 a Omori et al., 1994). Todolaktoly mají v porovnání s isoliovilu opačnou konfiguraci na C-9'. Willför et al. (2005) v sucích smrku pichlavého (*Picea pungens*) identifikovali a charakterizovali 7*S*-epimer todolaktolu a 7*S*-epimer isoliovilu (**obr. 5**). Tyto lignany byly zřejmě dříve nesprávně označeny jako isomery liovilu (Ekman, 1976; Willför et al., 2003). Z naší provedené studie neznámých lignanů v sucích smrku ztepilého, která je níže blíže popsána, je patrné, že dříve publikované strukturní charakteristiky lignanů todolaktolu a isoliovilu (Miller et al., 1982; Ozawa a Sasaya 1988; Omori et al., 1994) jsou nesprávné. Mezi další hydroxylované lignany

lariciresinolového typu, popsané v literatuře, patří např. 9'-hydroxylariciresinol (*obr. 5*), který byl identifikovaný ve smrku pichlavém (Barrero et al., 1994) a 7-hydroxylariciresinol identifikovaný Berninim et al. (2009).

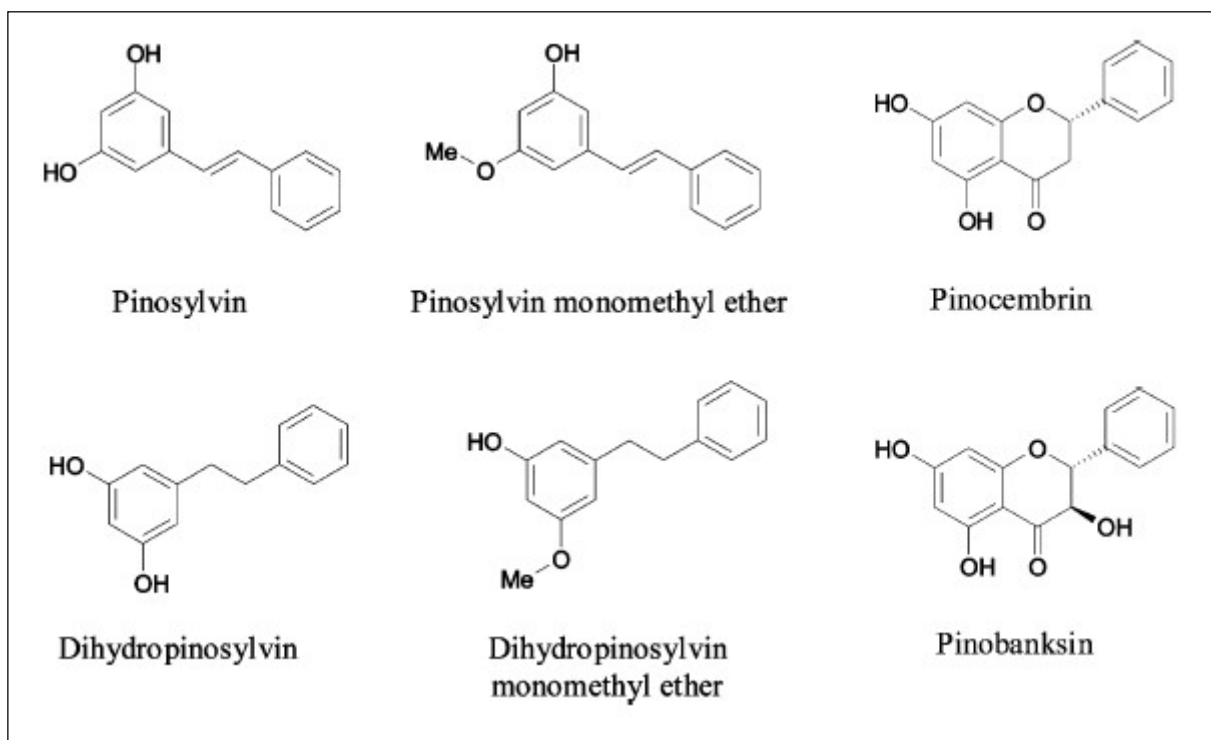


Obrázek 5. Strukturální vzorce některých hydroxylovaných divanillyl-tetrahydrofuranových lignanů se sumárním vzorcem $C_{20}H_{24}O_7$ (Smeds et al., 2012b).

3.3.2 Lignany v dalších dřevinách

Borovice lesní (*Pinus sylvestris*) obsahuje ve svých sucích velké množství stilbenů 1-7 %, a lignanů 0,4-3 %, zatímco kmenové dřevo obsahuje okolo 1 % stilbenů a žádné lignany (Willför et al., 2003b). Podobných výsledků dosáhli i norští autoři, kteří naměřili v jádrovém dřevu borovic 0,2-2 % a sucích 2-8 % stilbenu pinosylvinu (**obr. 6**) (Hovelstad et al., 2006). Ve finské studii extraktivních látek obsažených v sucích sedmi borovic lesních byly dále zaznamenány rozdíly v obsahu polyfenolů u jednoho stromu i mezi jednotlivými stromy. U mladých borovic bez jádrového dřeva může koncentrace stilbenů v sucích dosáhnout až 200 krát vyšší hodnoty než v kmenovém dřevu. Poměr monomethyl etherů pinosylvinu k pinosylvinu byl větší v sucích než v kmenovém dřevu. Nejpočetnějším lignanem byl nortrachelogenin (NTG), ale také matairesinol (MR), SEC a LIO, které jsou obsaženy již v nižších koncentracích. Suky borovice také obsahují komplexní sloučeniny lignanového typu – oligolignany. V sucích i kmenovém dřevu byl nalezen také flavonoid pinocembrin v množství pod 0,02 %. Koncentrace stilbenů v radiálním směru jádro – vnější větev se snižuje nebo v případě kmenu zůstává stejná, prudký pokles nastává u vnější větve. Obsah lignanů byl na stejné úrovni nebo v kmenu mírně klesl, opět v případě větve obsah lignanů dramaticky klesá až po deseti cm úplně vymizí (Willför et al., 2003b).

V sucích borovic byl nalezen vysoký obsah lipofilních extraktivních látek 4,5-32 %, zejména pryskyřičných kyselin. Nejvíce zastoupenou pryskyřičnou kyselinou byla v sucích i jádrovém dřevu abietová kyselina. Profil distribuce pryskyřičných kyselin i polyfenolových sloučenin byl podobný. Borovicové suky také obsahují až 0,5 % diterpenových aldehydů (Willför et al., 2003b).



Obrázek 6. Chemická struktura fenolických látek borovice lesní (Willför et al., 2003c).

Jedle jsou dalším druhem dřevin s pozoruhodným výskytem lignanů, oligolignanů a juvabionů v suchých stromů v kontrastu s okolním dřevem. Willför et al. (2004b) analyzoval osm druhů jedlí (*Abies sibirica*, *A. lasiocarpa*, *A. balsamea*, *A. alba*, *A. amabilis*, *A. veitchii*, *A. sachalinensis*, a *A. concolor*). Množství lignanů u některých suků překročilo 6 %, suky obecně obsahovaly až 2050 krát více lignanů než kmenové dřevo. Byly zde opět zaznamenány velké rozdíly nejen mezi druhy, ale také mezi jednotlivými sukly u jednoho stromu. Ve všech suchých dominoval SEC, ale také lariciresinol (LAR) (*Abies alba*) a HMR (*A. amabilis*). Vedle lignanů se v sukovém dřevu kumulují oligomerní aromatické sloučeniny, zejména seskvineolignany, dineolignany a juvabiony (Willför et al., 2004b), ale také flavonoid taxifolin (Zule, Kozjan, 2008).

Ve studii extraktivních látek tureckých a pákistánských druhů dřevin byl v suchých jalovce ztepilého (*Juniperus excelsa*) původem z Turecka identifikován cyklolariciresinol (CLAR), ale pouze v nízkých koncentracích (Willför et al, 2007).

Lignany HMR, SEC, LAR a NTG (*obr. 4*) patří mezi majoritní lignany průmyslově důležitých druhů měkkých dřevin. Tyto lignany jsou v suchých přítomny jako volné aglykony, proto mohou být jednoduše extrahovány polárními rozpouštědly. Lignany HMR, SEC, LAR a NTG by tak mohly být využity jako vedlejší produkty při průmyslovém zpracování dřeva (Holmbom et al., 2003). Další významné využití HMR leží v syntetické (Simakova et al., 2012 a 2012b) a polosyntetické přípravě dalších hodnotných lignanů. Potenciál těchto látek obecně tkví v jejich biologické aktivitě, která by mohla být využita v medicíně a ve výživě, nebo ve využití technických produktů s antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi (Willför et al., 2004).

3.4 Lignany v potravinových surovinách a potravinách

V potravinách byly donedávna charakterizovány jen dříve známé lignany sekoisolariciresinol (SEC) a matairesinol (MR) (Mazur et al., 1996, Horn-Ross et al., 2000). Poslední léta přinesla identifikaci dalších druhů lignanů v různých typech potravin. Milder et al. (2005; 2007) a Thompson et al. (2006) zaznamenali vedle SEC a MR obsahy pinoresinolu (PIN) a lariciresinolu (LAR). Vytvořili tak databáze s přibližně 110 druhy potravin a nápojů, přičemž byly na analýzy využity komplexní vzorky potravin různých značek a výrobců i odlišných prodejních míst (Schwartz et al., 2009). Seznam lignanů v potravinách se brzy rozšířil o medioresinol (MED) a syringaresinol (SYR) publikované Penalvem et al. (2005). Smeds et al. (2007) ve své studii analyzovala vybrané druhy cereálií, ořechů a olejnatých semen a charakterizovala při tom celkem dvacet čtyři rostlinných lignanů.

Nejvyšší obsah lignanů v potravinách (mg.g^{-1}) byl nalezen v semenech lnu (převážně oligomery SDG – sekoisolariciresinol diglukosid) a sezamových semínkách (převážně SES – sesamin) (Landete, 2012). Třetím nejbohatším potravinovým zdrojem lignanů jsou dle Smeds et al. (2012) semena ostružiníku morušky, byliny typické pro severské státy. Ve studii zaměřené na analýzu lignanů v bobulovinách a semenech autorka uvádí, že k dalším bohatším zdrojům lignanů v lesních plodech patří semena ostružiny a brusinky. Nižší koncentrace lignanů (ng.g^{-1} až $\mu\text{g.g}^{-1}$) byly stanovené v zelenině, luštěninách, obilovinách, oříškách, ovoci a nápojích jako je čaj, káva a víno (Nurmi et al., 2003; Willför et al., 2006; Adlercreutz, 2007; Li et al., 2008).

Literárních údajů o obsahu a distribuci lignanů v alternativních plodinách a pseudocereáliích je poskrovnu. Pouze několik studií (Smeds et al. 2007; Smeds et al.; 2012)

se zabývalo otázkou distribuce lignanů v potravinových surovinách, kdy byl porovnán obsah lignanů v otrubách či obalech a celých zrnech některých druhů obilovin. Obsahem lignanů ve vedlejších zemědělských produktech se zabývali Hosseinian a Mazza (2009), kteří ve své studii sledovali kromě obsahu lignanů a dalších polyfenolických látek v otrubách pšenice, žita, ovsa a tritikale, obsah těchto látek také ve slámě, listech a vločkách tritikale. Autoři zjistili, že obsah lignanů (SDG a MR) ve slámě ($2,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) a listech ($2,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) je významně vyšší než v otrubách ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) či vločkách tritikale. Podle našich informací se jedná se o jednu z mála studií, která se zabývala analýzou lignanů v některých vedlejších produktech rostlinné výroby.

Pěstování a využívání alternativních plodin a pseudocereálií je jednou z možností jak nutričně obohatit naši stravu a současně přispět k rozšíření diverzity kulturních plodin v krajině. Mezi alternativní plodiny řadíme proso, špaldu (staročesky samopše), okryž (dvouzrnka), příp. další pluchaté pšeničné druhy, bér vlašský apod. Pseudocereálie jsou plodiny, které botanicky nepatří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) jako obiloviny, ale využívají se a zpracovávají podobným způsobem. Do této skupiny patří na prvním místě pohanka, dále merlík chilský – quinoa a laskavec – amarant (Prugar et al., 2008).

Mezi nejpěstovanější plodinu ze zmíněných druhů patří v současné době pohanka (cca 1000 t). Uvedené plodiny mají nižší výnos zrna ($1-2,5 \text{ t.ha}^{-1}$), ale jejich semena se vyznačují specifickými kvalitativními vlastnostmi, které jsou důležité z hlediska lidské výživy pro zmírnění negativních vlivů, jako je stres, nevhodná či jednostranná strava, alergie a intolerance na potraviny či civilizační choroby (vysoký krevní tlak, zvýšená hladina cholesterolu v krvi, obezita nebo diabetes). Semena pohanky jsou proto využívána pro obohacení pečiva, výrobu keksů, těstovin aj. Pohanku, proso i amarant lze pro vysoký podíl bílkovin, především albuminů a globulinů využívat při bezlepkové dietě. Pohanka je ceněna také jako nejlepší zdroj rutinu, flavonoidu, který pozitivně působí na pružnost cévních stěn. Proso má v zrně vysoký obsah vitamínů, zvláště A, B1 a B2, loupané proso tzv. jáhly jsou svojí nutriční hodnotou srovnatelné s ovesnými vločkami. Semena amarantu mají i poměrně vysoký obsah tuku (5-7 %) s příznivým složením vyšších mastných kyselin a obsahem skvalenu a vysoký, oproti běžným obilovinám, někdy až trojnásobný obsah minerálních látek, zvláště fosforu, vápníku, draslíku a hořčíku. Nevýhodou při zpracování semen pohanky a prosa je velký podíl odpadu při loupání, kdy se výtěžnost konečného produktu – krup či jáhel pohybuje mezi 50-70 %. Krátká vegetační doba pohanky a prosa (kolem 100 dnů) umožňuje jejich pěstování i pro biomasu (zelené hnojení či do biopásů) při produkci $20-50 \text{ t.ha}^{-1}$ zelené

hmoty (Bárta et al., 2004; Kalinová a Moudrý, 2006; Kalinová a Dadáková, 2006; Kalinová, 2007; Zhang et al., 2013).

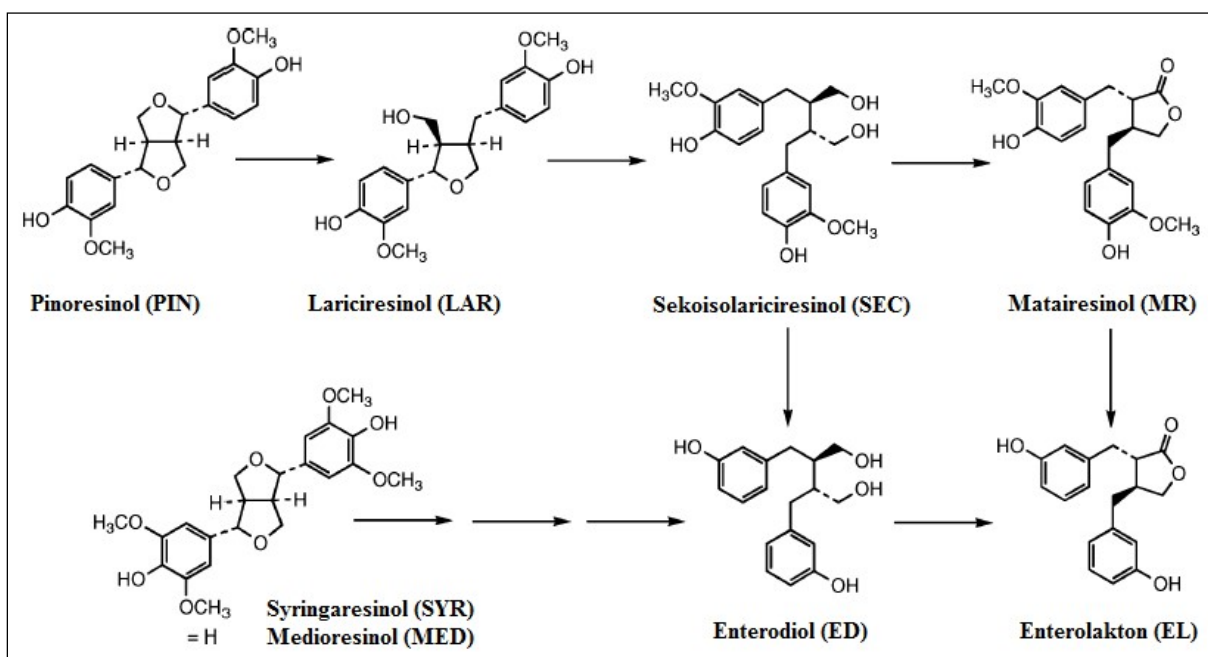
3.5 Lignany v přírodních vodách

Lignany tvoří hlavní podíl ve vodě rozpustných látek, které přecházejí do odpadních vod během termo-mechanického zpracování (TMP) dřeva při výrobě papíru. Örså and Holmbom (1994) našli ve vodách z TMP v průměru 20,3 mg.l⁻¹ lignanů. Jørgensen et al. (1995) našli v odtokových vodách z TMP koncentrace lignanů v rozmezí 79 - 162 mg.l⁻¹. V přítokové vodě tekoucí do čistírny odpadních vod v Turku (ve Finsku) byly zaznamenány následující koncentrace lignanů: 0,052 nmol.l⁻¹ HMR, 0,062 nmol.l⁻¹ hydroxyenterolaktonu (HEL), 0,097 nmol.l⁻¹ enterodiolu (ED) a 4,10 nmol.l⁻¹ enterolaktonu (EL) (Smeds et al., 2007b). Stejní autoři našli podobné koncentrace lignanů také v huminové vodě. Lignany tak pravděpodobně přecházejí do vody ze tlejícího rostlinného materialu ze živých nebo odumřelých částí rostlin a stromů, rostoucích ve vodě. Lignany jsou obsaženy ve dřevě stromů (Willför et al., 2003), především v jejich sucích (Holmbom et al., 2003). Zdrojem lignanů v přírodních vodách by ale mohly být také kořeny, o kterých se studie příliš nezmiňují.

3.6 Lignany u savců a člověka

Zájem o lignany prudce vzrostl, jakmile byly tyto sloučeniny identifikovány v séru a moči savců a člověka. Jedná se především o dva lignany enterolakton (EL) a enterodiol (ED) (*obr. 7*). Tyto savčí lignany mají hydroxylové skupiny pouze v pozicích *meta* aromatických jader. Taková substituce nebyla pozorována u lignanů rostlinného původu. EL a ED vznikají jako produkt metabolismu střevní mikroflóry z rostlinných prekurzorů (Slanina, 2000; Wang et al., 2002; Raffaelli et al., 2002), SEC je přeměněn na ED, a MR na EL (*obr. 7*). ED může být dále oxidován na EL. Předpokládá se, že metabolická dráha pro přeměnu PIN a LAR na enterolignany je podobná biosyntetické dráze v rostlinách. To znamená, že PIN je přeměněn na enterolignany přes LAR a SEC. Vedle těchto čtyř rostlinných lignanů, také další lignany jako SYR, arctigenin (ARC), HMR a SES byly identifikovány jako prekurzory enterolignanů, ale s nižším stupněm přeměny (Milder, 2007).

Savčí lignany jsou vylučovány z organismu žlučí a močí v poměrně velkém množství (μmol za den) jako glukuronidy a sulfoglukuronidy (Slanina, 2000).



Obrázek 7. Navržená metabolická dráha pro přeměnu rostlinných lignanů na enterolignany pomocí střevní mikroflóry (Adlercreutz, 2007).

3.7 Biologické účinky lignanů

Lignany vykazují velmi rozmanité spektrum účinků i na vyšší organismy, včetně člověka (Harmatha, 2005). Vedle výše zmíněné fungicidní a insekticidní aktivity vykazují některé lignany aktivitu antibakteriální, antivirovou, antioxidační, protinádorovou, estrogení a antiestrogení, včetně ochrany proti srdečním chorobám (Ayres a Loike, 1990).

Antioxidační aktivita

V současnosti je velká pozornost věnována studiu antioxidantů, které jsou schopny potlačit účinky volných kyslíkových radikálů podílejících se na velkém množství patologických stavů v lidském organismu. Výzkum antioxidační aktivity lignanů je soustředěn především na furofuranový lignan sesamin ze sezamového oleje, na neolignany honokinol a magnolol z kůry rostlin rodu *Magnolia*, dibenzocyklooktadienové lignany obsažené v plodech

Schisandra chinensis (Slanina, 2000) a v neposlední řadě také na lignany a lignanové extrakty izolované ze suků průmyslově důležitých dřevin (Willför et al., 2003c).

Výrazné redukční účinky nordihydroguajaretové kyseliny (NDGA) našly využití v potravinářství, kde se používá jako antioxidační aditivum. NDGA se také široce používá v laboratorních experimentech k inhibici lipoxygenas (Slanina, 2000).

Estrogenní aktivita

Lignany podobně jako další rostlinné fenolické látky, které mají podobnou strukturu jako ženský pohlavní hormon 17- β -estradiol, se označují jako fytoestrogeny. Do této skupiny látek kromě lignanů řadíme isoflavonoidy (genistein, daidzein), stilbeny (resveratrol) a kumestany (kumestrol) (Cornwell et al., 2004). Jak enterolignany tak rostlinné lignany mohou interagovat s estrogenními receptory ER α a ER β , ale se slabší afinitou než endogenní estrogeny. Mohou tak při nízké koncentraci endogenních estrogenů působit jako slabé estrogeny a při vysoké koncentraci jako antiestrogeny (Slanina, 2000; Keinan-Boker et al., 2004; Sirtori et al., 2005; Adlercreutz, 2007; Aehle et al., 2011).

Protinádorová aktivita

Lignan podophyllotoxin byl identifikován jako biologicky účinná, ovšem gastrointestinálně toxická látka v oddencích známé léčivé rostliny *Podophyllum peltatum* (tzv. americké mandragory). Američtí indiáni využívali pryskyřici této rostliny, získanou z alkoholového extraktu oddenků a kořenů, např. proti hadímu uštknutí nebo naopak jako jed a kolonisté amerického západu extrakt využívali proti horečkám a různým parazitárním onemocněním (Ayres a Loike, 1990; Harmatha, 2005). Hlavní účinné složky této rostliny – lignany byly spolu s dalšími strukturními analogy např. yateinem (YAT) z tropické dřeviny *Libocedrus yateenis* nebo analogy z rodu *Piper*, čeledi pepřovitých, *Piperaceae* (Jensen et al., 1993), testovány v různých modelech vyhledávacích testů. Mnohé postoupily i do vyšších specializovaných předklinických a klinických testů. Některé byly po vhodně provedených chemických modifikacích, jako etoposid a teniposid – deriváty podophyllotoxinu, s vyšší účinností, nižší toxicitou a patentovanou přípravou, registrovány jako léčiva (Harmatha, 2005).

Antivirová aktivita

Pryskyřice několika druhů rodu *Podophyllum* je účinná také v léčbě některých dermatologických obtíží. Alkoholový extrakt z oddenků rostlin rodu *Podophyllum emodi* nebo *P. peltatum*, zvaný podofylin a lignan podofylotoxin se ve formě masti nebo roztoku používají k léčbě kožních výrůstků, způsobené papilomaviry nebo k léčbě seboroických bradavic. Podofylotoxin a jeho deriváty deoxypodofylotoxin a β -peltatin vykazují aktivitu proti viru spalniček a viru herpes simplex I. Nezávisle na tom bylo zjištěno, že za antiherpetickou aktivitu extraktů z rostlin rodu *Juniperus*, jsou zodpovědné rovněž arylnaftalenové lignany, zvláště deoxypodofylotoxin (Slanina, 2000).

První zmínka o aktivitě lignanů proti viru HIV, původce onemocnění AIDS, pochází z roku 1990 od autorů Schrödera et al. Podařilo se jim izolovat z tropického popínavého keře *Ipomea cairica* dva lignany, arctigenin (ARC) a trachelogenin (TRACH) vykazující aktivitu proti viru HIV-1. Také dibenzocyklooktadienový lignan ze *Schizandry chinensis* – gomisin J a jeho halogenované deriváty (Slanina, 2000), a lignanový glukosid trachelosid (TRAD), původně izolovaný z rostliny *Trachelospermum*, společně se svými syntetickými analogy vykazovaly antivirovou aktivitu proti viru HIV-1. TRAD a jeho blízké analogy (TRACH, carthamosid (CARD) a carthamogenin (CART)) byly získány také z léčivé rostliny parchy saflorové (*Leuzea carthamoides*), která je zdrojem dalších cenných a biologicky účinných látek (Harmatha, 2005).

Interakce rostlina-hmyz

Lignany a biogeneticky příbuzné sekundární metabolity odvozené z fenylpropanoidových prekurzorů hrají důležitou úlohu v obraně rostlin proti hmyzu. Jejich úloha většinou spočívá v regulaci příjmu potravy hmyzem, ale v několika málo případech mohou také ovlivnit specifické fyziologické funkce hmyzu. Přesný model chování této skupiny látek není zcela zřejmý. Jeden z možných mechanismů působení by mohl spočívat v interakci a narušení endokrinního systému, který je klíčový pro správný vývoj hmyzu a je závislý na činnosti hormonů svlékání (ekdysteroidů). Tato hypotéza byla testována bio-testy pro zjištění ekdysteroidních agonistů a antagonistů na specifické B_{II} buněčné linii *Drosophila melanogaster*. Potenciál účinku v tomto testu reflektuje afinitu spojení na ligand-vazební místo ekdysteroidního receptoru *D. melanogaster*. Výsledky ukázaly, že většina testovaných lignanů (použito pouze několik reprezentantů jinak široké strukturní variability lignanů) byla

neaktivní. Pouze lignany léčivé rostliny *Leuzea carthamoides* a její TRACH, CART a CARD vykazovaly agonistickou aktivitu při poměrně vysokých koncentracích ($\geq 10^{-4}$ mol.l⁻¹). Všechny testované lignany vykazovaly cytotoxicitu, což je v souladu s jejich známými farmakologickými účinky, kdy působí jako kancerostatika (Harmatha, Dinan, 2003).

Podle již publikovaných výsledků slibují stilbeny mnohem větší předpoklady jako aktivní ekdysteroidní receptorové ligandy a užitečné narušitele ekdysteroidů. Stilbeny jsou v přírodě bohatě rozšířeny a mohou být také jednoduše syntetizovány. Zvláštní postavení by mohly sehrát strukturně jednoduché deriváty pinosylvinu nebo resveratrolu, které jsou v rostlinách produkovány ve větších koncentracích jako fytoalexiny po bakteriálním ataku zdrojového organismu např. u borovice, révy vinné nebo hroznového vína (Harmatha, Dinan, 2003).

3.8 Metody stanovení lignanů

Zastoupení jednotlivých lignanů v rostlinných matricích není dosud přesně zmapováno, zejména díky náročné analýze rozličných glykosidicky vázaných lignanů a značné variabilitě prezentovaných informací v literatuře. V těchto aspektech se vedle odlišných metod stanovení odráží i možný vliv genetických faktorů nebo podmínek pěstování, které se následně projeví ve stanoveném obsahu některých lignanů u konkrétního druhu (Smeds et al., 2007).

Použití vhodné metody analýzy pro extrakci, separaci a charakterizaci lignanů se odvíjí od studované matrice. V případě extrakce a analýzy dřevní hmoty, ve které se lignany vyskytují ve volné formě aglykonů, lze využít přímé extrakce vodným roztokem ethanolu nebo dokonce vodou (Willför et al, 2006). Zatímco analýza některých dalších rostlinných druhů, surovin a potravin je komplikovanější s ohledem na glykosidickou a případně i esterovou (u některých potravin) formu lignanů. U těchto vzorků je pro extrakci lignanů nutná následná kyselá, alkalická nebo enzymatická hydrolyza vedená za takových podmínek, které nezpůsobí degradaci nebo jinou změnu nativní struktury lignanů. Některé lignany, jako HMR nebo LAR jsou citlivé jak ke kyselým, tak alkalickým podmínkám. Například lignan HMR byl teprve nedávno detekován a zároveň stanoven jako majoritní lignan v obilovinách a alternativních plodinách. V tomto případě dřívější používání silných kyselin nebo zásad při hydrolyze lignanů vedlo k destrukci této látky (Holmbom et al., 2003; Willför et al., 2006; Smeds et al., 2007).

Pro analýzu lignanových extraktů se dnes převážně využívá plynové chromatografie (GC) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s různými typy detekčních technik

(GC-MS, HPLC-MS/MS, HPLC-CEAD, HPLC-NMR a další). Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je využívána zejména pro kvalitativní screening velkého počtu extraktů a pro monitoring izolačních postupů (Mazur et al., 1996; Slanina, Glatz, 2004; Milder et al., 2004; Schwartz, Sontag, 2006; Willför et al., 2006; Huang et al., 2007; Eklund et al. 2008; López et al., 2008).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Chemikálie

Standardy lignanů: (-)-7-hydroxymatairesinol (HMR, 2 epimery), (+)-isolariciresinol (CLAR), (+)-lariciresinol (LAR), (-)-sekoisolariciresinol (SEC), (-)- α -conidendrin (CONI), (+)-pinoresinol (PIN), (-)-matairesinol (MR), (+)-syringaresinol (SYR), (-)-enterolakton (EL) byly zakoupeny od firmy ArboNova (Turku, Finsko); sekoisolariciresinol diglukosid (SDG), phyllanthin (PHYL) (PhytoLab, Německo); podophyllotoxin (PODO), (-)-arctigenin (ARC) (Genetica s.r.o., Česká republika); sesamin (SES), (-)-asarinin (ASAR) (Sigma-Aldrich).

Standardy lignanů: yatein (YAT, z *Libocedrus yateensis*), yatein diol (YATD, tetrahydro-yatein), yatein diol-2D (YATD2, dihydro-dideutero-yatein), lignan 46T (z *L. yateensis*), cubebin (CUBE, z *Piper cubeba*), hinokinin (HINO, transf. z cubebinu), dihydrocubebin (HCUBE), deoxycubebin (DCUBE), carthamosid (CARD, z *Leuzea carthamoides*), trachelosid (TRAD, z *Leuzea carthamoides*), fenylpropanoidy: N-feruloyl- a N-isoferuloyl-serotoniny (kryst. frakce: přírodní směs isomérů) z *L. carthamoides*, N-feruloylserotonin byly připraveny a poskytnuty panem Dr. Jurajem Harmathou, ÚOCHB Česká republika.

Standardy lignanů: matairesinol- d_6 (MR- d_6), sekoisolariciresinol- d_6 (SEC- d_6) byly připraveny Jonasem Wahrmanem, todolaktolA (TODA) (Stefan Willför), anhydro-sekoisolariciresinol (ASEC), (-)-entrodol (ED), 7-oxo-matairesinol (OMR), 7-hydroxy-sekoisolariciresinol (7-OH-SECO), iso-hydroxymatairesinol (iso-HMR), 7-oxo-enterolakton (OEL), 4,4'-dihydroxyenterolakton (didemethylovaný MR), 7-hydroxyentrolakton (HEL) (Patrik Eklund), nortrachelogenin (NTG) (Christer Eckerman), phylligenin (PHYN), medioresinol (MED), trachelogenin (TRACH) (Japonsko). Výše uvedené lignany byly poskytnuty Dr. Annikou I. Smeds (Finsko).

Enzym β -glukuronidasa, typ H-1 (*H. pomatia*) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich, spol. s.r.o. (Česká republika). Methanol (LC-MS grade) byl zakoupen od Fisher Scientific (Česká republika), aceton (HPLC), *n*-hexan (GC), voda na ředění vzorků (LC-MS grade), voda jako mobilní fáze pro HPLC a LC-MS byla přečištěna přes Mili-Q systém, kyselina mravenčí a kyselina octová (LC-MS grade), ethylacetát, ethanol, methyl *tert*.butyl ether, diethyleter a ostatní použité chemikálie byly určeny pro analytické účely.

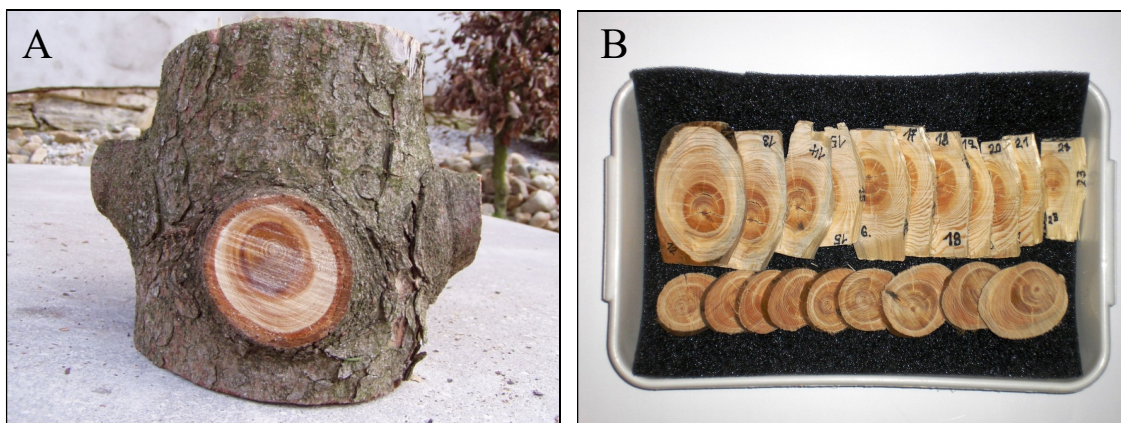
Silylační činidla: *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA) Supelco; trimethyl-chlorsilan (TMCS) a pyridin Merck (Darmstadt, Německo). Silikagel 60 Fluka Analytical, Sigma-Aldrich (St. Louis).

4.2 Materiál

4.2.1 Vzorky dřevin pro stanovení lignanů

4.2.1.1 Vzorky dřevin pro optimalizaci stanovení lignanů

Vzorky dřevin pro pilotní stanovení lignanů byly získány ve spolupráci s podnikem Lesy ČR, s. p. z lokality Obora Poněšice pod Lesní správou Hluboká nad Vltavou. V rámci pravidelné mýtní soustředěné těžby, která je určena k obnově lesních porostů starších 80 let, byly získány vzorky stromů. Jednalo se zejména o vzorky smrku ztepilého (*Picea abies*) ve stáří 80 až 160 let. Ze stromů byly odřezány špalky se zachováním částí, ve kterých dochází k větvení stromů (*obr. 8*) pro získání suků. Zároveň byly zachovány části větví. Zaznamenány byly informace ohledně, stáří, výšky (výšky, ve kterých byly odřezány špalky) a zdravotního stavu stromu.



Obrázek 8. (A) Vzorek stromu pro izolaci suků; (B) navzorkované části suku

Ze špalků byly separovány suky a zároveň byly zaznamenány informace o průměru a vitalitě (mrtvý, živý) suků/větví. Následně byly vzorky suků uloženy v mrazicím boxu při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího zpracování.

4.2.1.2 Vzorky dřevin pro optimalizaci stanovení lignanů a pro izolaci HMR

Vzorky dřevní hmoty byly dodány Výzkumným ústavem potravinářským (VÚPP) v Praze ve spolupráci s Dřevozpracujícím družstvem Lukavec. Vzorky suků dřeva byly získány metodou separace suků z dřevní hmoty sušených smrkových prken při výrobě hoblovaných palubkových prken. Metodika těžení suků z dřevní hmoty je chráněna užitným vzorem (Strohalm et al., 2012). Vzorky suků ze smrkového dřeva byly ve VÚPP zpracovány na střížném nerezovém mlýnu RETSCH SM100 a podle potřeb dodány do naší laboratoře.

4.2.1.3 Vzorky suků smrku ztepilého (*Picea abies*) pro identifikaci neznámých lignanů

Směsný vzorek suků byl získán metodou (Holmbom et al., 2003) na odseparování větších a těžších frakcí smrkových chipsů (Sahlberg, 1995) v podniku na výrobu papíru ve středním Finsku. Ručně byly vybrány suky s průměrem o velikosti okolo 10 mm, suky byly rozštípany, usušeny na vzduchu a rozemlety pomocí střížného mlýnku na velikost částic menších než 2 mm. Nakonec byly rozemleté suky lyofilizovány.

4.2.2 Vzorky obilovin a pseudocereálií a podmínky jejich pěstování

Na pokusném pozemku Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, byl v roce 2011 a 2012 založen polní maloparcelkový pokus se třemi odrůdami pohanky seté (*Fagopyrum esculentum*), jmenovitě s odrůdami Jana, Pyra a Špačinská a se čtyřmi odrůdami prosa (*Panicum miliaceum*), Unikum, Veselopodoliaskoe, Omskoe a Yantarnoe (**tab. 1**). V roce 2012 proběhl také polní pokus s pohankou tatarskou (*Fagopyrum tataricum*) a laskavcem (amarantem) (*Amaranthus hypochondriacus*).

Tabulka 1. Seznam odrůd pohanky seté a prosa setého.

Odrůda	Původ
Pohanka - Jana	Ukrajina
Pohanka - Pyra	ČR
Pohanka - Špačinská	Slovensko
Proso - Unikum	ČR
Proso - Veselopodoliaskoe	Rusko
Proso - Omskoe	Rusko
Proso - Yantarnoe	Rusko

Geografické podmínky pokusného stanoviště jsou následující: České Budějovice leží v severovýchodní části českobudějovické pánve, vyplněné jezerními sedimenty. Reliéf je rovinatý, podloží tvoří kvartérní pokryvy, převládají půdy nivní, hluboké, s vyšší hladinou spodní vody i vododržností půd, skeletovitost je nízká. V *tabulce 2* je uvedena základní charakteristika pokusného stanoviště a v *tabulce 3* je uvedena jeho klimatická charakteristika.

Tabulka 2. Základní charakteristika pokusného stanoviště.

Stanoviště	České Budějovice
Nadmořská výška (m)	380
Zeměpisná šířka	48° 57' 42"
Zeměpisná délka	14° 28' 05"
Půdní druh	písčitohlinitá
Výrobní typ	bramborářský
Půdní typ	kambizem pseudo-glejová (hnědá půda oglejená)
pH	6,4

Tabulka 3. Klimatická charakteristika pokusného stanoviště.

České Budějovice	duben	květen	červen	červenec	srpen	září	za vegetaci	za rok
Průměrná teplota (°C)								
Normál	8,1	13,0	16,2	17,7	17,1	13,5	14,3	8,2
Suma srážek (mm)								
Normál	46,5	70,1	93,0	77,8	78,8	47,5	413,7	528,8

Maloparcelkové pokusy byly založeny metodou znáhodněných bloků ve čtyřech opakováních po obilné předplodině, při sklizňové ploše parcely 10 m². U prosa byla šířka řádku 12,5 cm při výsevku 350 rostlin na m², u pohanky byla šířka řádku 12,5 cm při výsevku 200 rostlin na m².

V době sklizně byly odebrány vzorky kořenů, stonků a semen vzorků pohanky a prosa a u amarantu kořeny, stonky a listy. Z nažek pohanky a obilek prosa byly odděleny obalové vrstvy tzv. slupky. Jednotlivé rostlinné části byly vysušeny na vzduchu a poté uloženy v mrazicím boxu při -18 °C.

4.2.3 Odpadní biomasa – matoliny a semena bobulí révy vinné

Vzorky matolin – pevný odpadní produkt při zpracování (lisování) révy vinné (*Vitis vinifera*), byly získány ze Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Lednici. Matoliny obsahují úlomky třapin, stopky, semínka či slupky z vylisovaných hroznů. Matoliny byly vysušeny a do zpracování uskladněny v suchu a temnu.

4.2.4 Vzorky přírodních vod

Pro vzorkování vody byly vybrány lokality s výskytem mokřadů, s různým zastoupením dřevin, které rostou přímo ve vodě nebo na břehu. Vzorkování bylo provedeno v okolí města České Budějovice a Třeboně. Souřadnice vybraných lokalit jsou uvedeny v *tabulce 4*. V průběhu vzorkování bylo během dne slunečno, beze srážek. Vzorky vody byly krátkodobě uloženy při 6 °C a do týdne zpracovány.

Tabulka 4. Souřadnice vybraných lokalit pro vzorkování přírodních vod

Lokalita	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
Mokré	48°58'19.606"	14°24'51.401"
Tankodrom	48°59'47.669"	14°26'38.004"
Rozvodí Lužnice	48°59'11.260"	14°50'49.536"

4.3 Metody stanovení lignanů

4.3.1 Stanovení lignanů v dřevinách

4.3.1.1 Metody extrakce lignanů – pilotní pokus

Vybrané vzorky suků, získané ve spolupráci s Lesy ČR, s. p., byly lyofilizovány pro odstranění vlhkosti. Následně byly suky rozřezány na části (viz *obr. 8* (B)), rozdrčeny na menší kusy a rozemlety na laboratorním šrotovníku. Pro extrakci suků byly využity dva směsné vzorky rozdrčených suků. Na základě studia literárních zdrojů bylo navrženo a připraveno pět extrakčních činidel (*tab. 5*): 1 voda, 2 směs acetonu s vodou (95:5, v.v⁻¹), 3 směs acetonu a metanolu (26:20, v.v⁻¹), 4 směs vody s acetonem (95:5, v.v⁻¹), a 5 ethanol. Z prvního směsného vzorku (1) bylo připraveno 6 vzorků s navázkou 1 g suků. Ke vzorkům byl přidán 1 ml vody a následně 23 ml extrakčního činidla (1, 2 a 3) v duplikátech. Připravené vzorky (1) byly extrahovány v ultrazvukové lázni, kde teplota dosahuje cca 34 °C, po dobu 1 hodiny. Z druhého směsného vzorku (2) bylo dále připraveno 20 vzorků s navázkou 0,5 g.

24 ml extrakčního činidla 1, 2 nebo 4 bylo přidáno vždy k šesti vzorkům (pro tři různé metody extrakce) a extrakční činidlo 5 ke dvěma posledním vzorkům suků.

Tabulka 5. Metody extrakce a použitá extrakční činidla.

Vzorek suku	Metoda extrakce	(n = 2)	Extrakční činidlo
1	Ultrazvuk (34°C, 1 h)	1	voda
		2	aceton - voda (95:5)
		3	aceton - methanol (26:20)
2	Macerace (24°C, 1,5 h)	1	voda
		4	voda - aceton (95:5)
		2	aceton - voda (95:5)
	Ultrazvuk (34°C, 1 h)	1	voda
		4	voda - aceton (95:5)
		2	aceton - voda (95:5)
		5	ethanol
	Vodní lázeň (65°C, 3 h)	1	voda
		4	voda - aceton (95:5)
		2	aceton - voda (95:5)

Vzorky suků (2) byly následně extrahovány (macerace, ultrazvuk a vodní lázeň) viz *tabulka 5* Metody extrakce. Následně byly vzorky přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 µm. Extrakty suků byly rozředěny použitou mobilní fází a analyzovány pomocí HPLC s detekcí diodového pole (PDA).

4.3.1.2 Metody extrakce lignanů

Pro testování dalších extrakčních technik byly využity rozemleté vzorky suků smrkového dřeva, získané z VÚPP. Vzorky suků byly před dalším zpracováním lyofilizovány pro odstranění vlhkosti. Směsný vzorek suků byl vytvořen navážením přibližně 300 g rozemletých suků. Extrakce suků byla testována metodou extrakce ve fluidním loži (IKA extraktor), mikrovlnnou extrakcí (MASE) a metodou zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE).

Tabulka 6. Metody extrakce a použitá extrakční činidla.

Metoda extrakce	Extrakční činidlo
Fluidní lože	
(n = 4)	95 % aceton, 70 % aceton ^c
MASE^a	
(n = 3)	95 % aceton
ASE^b	
(n = 1)	dichlormethan
	methyl <i>tert</i> -butylether ^c
	ethylacetát ^c
	methanol ^c
	ethanol ^c
	aceton ^c
	aceton - voda (95:5) ^c
	aceton - voda (70:30) ^c
	voda ^c

^aMASE = mikrovlnná extrakce; ^bASE = zrychlená extrakce rozpouštědlem; ^cpředcházela extrakce *n*-hexanem.

1) Extrakce ve fluidním loži (IKA extraktor)

Nejprve byla testována metoda extrakce ve fluidním loži (IKA-Labortechnik, Staufen, Německo). Bylo naváženo přibližně 5 g vzorku suků, ve čtyřech opakováních. Vzorky suků byly nejprve extrahovány *n*-hexanem pro odstranění lipofilních látek. Na základě předběžných výsledků (**kap. 5.1.1**) a ve shodě s literaturou se pro získání hydrofilního extraktu suků ukázala být účinná směs acetonu a vody v poměru 95:5 (v.v⁻¹), s následnou extrakcí vzorku směsí acetonu a vody v poměru 70:30 (v.v⁻¹). Acetonové extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v methanolu. Extrakty suků byly dále přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 μm. Pro následnou analýzu lignanů byly extrakty suků zředěny vodou 1:1 (v.v⁻¹), ke vzorkům bylo přidáno 300 μg lignanu 46T, jako vnitřního standardu. Vzorky byly promíchány a analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS).

Pro testování výtěžnosti extrakce ve fluidním loži byl připraven směsný vzorek slámy (stonků pohanky z roku 2010), ve kterém byl předpoklad minimálního obsahu HMR. Byly připraveny dvě sady vzorků ve čtyřech opakováních, všechny s navázkou po 5 g. První sada vzorků byla extrahována *n*-hexanem, dále směsí acetonu a vody v poměru 95:5 (v.v⁻¹) a směsí

acetonu a vody 70:30 (v.v⁻¹). Ve druhé sérii vzorků byl, po extrakci *n*-hexanem, ke vzorkům přidán vyizolovaný HMR (viz kap. 4.3.2 Izolace HMR ze suků smrkového dřeva) jako obohacení – odpovídající koncentraci HMR 750 mg.kg⁻¹. Vzorky byly extrahovány směsí acetonu a vody v poměru 95:5 (v.v⁻¹) a směsí acetonu a vody 70:30 (v.v⁻¹). Acetonové extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v methanolu. Extrakty byly poté přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 μm. Pro následnou analýzu lignanů byly extrakty suků zředěny vodou 1:1 (v.v⁻¹), promíchány a analyzovány pomocí LC-MS.

2) Mikrovlnná extrakce (MASE)

Pro mikrovlnnou extrakci (Mars 6, CEM, USA) byly připraveny tři paralelní vzorky suků o navážce cca 5 g. Vzorky suků byly extrahovány směsí acetonu a vody 95:5 (v.v⁻¹) při teplotě 150 °C po dobu 20 min. Následně byly acetonové extrakty odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v methanolu. Methanolové extrakty suků byly přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 μm. Pro následnou analýzu lignanů byly extrakty suků zředěny vodou 1:1 (v.v⁻¹), ke vzorkům bylo přidáno 300 μg lignanu 46T, jako vnitřního standardu. Vzorky byly promíchány a analyzovány pomocí LC-MS.

3) Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE)

Metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE) byla testována na přístroji Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, USA) v laboratoři Metabolomiky a izotopových analýz v Brně (Centrum výzkumu globální změny, AV ČR, v.v.i.). Pro extrakci suků bylo připraveno devět vzorků o navážce 10-30 g suků. Testována byla následující rozpouštědla (*tab. 6*): dichlormethan (DCM), methyl *terc*.butylether (MTBE), ethylacetát, methanol, ethanol, aceton, směsi acetonu a vody (95:5, v.v⁻¹) a (70:30, v.v⁻¹) a voda. Vzorky suků byly nejprve extrahovány *n*-hexanem pro odstranění lipofilních látek, pouze při extrakci DCM byly vzorky extrahovány přímo. Následně byly vzorky suků extrahovány vybraným rozpouštědlem. Extrakty byly poté odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v methanolu. Methanolové extrakty suků byly přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 μm. Pro následnou analýzu lignanů byly extrakty suků zředěny vodou 1:1 (v.v⁻¹), ke vzorkům bylo přidáno 300 μg lignanu 46T, jako vnitřního standardu. Vzorky byly promíchány a analyzovány pomocí LC-MS.

4.3.1.3 Izolace HMR ze suků smrkového dřeva

Vzorky suků ze smrkového dřeva (VÚPP) byly lyofilizovány. Metoda izolace HMR byla upravena dle Freudenberg a Knofa (1957). Pro izolaci HMR bylo naváženo přibližně 300-500 g rozemletých suků. Suky byly nejprve 2 x extrahovány *n*-hexanem pro odstranění lipofilních látek ve varné baňce pod zpětným chladičem. Vzorky suků byly dále extrahovány 95 % acetonem s vodou a 70 % acetonem s vodou. Acetonové extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v ethanolu. Ethanolový extrakt byl zahříván na 50 °C. Následně byl přidán octan draselný (AcOK) až do nasycení roztoku. Extrakt byl poté uložen v lednici při 6° C, dokud nedošlo k vysrážení HMR. Extrakt byl zfiltrován pod vakuem, a z filtračního papíru byl sesbírán vytvořený adukt HMR a octanu (HMR-AcOK). Proces srážení byl opakován se zbývajícím extraktem pro zvýšení výtěžku HMR. Krystaly aduktu HMR-AcOK byly promyty nasyceným roztokem octanu draselného v ethanolu. Adukt byl dále po částech extrahován směsí dichlormetanu (DCM) a vody 1:1 (v.v⁻¹). DCM podíl byl oddělen a odpařen na rotační vakuové odparce. Definované množství vyizolovaného HMR bylo rozpuštěno ve známém množství methanolu a roztok HMR byl zředěn mobilní fází a analyzován pomocí LC-MS. Zbývajícím extraktem po vyizolování HMR byl 2 x extrahován methyl *terc*.butyl etherem (MTBE). Extrakty MTBE byly spojeny a na rotační vakuové odparce odpařeny do sucha.

4.3.1.4 Metoda HPLC s PDA detekcí

Metodou kapalinové chromatografie s PDA detekcí (Varian ProStar 335 PDA) byly analyzovány vzorky suků z pilotních experimentů extrakce lignanů. Chromatografická metoda byla optimalizována pro standardní směs lignanů, složenou z HMR, MR, CLAR a LAR o koncentraci 20,5 µg.ml⁻¹. Testována byla kolona Luna C18 150 x 2,0 mm, 3 µm (Phenomenex), kolona Zorbax SB C8 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agilent) a kolona Kinetex C18 100 x 4,6 mm, 2,6 µm (Phenomenex) pro různá složení mobilních fází.

Chromatografická separace extraktů suků probíhala na koloně Luna C18 (150 x 2,0 mm, 3 µm), která byla spojena s předkolonou naplněnou sorbentem stejných vlastností jako v koloně. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu s acetonitrilem a voda s přísadkou kyseliny fosforečné a isopropanolu. Mobilní fáze A byla složena z 0,1 % H₃PO₄ + 1 % isopropanolu + voda; mobilní fáze B byla složena ze směsi acetonitrilu a methanolu v poměru (3:2, v.v⁻¹). Gradient probíhal následovně: 0 min – 20 % B; 25 min 50 % B; 27 min 20 % B;

32 min 20 % B. Délka analýzy byla 32 minut a rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Objem dávkování vzorků byl $20 \mu\text{l}$.

Detekce lignanů byla provedena pomocí detektoru s diodovým polem (PDA) při vlnové délce 280 nm. K vyhodnocení chromatogramů byl využit software Interactive Graphics version 6.5. Kvantitativní stanovení obsahu lignanů bylo provedeno pomocí externí kalibrace s použitím standardních roztoků. Byly vytvořeny směsné standardy obsahující lignany HMR, MR, CLAR a LAR o koncentraci od $0,205$ do $135 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pro deset koncentračních hladin.

4.3.1.5 Optimalizace metody LC-MS

Pro analýzu extraktů suků a izolovaného roztoku HMR byla použita metoda kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS) (Accela, LCQ Fleet, Thermo Scientific, USA). Chromatografická metoda pro separaci a analýzu lignanů ve vzorcích byla optimalizována pro standardní směs lignanů, složenou z HMR, CLAR, LAR, SEC, CONI, PIN a MR o koncentraci přibližně $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, za využití různých typů kolon a různého složení mobilních fází. Byly testovány kolony: Hypersil GOLD o rozměrech $50 \times 2,1 \text{ mm}$, se zrněním $1,9 \mu\text{m}$, s předřazeným in-line filtrem; kolona Kinetex C18 $150 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$; kolona Luna C18 $150 \times 2,0 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$ (Phenomenex) a kolona Zorbax SB C18 $100 \times 2,1 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$ (Agilent). Testované mobilní fáze byly složeny ze směsi vody a methanolu, vody a acetonitrilu, a vody a směsi methanolu s acetonitrem v různých poměrech mobilních fází. Jako modifikátory byly testovány kyselina mravenčí (LC-MS) a kyselina octová (LC-MS) o koncentraci od $0,1 \%$ do $0,5 \%$. Pro detekci a identifikaci lignanů byla testována ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v pozitivním i negativním modu.

4.3.1.5 Analýza lignanů pomocí LC-MS

Chromatografická metoda separace vzorků suků byla po optimalizaci provedena na koloně Hypersil GOLD o rozměrech $50 \times 2,1 \text{ mm}$, se zrněním $1,9 \mu\text{m}$, a s předřazeným in-line filtrem. Mobilní fáze byla složena z vody (A) a methanolu (B). Gradient probíhal následovně: $0 \text{ min} - 20 \%$ B; $4,5 \text{ min} 25 \%$ B; $5,5 \text{ min} 31 \%$ B; $7,0 - 8,5 \text{ min} 25 \%$ B; $12 \text{ min} 37 \%$ B; $17 - 20 \text{ min} 75 \%$ B; $22 \text{ min} 70 \%$ B; $24 \text{ min} 70 \%$ B; $25 - 30 \text{ min} 20 \%$ B. Délka analýzy byla 30 minut a rychlost průtoku mobilní fáze byla $250 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Objem dávkování vzorků byl $10 \mu\text{l}$.

Detekce a identifikace lignanů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s chemickou ionizací za atmosférického tlaku v negativním modu. Detekce lignanů byla zároveň provedena pomocí UV/VIS detektoru s diodovým polem (Accela PDA, Thermo Scientific, USA) ve spojení s LC (Accela, Thermo Scientific, USA). Vlnové délky byly skenovány v rozmezí 200 až 600 nm, s cílenou vlnovou délkou 230 nm. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány standardním roztokem HMR. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 300 °C, teplota na kapiláře byla 275 °C a napětí na kapiláře bylo – 1 V, průtok dusíku jako sušícího plynu byl 20 l.h⁻¹ a 5 l.h⁻¹ jako pomocného plynu. Vzorky lignanů byly nejprve skenovány v celkovém iontovém proudu (full-scan) s rozpětím m/z 220-1000. Pro identifikaci lignanů byly provedeny MS² experimenty s nejvíce intenzivními ionty prekurzoru a následně MS³ experimenty s nejintenzivnějšími produktovými ionty. Kvantifikace lignanů byla provedena pomocí MS² experimentů nebo ve full scanu.

Pro kvantifikaci lignanů byly vytvořeny směsné standardy v methanolu, s obsahem výše uvedených lignanů, dále standardní směs o obsahu HMR a CONI, jakožto nejvíce zastoupených lignanů v suchých smrkového dřeva. Koncentrace uvedených lignanů se pohybovala v koncentracích od 100 ng.ml⁻¹ do 20 µg.ml⁻¹ a od 1 µg.ml⁻¹ do 100 µg.ml⁻¹, na sedmi a deseti koncentračních hladinách. Uvedené směsné standardy lignanů byly pro následnou analýzu rozředěny vodou 1:1 (v.v⁻¹) a k jednotlivým vzorkům bylo přidáno 300 µg lignanu 46T (vnitřní standard) rozpuštěného ve směsi methanol-voda (50:50, v.v⁻¹). Kalibrační standardy byly v průběhu měření třikrát změřeny a zároveň byla mezi vzorky vkládána standardní směs lignanů o koncentraci 12,5 µg.ml⁻¹.

K vyhodnocení chromatogramů byl využit software Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Kalibrační křivky byly sestaveny na základě výpočtu průměrných hodnot a záznamu odezvového faktoru (plocha lignanu/plocha vnitřního standardu) proti koncentraci standardních lignanů. Body kalibrační křivky, které byly vychýleny od nominální koncentrace o více než 20 %, byly vynechány. Nejméně pět bodů ze sedmi a sedm z deseti koncentračních hladin bylo v lineárním rozsahu kalibrační křivky, s korelačními koeficienty kalibračních křivek $\geq 0,99$.

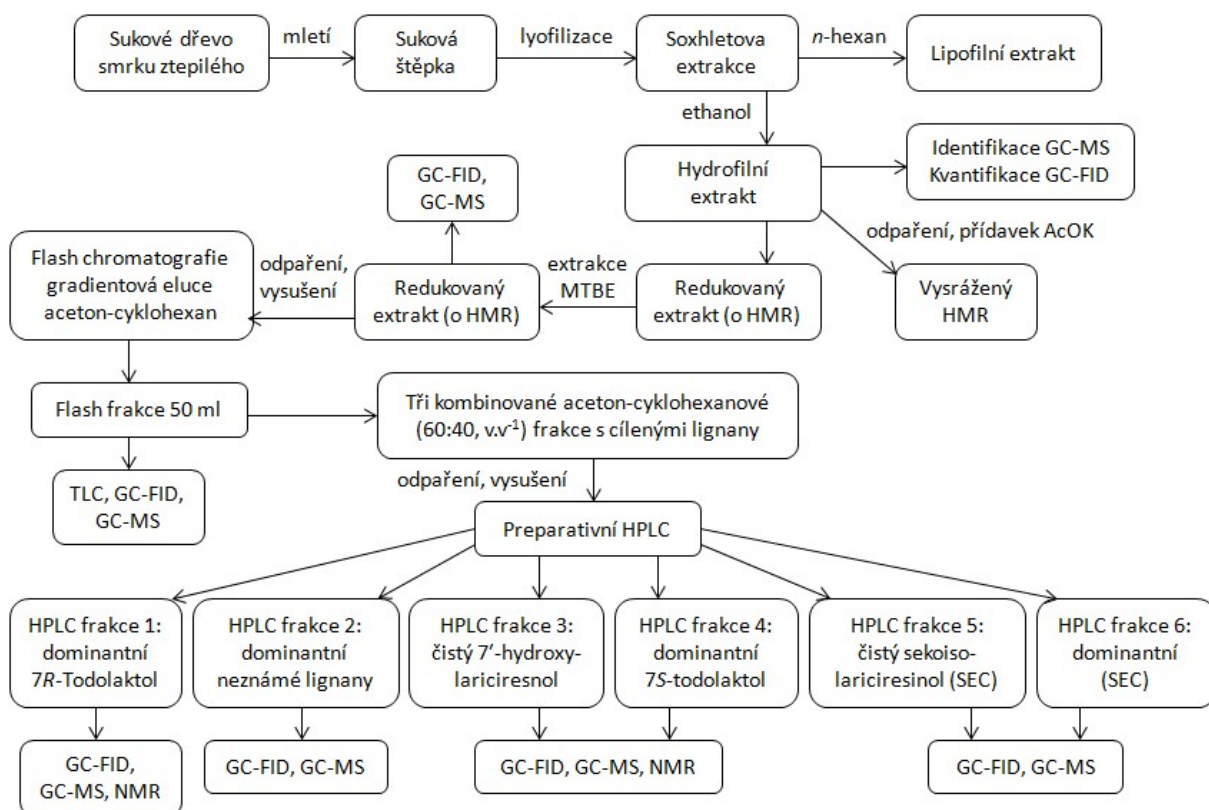
4.3.2 Izolace a identifikace neznámých lignanů v suchém smrku ztepilého

4.3.2.1 Extrakce sukového dřeva smrku a redukce HMR

Přibližně 500 g rozemletého a lyofilizovaného vzorku suků bylo přes noc extrahováno v Soxhletově extraktoru nejprve *n*-hexanem a poté ethanolem přes další noc. Ethanolový extrakt byl pomocí vakuové odparky zkoncentrován na viskózní olej. Extrakt byl zahříván na 50 °C a následně byl přidán octan draselný (AcOK) až do nasycení roztoku. Extrakt byl skladován při 6 °C, dokud nedošlo k vysrážení HMR. Roztok byl zfiltrován pod vakuem, a z filtračního papíru byl sesbírán vytvořený adukt HMR a octanu (HMR-AcOK). Proces srážení byl opakován se zbývajícím extraktem pro zvýšení výtěžku HMR a jeho redukci v extraktu. Zbývajícím extraktem byl v dělicí nálevce třikrát extrahován methyl *tert*.butyl etherem (MTBE). Kombinované frakce MTBE byly odpařeny ve vakuové peci do sucha, dokud extrakt nevytvořil světle hnědě zbarvenou pěnu. Vytvořená pěna byla dále několik hodin sušena ve vakuové peci.

4.3.2.2 Kvantifikace lignanů pomocí plynové chromatografie (GC)

K odpovídajícímu množství ethanolového extraktu bylo přidáno známé množství betulinolu jako vnitřního standardu pro předběžnou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých lignanů. Betulinol byl izolován z vrchních částí březové kůry a přečištěn v laboratoři Chemie dřeva a papíru ve Finsku. Vysušený extrakt byl silylován za přítomnosti 120 µl silylačního činidla složeného z pyridinu, *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidu (BSTFA) a trimethylchlorsilanu (TMCS) (1:4:1, v.v⁻¹) v sušárně při 70 °C po dobu 20-30 minut. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (FID) (Clarus 500, Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA) paralelně na kolonách HP-1 a HP-5 s rozměry 25 m x 0,2 mm a vrstvou filmu stacionární fáze o tloušťce 0,11 µm. Objem dávkování byl 1 µl. Nosným plynem byl vodík s průtokem 0,8 ml.min⁻¹. Teplotní program termostatu byl následující: 120 °C (drženo 1 min), teplota na 320 °C po 6 °C za min (drženo 15 min). Injektor byl v režimu s děličem toku (24:1) a teplotním programem ze 160 °C na 260 °C při 8 °C za min (drženo 15 min). Teplota detektoru byla 320 °C.



Obrázek 9. Schéma pro izolaci a identifikaci neznámých lignanů v suchém smrku ztepilého.

4.3.2.3 Izolační postupy

Flash chromatografie

Přibližně 4 g vysušeného ethanolového extraktu s redukováným obsahem HMR byly smíchány s 12 g silikagelu 60 a umístěny v plastovém držáku aparatury Flash40i (Biotage UK Ltd., Hertford, UK). Vzorek byl rozdělen na frakce na koloně naplněnou silikagelem s rozměry 40 mm x 15 cm (Biotage). Vyvíjecí systém pro krokovou gradientovou separaci byl složen ze směsi cyklohexanu a acetonu (40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 100 % acetonu) o objemu 300 ml. Alternativní eluční systém byl složen z dichlormetanu a ethanolu (2 %, 3 %, 5 %, 8 % a 12 % ethanolu). Byly sbírány frakce o objemu 50 ml. Frakce byly dále testovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na destičkách s nanosenou 0,25 mm vrstvou s obsahem fluorescenčního indikátoru (Merck). Mobilní fáze pro TLC byla složena z cyklohexanu a acetonu 40:60 (v.v⁻¹). Jako referenční standard byl použit 7*S*-epimer todolaktolu, který byl izolován (Willför et al., 2005) ze smrku pichlavého (*Picea pungens*).

Preparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ve třech frakcích, které byly eluovány směsí acetonu a cyklohexanu 60:40 (v.v⁻¹), byly pomocí GC-FID a GC-MS detekovány cílené neznámé lignany. Zmíněné frakce byly spojeny, odpařeny do sucha (725 mg) na rotační vakuové odparce, rozpuštěny ve 2 ml methanolu a přečištěny pomocí preparativní kapalinové chromatografie (HPLC). Preparativní HPLC systém (Shimadzu, Kyoto, Japan) byl složen z on-line degaseru DGU-14A, dvou LC-8A pump, autoinjektoru SIL-1 AP, termostatu kolony CTO-10AVP, přepínacího kohoutu (manuální analytické/preparativní přepínání), UV-VIS detektoru SPD-10AVP, sběrače frakcí FRC-10A a kontrolního systému SCL-10AVP. Použitá preparativní kolona Synergi Polar (Phenomenex Inc., Torrance, CA) 250 x 21.20 mm, 10 μm byla spojena s předkolonou stejných vlastností. Mobilní fáze byla složena z (A) destilované vody okyselené kyselinou octovou (filtrovány) v poměru 99,5:0,5 (v.v⁻¹) a (B) methanolu s kyselinou octovou 99,5:0,5 (v.v⁻¹). Gradient byl optimalizován pomocí několika analytických kolon s využitím standardů lignanů. Složení gradientu bylo následující: 25 % B bylo drženo 5 min, za 25 min na 60 % B, na 65 % za 2 min, na 75 % B za 7 min (drženo 4 min), za 1 min na původní složení. UV-VIS detektor byl nastaven na 230 a 280 nm. Průtok mobilní fáze byl 20 ml za min a sběrač frakcí byl nastaven na 12 ml. Nastříkované množství bylo 300 μl vzorku. Šest hlavních frakcí bylo sesbíráno a analyzováno pomocí GC-FID a GC-MS. Jedna frakce (frakce 4), separovaná pomocí preparativní HPLC byla následně analyzována pomocí následujících HPLC kolon: (1) semipreparativní kolona Luna C5 (Phenomenex) 250 x 10 mm, 10 μm; (2) kolona Agilent SB-C8 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) 100 x 2,1 mm, 3,5 μm; (3) kolona Kinetex PFP (Phenomenex) 50 x 2.1 mm, 2,6 μm.

4.3.2.4 Analýza izolovaných a přečištěných extraktů lignanů

Pomocí digitálního polarimetru Perkin-Elmer 241 byla v cele o velikosti 1 dm a 1 ml měřena optická rotace izolovaných a přečištěných vzorků. ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena při 25 °C na spektrometru AV-600 (Bruker Corp., Billerica, MA). Vzorky byly rozpuštěny v acetonu-*d*₆, methanolu-*d*₄, nebo v dimetylsulfoxidu (DMSO)-*d*₆. Všechna spektra, zahrnující korelační spektroskopii, kvantovou heteronukleární korelaci, vícevazebnou heteronukleární korelaci a spektra založená na korelované relaxaci vlivem přímé dipól-dipólové interakce (NOESY), byla zaznamenána standardní pulsní sekvencí.

Pro identifikaci jednotlivých izolovaných látek byla využita také analýza pomocí GC-MS. Přístroj: HP 6890-5973 GC-elektronová ionizace EI, 70 eV; kvadrupól-MS (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) byl vybaven kolonou HP-1 25 m x 0,2 mm, 0,11 µm (Agilent Technologie). Identifikace silylovaných extraktů byla provedena porovnáním spekter sledovaných látek s vlastní MS knihovnou spekter (Wiley 275, NIST 98, vlastní knihovna MS spekter) a interpretací MS spekter. Některé silylované extrakty byly analyzovány také pomocí GC- s chemickou ionizací (CI)-kvadrupól-MS (5975C series, Agilent Technologie) vybavenou kolonou HP-1. Měření probíhalo v pozitivním módu s 20-30 % methanu.

4.3.3 Distribuce lignanů v obilovinách a pseudocereáliích

4.3.3.1 Zpracování vzorků pohanky, prosa a amarantu

Vzorky pohanky a prosa a jejich jednotlivé části – kořeny, stébla, nažky pohanky, obilky prosa a jejich slupky a dále kořeny, stonky a listy amarantu byly lyofilizovány, rozemlety na šrotovníku a uskladněny při -18 °C. Extrakce vzorků byla provedena metodou zrychlené extrakce (Dionex ASE 350, Thermo Scientific, USA) na pracovišti Laboratoře metabolomiky a izotopových analýz v Brně (Centrum výzkumu globální změny AV ČR, v.v.i). Metoda ASE vycházela z optimalizovaných podmínek při testování extrakce vzorků dřevin a z modifikace metod podle Smeds et al. (2007) a Milder et al. (2004). Pro extrakci byl navážen 1 g vzorku. První cyklus extrakce byl proveden za použití *n*-hexanu pro odstranění lipofilních látek. Hydrofilní extrakty byly získány druhým a třetím cyklem, za použití 100 % acetonu ve druhém cyklu a směsi acetonu a vody (70:30, v.v⁻¹) ve třetím cyklu. Extrakty byly spojeny, odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v 9 ml methanolu. Methanolové extrakty byly přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti 0,22 µm. Z methanolových frakcí byly odebrány alikvóty o objemu 1 ml do 4 ml vialek a rozpouštědlo bylo pod dusíkem odpařeno do sucha. Enzymatická hydrolýza byla provedena pomocí enzymu β-glukuronidasy z hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*), kdy byl ke vzorkům přidán 1 mg enzymu, rozpuštěný v 1 ml 0,01 M octanového pufru o pH 5,0 a vzorek byl inkubován přes noc (19 h) při 37 °C. Vzorky byly dále 2x extrahovány 2 ml ethylacetátu na třepačce po 5 min. Následně byly 7 min centrifugovány při 7 tis. otáčkách za min. Ethylacetátové frakce byly odebrány a kombinovány ve vialce, dále odpařeny pod dusíkem do sucha a rozpuštěny v 0,5 ml methanolu. Pro analýzu bylo odebráno 100 µl vzorku, byl rozředěn 100 µl vody (LC-MS grade) a bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu - deuterovaného matairesinolu MR-d₆

(o obsahu 776 ng). Připravené vzorky byly promíchány a analyzovány pomocí LC-MS. Každý vzorek byl změřen třikrát.

4.3.3.2 Analýza lignanů pomocí LC-MS

Vzorky pohanky a prosa byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS) (LCQ Fleet, Thermo Scientific, USA). Chromatografická separace probíhala na koloně Kinetex Phenyl-Hexyl o rozměrech 100 x 2,1 mm, se zrním 2,6 μm (Phenomenex), a s předřazeným in-line filtrem. Mobilní fáze byla složena z vody (A) a methanolu (B). Gradient probíhal následovně: 0 min – 0,5 min 30 % B; 10 min 47 % B; 12,5 min 47 % B; 21 min 70 % B; 22 min 75 % B; 23 min 30 % B; 28 min 30 % B. Délka analýzy byla 28 minut a rychlost průtoku mobilní fáze byla 250 $\mu\text{l min}^{-1}$. Objem dávkování vzorků byl 10 μl .

Detekce a identifikace lignanů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) v negativním (i pozitivním) modu. Detekce lignanů byla zároveň provedena pomocí UV/VIS detektoru s diodovým polem (PDA) ve spojení s HPLC. Vlnové délky byly skenovány v rozmezí 200 až 600 nm, s cílenou vlnovou délkou 230 nm. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány pomocí standardního roztoku HMR. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 300 °C, teplota na kapiláře byla 275 °C a napětí na kapiláře bylo – 1 V, průtok dusíku jako sušícího plynu byl 20 l.h^{-1} a 5 l.h^{-1} jako pomocného plynu. Pro MS analýzy ve full-scanu bylo nastaveno rozpětí m/z 220-600. Pro identifikaci lignanů byly proměřeny všechny dostupné standardy lignanů, uvedené v **kap. 4.1**. Následně byly provedeny MS² experimenty s nejvíce intenzivními ionty prekurzoru a MS³ experimenty s nejintenzivnějšími produktovými ionty. Zároveň byly takto proměřeny vybrané vzorky všech částí pohanky – Jana a prosa Unikum (2011) pro identifikaci lignanů.

Kvantifikace lignanů byla provedena pomocí kalibračních standardů na sedmi koncentračních hladinách. Byly připraveny směsné kalibrační roztoky standardů v metanolu o koncentraci od 100 ng.ml^{-1} do 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Kalibrační vzorky standardů pro analýzu byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pohanky a prosa. 100 μl směsného standardu bylo smícháno se 100 μl vody a 10 μl vnitřního standardu MR-d₆ (o obsahu 776 ng). Kalibrační standardy byly v průběhu analýz změřeny dvakrát a každá hladina standardu byla změřena

třikrát. Mezi vzorky byla v průběhu měření vkládána standardní směs lignanů o koncentraci $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

K vyhodnocení chromatogramů byl využit software Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Kalibrační křivky byly sestrojeny na základě výpočtu a záznamu odezvového faktoru (plocha lignanu/plocha vnitřního standardu) proti koncentraci standardních lignanů. Body kalibrační křivky, které byly vychýlené od nominální koncentrace o více než o 20 %, byly vynechány. Nejméně pět bodů ze sedmi koncentračních hladin bylo v lineárním rozsahu kalibrační křivky. Velikost korelačních koeficientů kalibračních křivek byla $\geq 0,99$.

4.3.4 Stanovení lignanů v matolinách a semenech bobulí révy vinné

4.3.4.1 Zpracování vzorků matolin a semen bobulí

Vzorky matolin a semen bobulí byly lyofilizovány pro odstranění vlhkosti. Vzorky byly rozemlety na laboratorním šrotovníku. Bylo naváženo přibližně 5 g vzorku a vzorky byly extrahovány v IKA RET extraktoru ve fluidním loži. Metoda extrakce vycházela z optimalizovaných podmínek při testování extrakce vzorků dřevin a slámy a z modifikace metod podle Smeds et al. (2007) a Milder et al. (2004). První cyklus extrakce byl proveden za použití *n*-hexanu pro odstranění lipofilních látek. Hydrofilní extrakty byly získány druhým a třetím cyklem, za použití směsi acetonu a vody ($95:5, \text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) ve druhém cyklu a směsi acetonu a vody ($70:30, \text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) ve třetím cyklu.

Získané frakce acetonu a vody byly odpařeny na rotační vakuové odparce a rozpuštěny v definovaném objemu 20-25 ml methanolu. Methanolvé extrakty byly přefiltrovány přes nylonové mikrofiltry o velikosti $0,22 \mu\text{m}$. Z methanolvých frakcí byly odebrány alikvóty o objemu 1 ml do 4 ml vialek a rozpouštědlo bylo pod dusíkem odpařeno do sucha. Enzymatická hydrolýza byla provedena pomocí enzymu β -glukuronidasy z hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*), kdy bylo ke vzorkům přidáno 1,5 mg enzymu, rozpuštěného v 1,5 ml 0,01 M octanového pufru o pH 5,0 a vzorek byl inkubován přes noc (19 h) při 37°C . Vzorky byly dále 2x extrahovány 2 ml ethylacetátu na třepačce po 5 min a centrifugovány 7 min při 7 tis. otáčkách za minutu. Ethylacetátové frakce byly odebrány a kombinovány ve vialce, odpařeny pod dusíkem do sucha a rozpuštěny v 0,5 ml methanolu. Pro analýzu bylo odebráno 90 μl vzorku a rozředěno s 90 μl vody (LC-MS grade), dále přidáno 20 μl vnitřního standardu (o obsahu 300 μg lignanu 46T rozpuštěného ve směsi methanol-voda ($50:50, \text{v}\cdot\text{v}^{-1}$)).

Připravené vzorky byly promíchány a ve stejný den analyzovány pomocí LC-MS. Každý vzorek byl změřen dvakrát.

4.3.4.2 Analýza lignanů pomocí LC-MS

Pro analýzu lignanů ve vzorcích matolin a semen bobulí byla využita metoda kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS) (LCQ Fleet, Thermo Scientific, USA). Chromatografická separace probíhala na koloně Hypersil GOLD o rozměrech 50 x 2,1 mm, se zrněním 1,9 μm , a s předřazeným in-line filtrem. Mobilní fáze byla složena z vody (A) a methanolu (B). Gradient probíhal následovně: 0 min – 20 % B; 4,5 min 25 % B; 5,5 min 31 % B; 7,0 – 8,5 min 25 % B; 12 min 37 % B; 17 - 20 min 75 % B; 22 min 70 % B; 24 min 70 % B; 25 – 30 min 20 % B. Délka analýzy byla 30 minut a rychlost průtoku mobilní fáze byla 250 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Objem dávkování vzorků byl 10 μl .

Detekce a identifikace lignanů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) v negativním modu. Detekce lignanů byla zároveň provedena pomocí UV/VIS detektor s diodovým polem (PDA) ve spojení s HPLC. Vlnové délky byly skenovány v rozmezí 200 až 600 nm, s cílenou vlnovou délkou 230 nm. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány pomocí standardního roztoku HMR. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 300 °C, teplota na kapiláře byla 275 °C a napětí na kapiláře bylo – 1 V, průtok dusíku jako sušícího plynu byl 20 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$ a 5 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$ jako pomocného plynu. Pro MS analýzy ve full-scanu bylo nastaveno rozpětí m/z 220-1000. Pro identifikaci lignanů byly provedeny MS^2 experimenty s nejvíce intenzivními ionty prekurzoru a následně MS^3 experimenty s nejintenzivnějšími produktovými ionty.

Kvantifikace lignanů byla provedena pomocí kalibračních standardů na sedmi koncentračních hladinách. Byly připraveny směsné kalibrační roztoky standardů v methanolu o koncentraci od 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ do 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrační vzorky standardů pro analýzu byly připraveny smísením 90 μl směsného standardu s 90 μl vody a 10 μl vnitřního standardu (o obsahu 300 μg lignanu 46T rozpuštěného ve směsi methanol-voda (50:50, $v\ v^{-1}$). Kalibrační standardy byly v průběhu analýz změřeny dvakrát a mezi vzorky byla v průběhu měření vkládána standardní směs lignanů o koncentraci 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

K vyhodnocení chromatogramů byl využit software Xcalibur version 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Kalibrační křivky byly sestrojeny na základě výpočtu a záznamu odezvového faktoru (plocha lignanu/plocha vnitřního standard) proti koncentraci standardních lignanů.

Body kalibrační křivky, které byly vychýlené od nominální koncentrace o více než o 20 %, byly vynechány. Nejméně pět bodů ze sedmi koncentračních hladin bylo v lineárním rozsahu kalibrační křivky. Velikost korelačních koeficientů kalibračních křivek byla $\geq 0,99$.

4.3.5 Stanovení lignanů v přírodních vodách

4.3.5.1 Příprava vzorků

Vzorek vody o objemu 200 ml byl upraven na pH 3,5 pomocí kyseliny sírové a následně byl extrahován 100 ml methyl *tert.*butyl etherem (MTBE). Extrakce byla opakována 100 ml MTBE. Spojené MTBE extracty byly odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce. Vysušený extrakt byl čtyřikrát rozpuštěn v 1 ml toluenu v ultrazvukové lázni a extrakty byly spojeny a uloženy v mrazicím boxu při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extrakce každého vzorku byla provedena ve třech opakováních.

Derivatizace lignanů pro stanovení pomocí GC-MS byla prováděna reakcí s BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) s 1 % trimethyl-chlorosilanu (TMCS). Alikvót 1 ml extraktu vzorku vody byl pod dusíkem odpařen do sucha. Trimethylsilyl (TMS) deriváty lignanů byly připraveny za přídavku 70 μl (BSTFA) a 50 μl suchého pyridinu. Reakční směs byla zahřívána v uzavřené vialce při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min. Poté byla reakční směs při $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ odfoukána dusíkem do sucha a rozpuštěna v 1 ml hexanu. Vzorky byly uloženy při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a do 48 h analyzovány pro zabránění rozkladu TMS derivátů HMR a dalších lignanů.

4.3.5.2 Analýza lignanů pomocí GC-MS

Analýza lignanů ve vzorcích vod byla proveden pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) na přístroji Trace GC Ultra, ITQ 1100 (Thermo Fisher Scientific, USA). Chromatografická separace probíhala na kapilární koloně ZB-5MS (Phenomenex, Torrance, CA, USA) o velikosti 30 m x 0.25 a tloušťkou filmu stacionární fáze 0.25 μm . Nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Objem nástřiku byl 1 μl v režimu bez děliče toku (split po 30 s, $45\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Teplota inotového zdroje byla $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota injektoru $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplotní program byl následující: počáteční teplota $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, dále gradient $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ za min do teploty $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté gradient $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ za min do teploty $285\text{ }^{\circ}\text{C}$, při této teplotě 8 min.

MS analýzy byly provedeny ve full-scanu s nastavení m/z 50-600. Pro identifikaci a kvantifikaci HMR byly monitorovány tyto fragmenty: m/z 297; 304; 500 a 590. Kvantifikace byla provedena pomocí směsných kalibračních standardů lignanů s přídavkem betulinolu jako vnitřního standardu.

4.3.5.3 Stanovení rozpuštěného uhlíku (DOC)

Stanovení rozpuštěného uhlíku bylo provedeno na analyzátoru SHIMADZU TOC5000 ve spolupráci s Hydrobiologickým ústavem AV ČR, v.v.i. Princip stanovení je založen na vysokoteplotní (650 °C) katalytické oxidaci vodných vzorků s detekcí spalování CO₂ na infračerveném detektoru. Vzorky byly před analýzou okyseleny HCl a probublány kyslíkem pro odstranění anorganického uhlíku a dále analyzovány na přístroji TOC5000.

4.4 Statistické zpracování výsledků

Pro statistické zpracování výsledků byl použit program Microsoft Excel 2007 a program Statistica Cz 12 (StatSoft ČR s.r.o.). Výsledky analýz byly vyjádřeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, případně jako sumy. Pro zhodnocení distribuce lignanů ve vzorcích pohanky a prosa byla využita analýza rozptylu (ANOVA) pro hladinu pravděpodobnosti $p < 0,05$ a metoda analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA). Hlavním cílem PCA analýzy je transformace původních dat do nové soustavy malého počtu proměnných (hlavní komponenty, principal component, PC), které vystihují velké množství původní variability a navzájem nekorelují, a tudíž poskytují nezávislé informace o systému (Wojtowicz et al., 2013).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení lignanů v dřevinách

5.1.1 Metody extrakce lignanů – pilotní pokus

V rámci prvního experimentu optimalizace extrakce lignanů ze suků smrku ztepilého byly využity vzorky suků, získané ve spolupráci s podnikem Lesy ČR, s. p., pro porovnání běžně dostupných laboratorních metod extrakce. Jednalo se o metodu extrakce v ultrazvukové lázni (34 °C), maceraci při laboratorní teplotě a extrakci ve vodní lázni při teplotě 65 °C. Pro extrakční techniky byly použity různé druhy a směsi rozpouštědel, které vycházely jednak ze zkušeností při extrakci polyfenolických látek např. flavonolignanů ze semen ostropestřece mariánského a dále z dostupných informací v literatuře (Slanina a Glatz, 2004, Willför et al., 2006). Metody extrakce byly porovnány pro lignan hydroxymatairesinol (HMR), který se nachází v sucích smrku ztepilého ve významném množství, tvoří až 24 % sušiny suků a zaujímá 65-85 % všech lignanů (Willför et al., 2003). Meze detekce a stanovitelnosti pro HPLC metodu stanovení HMR a dalších lignanů jsou uvedeny v *tabulce 7*.

Z výsledků extrakčních postupů, které jsou znázorněny v *tabulce 8*, je zřejmé, že pro extrakci HMR ze suků byla nejúčinnější extrakční směs acetonu a vody v poměru (95:5), což je také ve shodě s literaturou (Willför et al., 2003). Použité extrakční techniky se co do účinnosti extrakce HMR za použití směsi acetonu a vody (95:5) mezi sebou významně neliší. Jako účinné extrakční činidlo se dále jeví směs acetonu a methanolu v poměru (26:20). Voda jako extrakční činidlo dosáhla významného nárůstu obsahu HMR při extrakci suků ve vodní lázni, tedy při zvýšení teploty extrakce. Z výtěžku 21 % HMR při 24 °C za macerace vzroste výtěžek HMR na 27 % při 34 °C (ultrazvuk) a dosáhne až 62 % HMR při 65 °C ve vodní lázni. Obsah HMR při extrakci vodou ve vodní lázni při 65 °C se vyrovná koncentraci HMR extrahovaného směsí vody a acetonu (95:5). Směs vody a acetonu dosáhne extrakční účinnosti při maceraci a v ultrazvuku 41 % a 38 % a ethanol jako extrakční činidlo dosáhne v ultrazvukové lázni účinnosti 75 % v porovnání se směsí acetonu a vody (95:5).

Tabulka 7. Meze detekce a stanovitelnosti lignanů pro metodu HPLC.

Lignany	LOD (ng.ml ⁻¹)	LOQ (ng.ml ⁻¹)
HMR	23,1	77,1
CLAR	16,5	54,8
LAR	19,1	63,3
MR	21,1	70,3

LOD = limit of detection, mez detekce byla stanovena jako trojnásobek šumu základní linie; LOQ = limit of quantification, mez kvantifikace byla stanovena jako desetinásobek šumu základní linie.

Tabulka 8. Porovnání extrakčních technik pro HMR v suchých za využití různých rozpouštědel.

Vzorek suku	Metoda extrakce	Extrakční činidlo	HMR (g.kg ⁻¹)
1	Ultrazvuk (34°C, 1 h)	voda	11,7 ± 0,05
		aceton - voda (95:5)	30,3 ± 0,70
		aceton - methanol (26:20)	29,2 ± 0,21
2	Macerace (24°C, 1,5 h)	voda	5,70 ± 0,03
		voda - aceton (95:5)	11,0 ± 0,07
		aceton - voda (95:5)	26,8 ± 1,20
	Ultrazvuk (34°C, 1 h)	voda	6,64 ± 0,74
		voda - aceton (95:5)	9,15 ± 0,68
		aceton - voda (95:5)	24,3 ± 1,91
		ethanol	18,3 ± 0,58
	Vodní lázeň (65°C, 3 h)	voda	15,2 ± 1,60
		voda - aceton (95:5)	15,3 ± 1,27
aceton - voda (95:5)		24,6 ± 3,47	

5.1.2 Metody extrakce lignanů

Pro testování dalších extrakčních technik byl využit směsný vzorek rozemletých suků smrkového dřeva, získaný z VÚPP. Extrakce suků byla testována nejprve metodou extrakce ve fluidním loži (IKA extraktor). Pro stanovení výtěžku extrakce HMR byla použita matrice, která obsahuje minimální množství HMR, sláma pohanky z roku 2010. Metoda extrakce ve fluidním loži byla dále srovnána s metodou mikrovlnné extrakce (MASE) a metodou zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE). Metody extrakce byly porovnány pro lignany HMR a CONI, které byly stanoveny pomocí metody LC-MS. Meze detekce a stanovitelnosti metody LC-MS jsou uvedeny v **tabulce 9**.

Metodou extrakce ve fluidním loži (*tab. 10*) byl stanoven celkový obsah HMR a CONI na 64,5 g.kg⁻¹. Jak je z jednotlivých kroků extrakce patrné, při extrakci vzorku 95 % acetonem dochází k získání 86 % celkového obsahu HMR a CONI. Opakováním extrakce vzorku se směsí acetonu a vody (70:5) se získá dalších 14 %. Spojením obou kroků extrakce je touto metodou dosaženo maximálního obsahu HMR a CONI.

Obohacením vzorků slámy byla dále testována výtěžnost metody extrakce ve fluidním loži. Jak je z *tabulky 9* patrné, po přidání HMR (750 mg.kg⁻¹) ke vzorkům bylo dosaženo téměř 87 % výtěžnosti. Tato výtěžnost však nezahrnuje úvahu o vázání HMR v samotné matrici, k tomu by bylo potřeba získat certifikovaný referenční materiál, který bohužel zatím není k dispozici.

Tabulka 9. Meze detekce a stanovitelnosti pro HMR a CONI metodou LC-MS a výtěžek HMR extrakcí ve fluidním loži.

Lignany	LOD (ng.ml ⁻¹)	LOQ (ng.ml ⁻¹)	Výtěžnost IKA (n = 4, %)
HMR	0,392	1,307	86,8 ± 2,4
CONI	0,229	0,762	

LOD = limit of detection, mez detekce byla stanovena jako trojnásobek šumu základní linie; LOQ = limit of quantification, mez kvantifikace byla stanovena jako desetinásobek šumu základní linie.

Tabulka 10. Postup metody extrakce ve fluidním loži a dosažené výsledky pro lignany HMR a CONI

Metoda extrakce	Pořadí extrakce	Extrakční činidlo	HMR (g.kg ⁻¹)	CONI (g.kg ⁻¹)	HMR + CONI (g.kg ⁻¹)
Fluidní lože	1	<i>n</i> -hexan			
(IKA)	2	(<i>n</i> -hexan), 95 % aceton	51,6 ± 2,29	3,91 ± 0,85	55,5
(n = 4)	3	(<i>n</i> -hexan, 95 % aceton), 70 % aceton	8,21 ± 1,01	0,83 ± 0,14	9,04
	2 + 3	(<i>n</i> -hexan), 95 % aceton + 70 % aceton	59,8 ± 4,15	4,7 ± 0,24	64,5

Porovnání metody extrakce ve fluidním loži s metodou mikrovlnné extrakce (MASE) a zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE) je uvedeno v *tabulce 11*. Z výsledků extrakčních technik je zřejmé, že nejvyššího výtěžku HMR a CONI bylo dosaženo pomocí metody ASE.

Metodou extrakce ve fluidní loži a MASE bylo dosaženo pouze jedné třetiny výtěžku HMR a CONI v porovnání s ASE. Metodou ASE bylo dále testováno široké spektrum rozpouštědel a jejich směsí. Nejúčinnějším extrakčním činidlem byl methanol, dále směsi acetonu a vody (70:30) a (95:5) s ethanolem a acetonem, po odstranění lipofilních látek *n*-hexanem. Uvedené výsledky odpovídají i předběžným dosaženým výsledkům a údajům uváděným v literatuře (Willför et al., 2003, Slanina a Glatz, 2004, Willför et al., 2006). Extrakce vodou se při aplikaci ASE nejevila jako účinná, bylo dosaženo pouze 9 % výtěžku HMR a CONI.

Tabulka 11. Porovnání extrakčních technik pro lignany HMR a CONI v suchých.

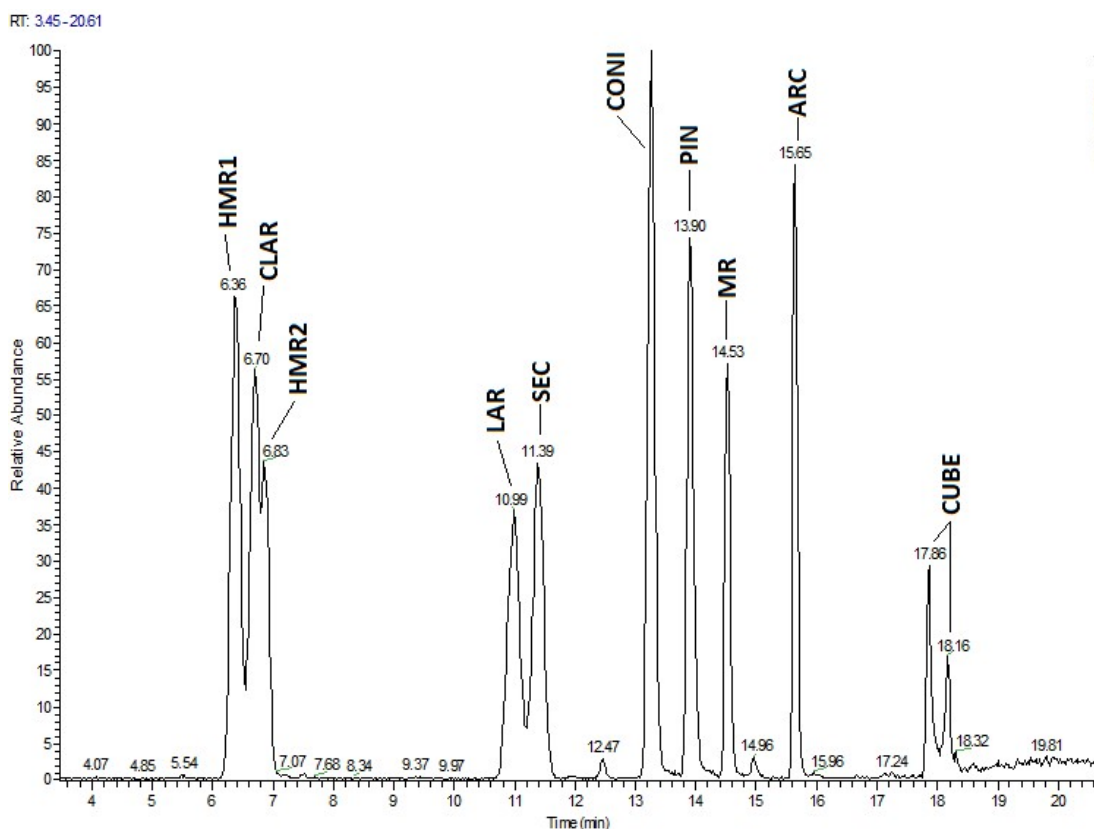
Metoda extrakce	Extrakční činidlo	HMR (g.kg ⁻¹)	CONI (g.kg ⁻¹)	HMR + CONI (g.kg ⁻¹)	%
Fluidní lože					
(n = 4)	95 % aceton, 70 % aceton ^c	59,8 ± 4,15	4,73 ± 0,24	64,5	33
MASE^a					
(n = 3)	95 % aceton	47,9 ± 1,80	4,67 ± 0,17	52,5	27
ASE^b					
(n = 2)	dichlormethan	90,8 ± 6,47	15,9 ± 3,29	107	55
	methyl <i>terc</i> - butylether ^c	35,5 ± 2,54	4,30 ± 1,29	39,8	21
	ethylacetát ^c	113 ± 4,70	16,0 ± 4,51	129	67
	methanol ^c	167 ± 9,92	26,0 ± 6,61	193	100
	ethanol ^c	133 ± 5,66	19,5 ± 5,12	153	79
	aceton ^c	131 ± 8,32	17,9 ± 5,12	149	77
	aceton - voda (95:5) ^c	136 ± 3,07	18,7 ± 5,06	155	80
	aceton - voda (70:30) ^c	156 ± 11,4	22,4 ± 6,01	179	93
	voda ^c	17,2 ± 1,86	0,14 ± 5,01	17,3	9

^aMASE = mikrovlnná extrakce; ^bASE = zrychlená extrakce rozpouštědlem; ^cpředcházela extrakce *n*-hexanem.

5.1.3 LC-MS metoda pro identifikaci a kvantifikaci lignanů v suchých smrku ztepilého

Pro analýzu extraktů suků a izolovaného roztoku HMR byla využita metoda kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS). Chromatografická metoda pro separaci a analýzu lignanů ve vzorcích byla optimalizována pro standardní směs lignanů, složenou z HMR, CLAR, LAR, SEC, CONI, PIN, MR, ARC a CUBE o koncentraci přibližně 12,5 µg.ml⁻¹, za využití různých typů kolon a různého složení mobilních fází. Na **obrázku 10**

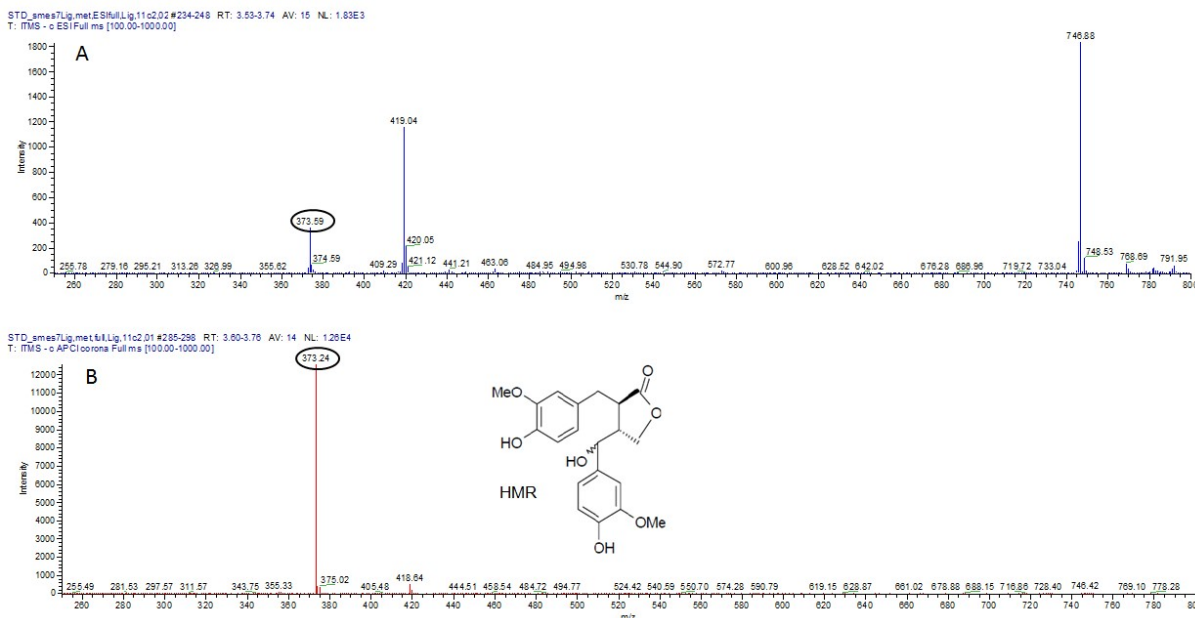
je znázorněn chromatogram standardní směsi lignanů, analyzované na koloně Hypersil GOLD (50 x 2,1 mm, 1,9 μm) s optimalizovanými podmínkami pro gradientovou eluci s mobilní fází složenou z methanolu a vody.



Obrázek 10. LC-MS chromatogram standardní směsi lignanů.

Pro detekci a identifikaci lignanů byla testována ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v pozitivním i negativním modu. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány použitím standardního roztoku HMR. Jak je z **obrázku 11** patrné, ionizace elektrosprejem (**obr. 11 A**) se ukázala být méně vhodná vzhledem k tomu, že se při ionizačním procesu tvořily dimery lignanů a adukty s ionty sodíku a draslíku, které jsou přítomny v destilované i redestilované vodě. Navíc ionizací APCI (**obr. 11 B**) bylo dosaženo o řád vyšší citlivosti, poměru signálu k šumu (S/N), pro testovaný ligan HMR. Chemická ionizace za atmosférického tlaku se tedy jeví jako vhodnější ionizační technika pro detekci lignanů ze suků smrku. Optimalizované podmínky MS analýzy byly následující: teplota iontového zdroje byla nastavena na 300 °C, teplota na kapiláře byla

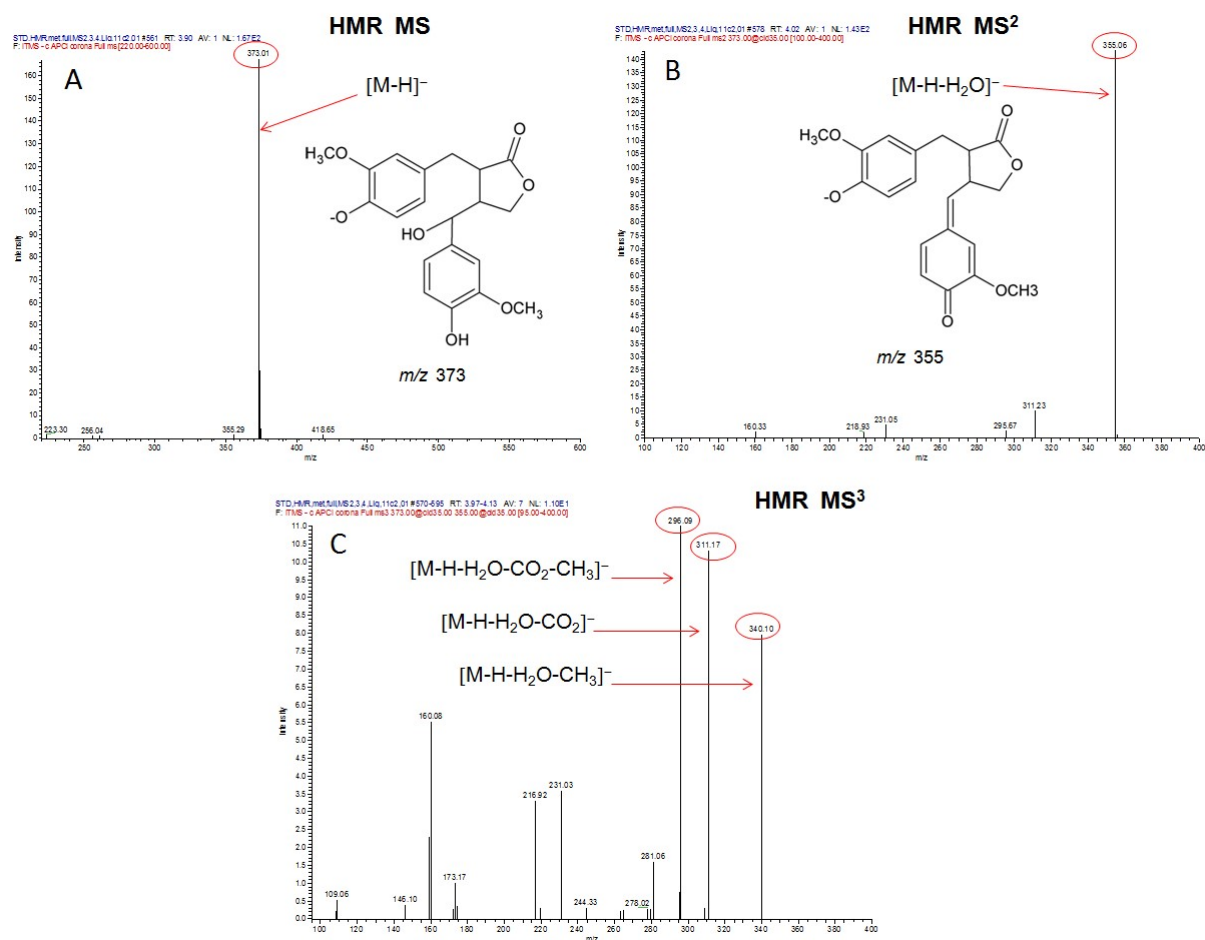
275 °C a napětí na kapiláře bylo – 1 V, průtok dusíku jako sušícího plynu byl 20 l.h⁻¹ a 5 l.h⁻¹ jako pomocného plynu.



Obrázek 11. Hmotnostní spektra standardu HMR pro (A) ESI-; (B) APCI-

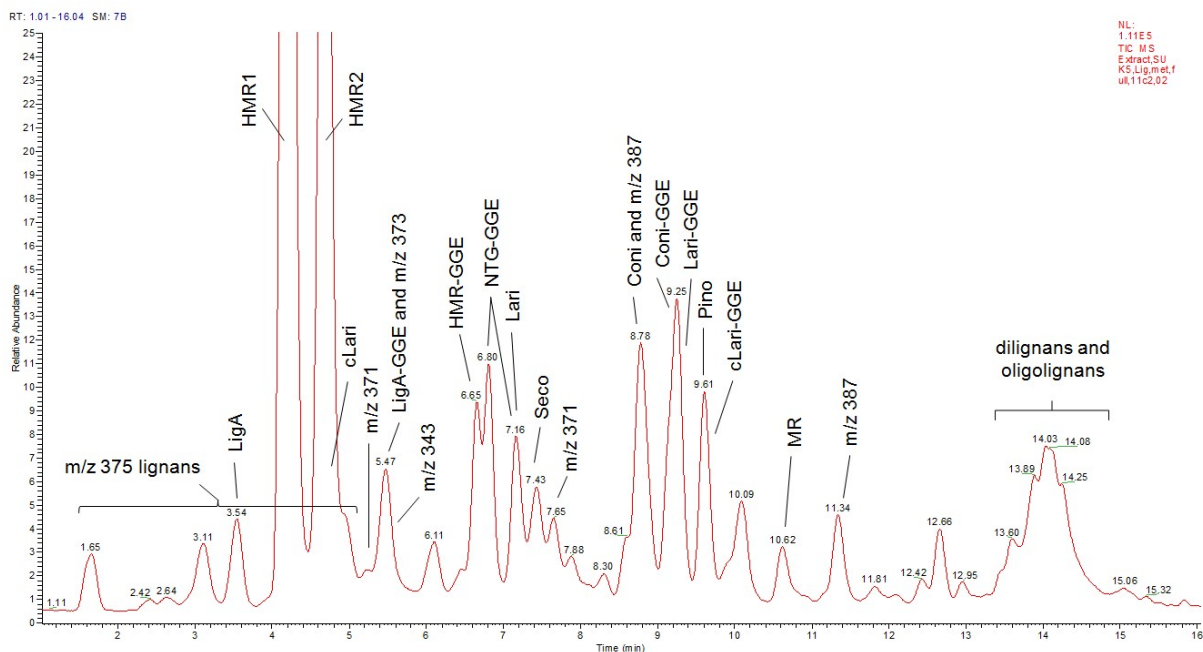
Pro identifikaci lignanů v sucích byly nejprve proměřeny standardní roztoky lignanů ve full-scanu s rozpětím m/z 220-1000. Následně byly provedeny MS² experimenty s nejvíce intenzivními ionty prekursoru a následně MS³ experimenty s nejintenzivnějšími produktovými ionty (*obr. 12*).

Na *obrázku 13* je znázorněna chromatografická separace lignanů extrahovaných ze suků smrku ztepilého (vzorek suku vzrostlého stromu). Na základě fragmentačních spekter lignanů a porovnáním naměřených dat s literaturou (Willför et al., 2004, Eklund et al., 2008) byly v extraktu suků identifikovány následující lignany: HMR1, HMR2, CLAR, LAR, SEC, CONI, PIN, MR, Lignan A (LigA); seskvilignany: HMR-guajacylglyceryl ether (GGE), nortrachelogenin (NTG)-GGE, LAR-GGE, CONI-GGE, LigA-GGE. V extraktu suků byly dále detekovány lignany s m/z 371, 373, 375 a 387, dilignany s m/z 700-775 a další oligolignany.



Obrázek 12. Hmotnostní spektra HMR (A) full scan; (B) MS² [373] experiment; (C) MS³ [355] experiment.

Při využití hmotnostní spektrometrie (MS) pro kvantifikaci může v reálných vzorcích docházet k nadhodnocení či podhodnocení výsledků z důvodu zvýšení či snížení signálu vlivem matričního efektu (Milder et al., 2004). Pro kvantifikaci lignanů byly proto testovány různé lignany a sloučeniny, které by bylo vhodné využít jako vnitřní standardy, vzhledem k nedostupnosti značených standardů lignanů. Z proměřených sloučenin (yatein, yatein-diol, hesperetin apod.), které se v suchých smrku nevyskytují, byl jako nejvhodnější látka využit lignan 46T.



Obrázek 13. LC-MS chromatogram extraktu suků ze zmrku ztepilého s identifikací lignanů; HMR1 – hydroxymatairesinol 1, HMR2, CLAR- cyklolariciresinol, LAR - lariciresinol, SEC - sekoisolariciresinol, CONI - α -conidendrin , PIN - pinoresinol, MR - matairesinol, Lignan A (LigA); seskvilignany: HMR-guajacylglyceryl ether (GGE), nortrachelogenin (NTG)-GGE, LAR-GGE, CONI-GGE, LigA-GGE.

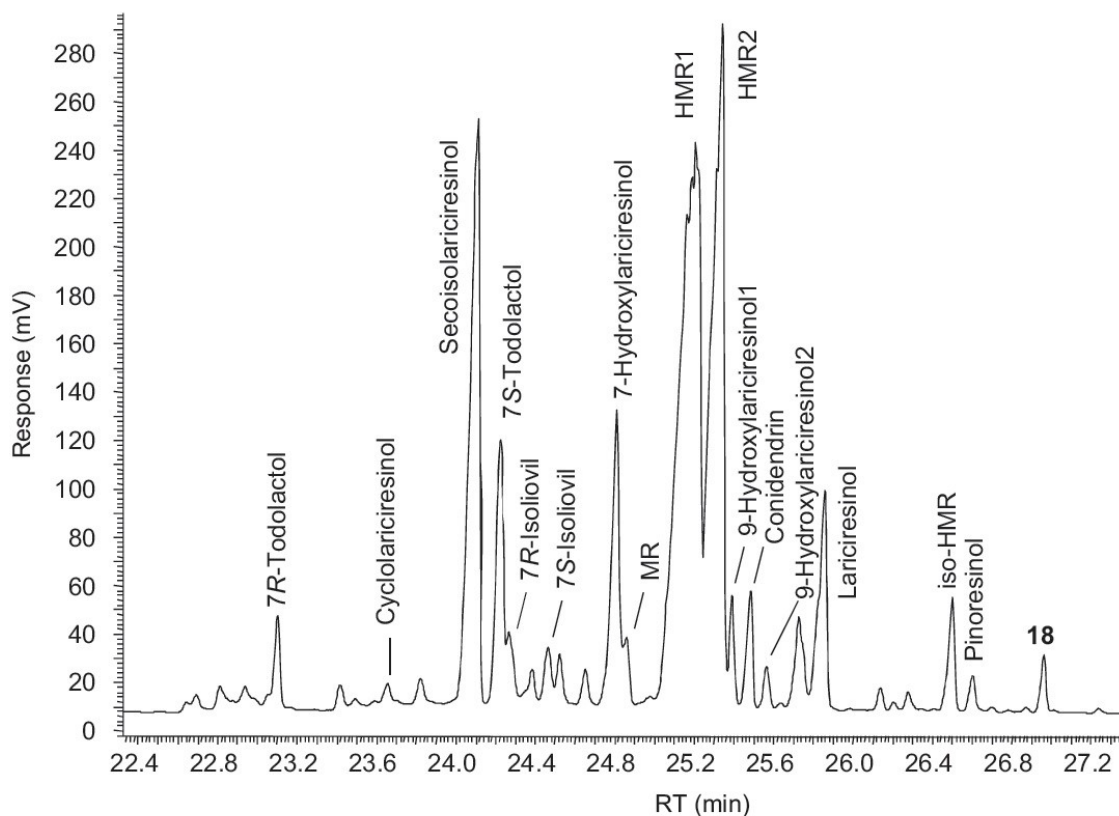
5.2 Izolace a identifikace neznámých lignanů v sucích smrku ztepilého

5.2.1 Zastoupení lignanů v různých frakcích

5.2.1.1 Původní ethanolový extrakt suku

Analýza ethanolového extraktu, ze kterého byl selektivním srážením částečně odstraněn HMR, byla provedena pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Na **Obrázku 14** je znázorněn GC-FID chromatogram silylovaného ethanolového extraktu suku, izolovaného ze suku smrku ztepilého a v souhrnné **Tabulce 12** jsou uvedeny relativní retenční časy (RRT) lignanů vztažené k betulinolu a koncentrace jednotlivých sloučenin v původním ethanolovém extraktu. Kvantitativní analýza pomocí GC-FID dává vesměs spolehlivé relativní odezvy měřených lignanů. Pro výpočet koncentrace lignanů byl jako vnitřní standard použit betulinol s korekčním faktorem 1,2 dle Ekmana a Holmboma (1989). Předběžná identifikace jednotlivých lignanů byla provedena na základě interpretace hmotnostních spekter lignanů a podle jejich předpokládaných transformačních reakcí (viz níže).

V původním ethanolovém extraktu podle předpokladů (Willför et al., 2003) významně dominovaly dva stereoisomery HMR, tvořící 45,5 % hmotnosti sušiny extraktu (**tab. 12**). V porovnání s HMR byly všechny ostatní lignany v extraktu zastoupeny v menší míře. Druhým nejhojněji obsaženým lignanem byl sekoisolariciresinol (SEC) se 4,3 %, následovaný 7*S*-todolaktolem s obsahem 2,6 %. Další epimer, 7*R*-todolaktol, zaujímal 0,7 % sušiny extraktu. 7*S*-Isoliovil byl identifikován jako druhá nejdominantnější sloučenina v 7*S*-todolaktolové frakci smrku pichlavého (*Picea pungens*) (Willför et al., 2005). Podobný jev byl pozorován i v extraktu smrku ztepilého (*P. abies*), kdy sloučenina s podobným hmotnostním spektrem jako 7*S*-todolaktol, eluovala ve stejné frakci těsně za 7*S*-todolaktolem, a jde tedy pravděpodobně o 7*S*-isoliovil. Sloučenina ve stejné frakci jako 7*R*-todolaktol, elující hned za touto látkou a s podobným hmotnostním spektrem jako další isoliovil, je pravděpodobně 7*R*-isoliovil (hmotnostní spektra jsou zobrazena níže). Hmotnostní spektra těchto látek jsou také velmi podobná již dříve publikovaným Willförem et al. (2005).



Obrázek 14. GC-FID chromatogram silylovaného extraktu získaného ze suku smrku ztepilého po částečném odstranění HMR srážením octanem draselným. Popis píku označeného číslem 18 je uveden v souhrnné *tabulce 12*.

Dříve identifikované lignany zaujímaly 58 % hmotnosti extraktu, zatímco nové lignany tvořily dohromady 6,5 %. Zbývající podíl lignanů zahrnoval částečně seskvimery, dimery a polymery lignanů (oligomery) (Willför et al., 2003, 2004b,c). Díky komplexnímu charakteru analyzovaného extraktu byly některé sloučeniny schovány překrývajícími se píky. Proto i identifikace takto nedokonale rozdělených látek byla pomocí GC-MS obtížná. K tomu nepřispěl ani fakt horšího rozlišení dosaženého pomocí GC-MS v porovnání s GC-FID (díky užití helia jako nosného plynu u GC-MS v porovnání s vodíkem u GC-FID) a tedy i problematické zrcadlení obou chromatogramů. Dále i relativní intenzity píků nejsou u GC-FID a GC-MS srovnatelné vzhledem k tomu, že u GC-MS jsou relativní intenzity píků závislé na hmotnostní fragmentaci molekul.

Tabulka 12. Popis s identifikací jednotlivých lignanů/píků pro chromatogramy znázorněné na obrázcích 14, 15, 17 a 21.

Označení píku nebo sloučeniny	Sloučenina	RRT ¹	% ²
1	Neidentifikována ^a	0,698	Stopy
2	Neidentifikována ^b	0,777	Stopy
3	Neidentifikována ^a	0,784	0,03
4	Neidentifikována ^b	0,788	0,14
	7 <i>R</i> -Todolaktol ^c	0,794	0,06
5	Neidentifikována ^a	0,805	0,03
	Cyklolariciresinol ^d	0,813	0,12
6	Neidentifikována ^b	0,817	Stopy
7	Neidentifikována ^a	0,822	0,03
8	Neidentifikována	0,827	DNP
	Sekoisolariciresinol ^d	0,828	4,35
9	Neidentifikována ^b	0,828	DNP
	7 <i>S</i> -Todolaktol ^d	0,833	2,56
10	Neidentifikována ^d	0,834	DNP
	7 <i>R</i> -Isoliovil ^e	0,835	0,43
11	Neidentifikována	0,838	DNP
	7 <i>S</i> -Isoliovil ^f	0,840	1,10
	7'-Hydroxy-lariciresinol (lignan A) ^g	0,853	1,11
12	Neidentifikována ^b	0,853	DNP
13	Neidentifikována ^a	0,854	DNP
	MR ^d	0,855	0,80
14	Neidentifikována	0,858	0,11
	HMR1 ^d	0,866	16,0
15	Neidentifikována	0,867	DNP
	HMR2 ^d	0,871	29,5
	9'-Hydroxy-lariciresinol 1 ^h	0,872	0,49
	α-Conidendrin ^d	0,876	2,03
	9'-Hydroxy-lariciresinol 2 ^h	0,878	0,70
	Lariciresinol ^d	0,889	1,05
16	Neidentifikována ⁱ	0,898	0,07
17	Neidentifikována	0,903	0,03
	iso-HMR ^d	0,911	2,37
	Pinoresinol ^d	0,914	0,13
18	7'-Oxolariciresinol ^j	0,926	0,16
19	Didehydro-divanillyl tetrahydrofuran ^j	0,794	ND
20	7-Hydroxy-divanillyl tetrahydrofuran ^j	0,805	ND
21	Todolaktol B ^j	0,807	ND
22	Neidentifikována ⁱ	0,880	ND
23	Anhydro-liovil ^j	0,881	ND

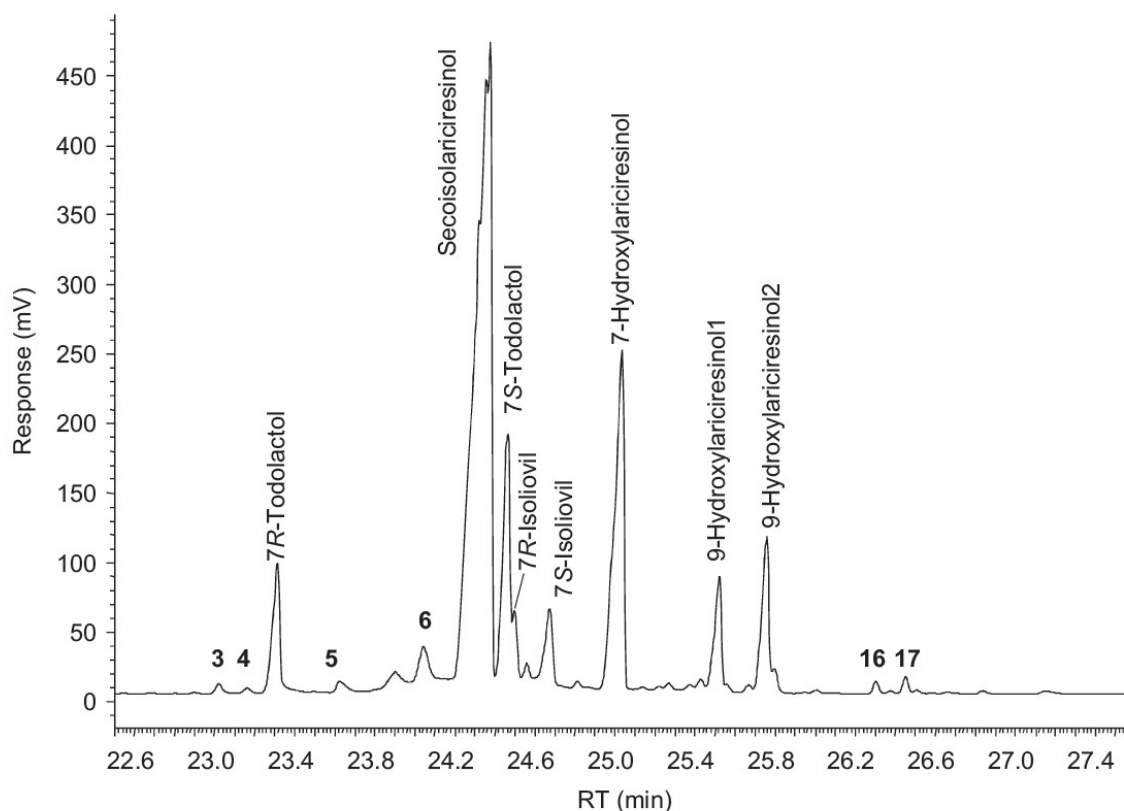
Popis k **tabulce 12**: ¹RRT - relativní retenční čas vztažený k betulinolu. %² Procentuální obsah sloučeniny v původním ethanolovém extraktu suku smrku ztepilého vyjádřeného v sušině extraktu.

^aHmotnostní spektrum (MS) liiovilového typu (dominantní MS fragment m/z 297 bez indikace isoliovilu/todolaktolu nebo 7'-hydroxylariciresinolu). ^bMS isoliovilového nebo todolaktolového typu (dominantní fragment m/z 297 a fragment m/z 484). ^cIdentifikace založena na porovnání MS sloučeniny 7S-todolaktolu a na základě NMR spektra. ^dIdentifikace založena na porovnání RRT a MS autentické sloučeniny. ^eIdentifikace založena na porovnání s MS dříve identifikovaného 7S-isoliovilu (Willför et al., 2005) a na základě NMR spektra. ^fIdentifikace založena na porovnání MS a NMR spektra dříve identifikovaného 7S-isoliovilu (Willför et al., 2005). ^gIdentifikace založena na porovnání s MS dříve identifikovaného lignanu A (Ekman, 1976) a na základě NMR spektra. ^hIdentifikace založena na základě NMR spektra a interpretace MS. ⁱMS 9'-hydroxylariciresinolového typu (dominantní fragmenty m/z 324 a 340). ^jPředběžná identifikace.

DNP = determination not possible – stanovení nebylo možné vzhledem k překrytí píků; ND = not detectable – nebylo detekováno v původním extraktu.

5.2.1.2 Extrakt rozdělený pomocí flash chromatografie

Pomocí analýzy GC-MS byly neznámé lignany todolaktolového typu identifikovány ve třech frakcích získaných z flash chromatografie. Frakce byly eluovány mobilní fází složenou z 60 % acetonu v cyklohexanu nebo fází o složení 8 % ethanol v dichlormethanu. Na **obrázku 15** je znázorněn GC-FID chromatogram jedné ze tří aceton-cyklohexanové frakce o složení 60:40 (v.v⁻¹). Přečištěním extraktu pomocí flash chromatografie byly odstraněny tyto lignany: α -conidendrin, HMR, MR, iso-HMR a lariciresinol a cílené lignany tak významněji vynikly. Frakce přečištěná flash chromatografií tak obsahovala SEC jako dominující lignan, dále 7'-hydroxylariciresinol, 7S- a 7R-todolaktol, 7S- a 7R-isoliovil, dva stereoisomery 9'-hydroxylariciresinolu a několik minoritních lignanů. Identifikace těchto lignanů bude diskutována níže.



Obrázek 15. GC-FID chromatogram silylované frakce získané pomocí flash chromatografie obsahující cílené lignany. Popis očíslovaných píků je zřejmý ze souhrnné tabulky 12.

5.2.1.3 Frakce získané pomocí preparativní HPLC

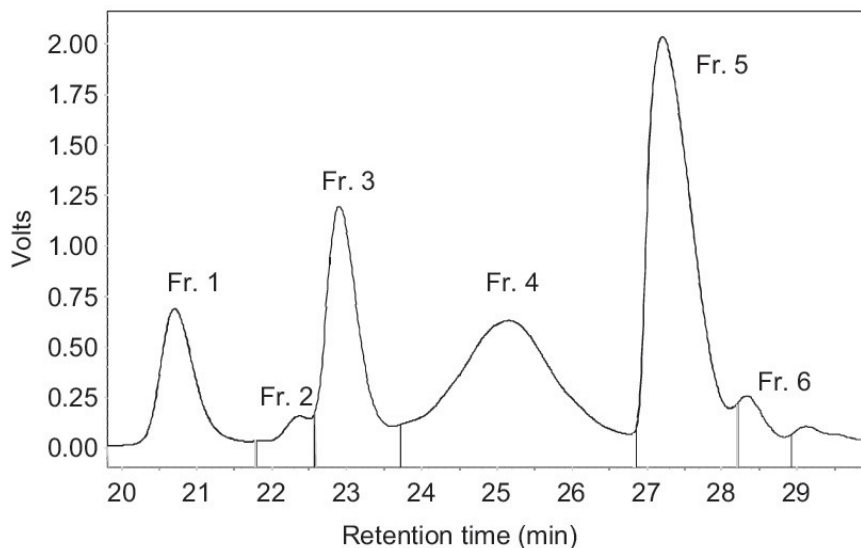
Spojené tři frakce z flash chromatografie byly znovu přečištěny pomocí preparativní chromatografie. Bylo sbíráno celkem šest frakcí (*obr. 16*). Na *obrázku 17* jsou znázorněny GC-MS chromatogramy rozdělených HPLC frakcí. Jako čisté sloučeniny byly vyizolovány lignany 7'-hydroxylariciresinol a sekoisolariciresinol ve frakcích číslo 3 a 5, zatímco cílené lignany byly izolovány ve směsích. Frakce 1 (*obr. 17 a*) obsahovala 7*R*-todolaktol jako dominantní sloučeninu, což bylo ověřeno také pomocí NMR. Dále tato frakce obsahovala 7*R*-isoliovil a předběžně byl identifikován jeden z liovilů (**3**) a dva stereoisomery todolaktolu nebo isoliovilu (**2** a **9**).

Ve druhé HPLC frakci (*obr. 17 b*) byly dominujícími sloučeninami 7'-hydroxylariciresinol (zvaný lignan A; Ekman, 1976), jehož struktura byla potvrzena NMR, lignan předběžně identifikovaný jako stereoisomer 9'-hydroxylariciresinolu (**16**) a neznámý lignan (**17**), jehož hmotnostní spektrum naznačuje molekulovou hmotnost 678 Da, tedy o 14

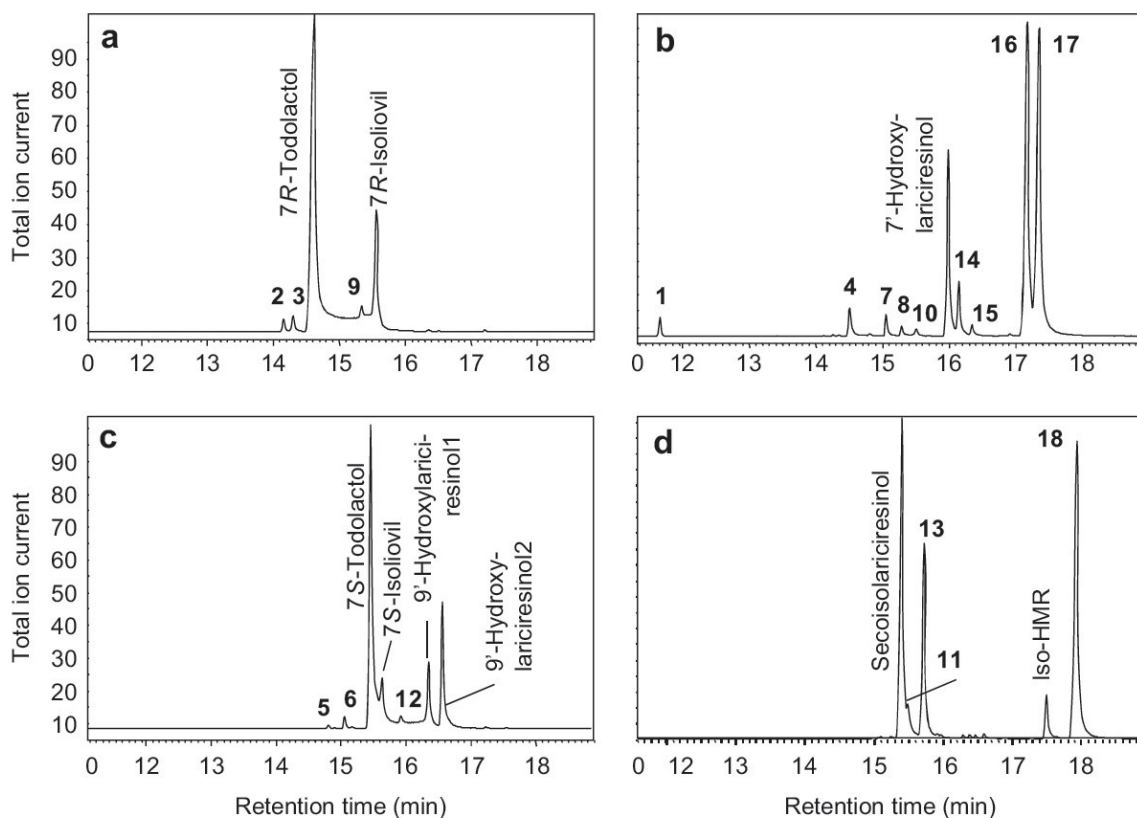
hmotnostních jednotek více než liovily, todolaktoly, isoliovily a 7'- a 9'-hydroxyariciresinoly. Dále jsou zde podle hmotnostních spekter obsaženy dva lignany todolaktolového typu (**4** a **10**), dva lignany liovilového typu (**1** a **7**), jeden pravděpodobně s molekulovou hmotností 736 Da (**8**) a jeden s 678 Da (**14**), a jeden lignan, který pravděpodobně obsahuje hydroxylovou skupinu na C-7 a C-9 (**15**).

Obrázek 17 c ukazuje chromatogram izolované frakce 4, ve které byly zakoncentrovány 9'-hydroxyariciresinoly, ačkoliv dominantním lignanem byl 7*S*-todolaktol. Identifikace 7*S*-todolaktolu a 9'-hydroxyariciresinolů byla potvrzena pomocí NMR. Přestože bylo testováno několik různých gradientů a kolon, vyizolovat oba 9'-hydroxyariciresinoly ze směsi jako čisté sloučeniny se nezdařilo. Sloučeniny v této frakci nebyly separovány ani na analytické koloně, ani po acetylaci směsi. Dále byly v této frakci na základě hmotnostních spekter identifikovány dva stereoisomery isoliovilu nebo todolaktolu (součiny **6** a **12**).

Ve frakci č. 6 (**obr. 17 d**) byl dominující SEC, následovaný předběžně identifikovaným 7'-oxolariciresinolem (**18**) a lignanem liovilového typu (**13**), identifikace byla provedena na základě jejich hmotnostních spekter. V této frakci byl též obsažen neznámý lignan (**11**) s hydroxylovou skupinou v poloze C-7 a s molekulovou hmotností 650 Da.



Obrázek 16. HPLC preparativní chromatogram kombinovaných frakcí z flash chromatografie obsahující cílené lignany.



Obrázek 17. GC-MS chromatogramy silylovaných preparativních HPLC frakcí. (a) Frakce 1; (b) frakce 2; (c) frakce 4; (d) frakce 6. Popis očíslovaných píků je znázorněn v souhrnné tabulce 12.

5.2.2 Identifikace struktury lignanů

5.2.2.1 Interpretace NMR spekter

Pomocí metody NMR bylo analyzováno pouze několik málo sloučenin, které se podařilo izolovat během preparativní kapalinové chromatografie. Jak je zřejmé z *obr. 16* a *17*, rozdělení jednotlivých sloučenin pomocí preparativní HPLC nebylo dokonalé, zároveň cílené lignany vykazovaly značnou nestabilitu ve vodném roztoku izolované preparativní HPLC frakce č. 4 (o transformačních rancích je pojednáno v *kapitole 5.2.2.3*). Analýzou NMR (*tab. 13-15*) byla potvrzena struktura těchto lignanů: 7*S*-todolaktolu a 7*R*-todolaktolu, 7*S*-isoliovilu, dvou stereoisomerů 9'-hydroxylariciresinolu, a 7'-hydroxylariciresinolu, které byly obsaženy v HPLC frakcích číslo 1, 3 a 4.

Při rozpouštění alikvotu frakce 4 z preparativní HPLC ve směsi acetonu- d_6 a $CDCl_3$ se vytvořila sraženina. Sraženina byla dále rozpuštěna v $DMSO-d_6$ a analyzována pomocí NMR.

NMR analýza roztoku acetonu- CDCl_3 ukázala přítomnost čtyř hlaních sloučenin a stopy několika málo dalších látek, což odpovídalo také analýze pomocí GC na **obr. 17 c**. Naproti tomu sraženina odpovídala relativně čistému stereoisomeru todolaktolu, ale chemické posuny ^1H -spekter se značně odlišovaly od spekter $7S$ -todolaktolu v acetonu- d_6 dříve publikované Willförem et al. (2005) nebo Grougnetem et al. (2006). Matoucí je dále námi objevená skutečnost, že dříve publikovaná NMR data (Willför et al., 2005) náleží $7R$ -todolaktolu, kdežto přesné prostorové uspořádání měřené pomocí rentgenové krystalografie odpovídá $7S$ -todolaktolu. Porovnáním dříve publikovaných dostupných dat s analýzou retenčních časů GC byl stereoisomer identifikován jako $7S$ -todolaktol. Rozdíl v chemických posunech ^1H -spekter publikovaných Grougnetem et al. (2006) byl připsán výraznému vlivu rozpouštědla při použití DMSO. Při skladování vzorku $7S$ -todolaktolu v DMSO po dobu 24 hodin byla pozorována izomerace této sloučeniny na směs dalších čtyř sloučenin. Díky velmi dobré separaci signálů jednotlivých sloučenin, jak ve ^{13}C tak ^1H NMR spektrech, se nám podařilo identifikovat všechny sloučeniny obsažené ve směsi. Identifikovány byly $7R$ -todolaktol a $7S$ -todolaktol, jejich struktura je znázorněna na **obr. 5** a NMR data v **tabulce 13**, dále byly v této směsi identifikovány dva stereoisomery 9'-hydroxylariciresinolu. Oba 9'-hydroxylariciresinoly ukázaly interakční konstanty ($J_{\text{H9-H8}}$) 4,6 a 4,7 Hz, což naznačuje stejné prostorové uspořádání na C-9' (**tab. 14**). Modelováním molekul bylo dále prokázáno, že R -konfigurace by měla mít za následek úhel mezi 90° a 130° , což je v souladu s pozorovanou nízkou interakční konstantou. Pro acetátovou formu 9' R -9'-hydroxylariciresinolu byla v publikaci Barrera et al. (1994) uvedena a pozorována nízká interakční konstanta jako singlet. Došli jsme tedy k závěru, že isomery 9'-hydroxylariciresinolu jsou epimery na C-7, struktura isomerů je znázorněna na **obr. 5**. Interakční konstanty H-7 ($J_{\text{H7-H8}}$) byly 9,1 a 3,1 Hz. Pro jejich acetylované deriváty byla uvedena interakční konstanta 9,8 Hz a pro lariciresinol byla hodnota 6,6 Hz (Barrero et al., 1994). Proto byla také sloučenině s vysokou interakční konstantou připsána $7S$ konfigurace, a druhé $7R$ konfigurace.

Tabulka 13. NMR spketroskopická data pro 7*S*-todolaktol A a 7*R*-todolaktol A (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Pozice	7 <i>S</i> -Todolaktol A		7 <i>R</i> -Todolaktol A	
	δ_C ; Typ	δ_H (J v Hz)	δ_C	δ_H (J v Hz)
1	136,4; C		135,8	
2	110,8; CH	6,83; d (1,7)	111,1	6,88; d (1,8)
3	147,7; C		147,9-147,6	
4	145,9; C		146,1-145,7	
5	115,6; CH	6,70; d (8,0)	115,2-115,9	6,71-6,68; d (8,0) ^a
6	119,0; CH	6,67; dd (8,0; 1,7)	119,4	6,71 ^a
7	74,6; C	4,46; d (7,7)	74,5	4,49; d (6,7)
8	52,0; CH	2,16; m (7,7; 8,6; 8,7; 3,6)	49,4	2,04 ^a ; m
H-9a/H-9b	68,0; CH ₂	3,52/3,54 (dd) (15,7; 8,6/15,7; 8,7)	67,9	3,71/3,47 ^a (6,9; 8,5)
OMe	55,9; CH ₃	3,75; s	55,9-56,0	3,75-3,72; s
1'	131,8; C		133,1	
2'	113,4; CH	6,69; d (1,8)	113,4	6,71; d (1,8)
3'	147,7; C		147,9-147,6	
4'	145,0; C		145,1-144,7	
5'	115,4; CH	6,65; d (8,0)	115,2-115,9	6,65; d (8,0)
6'	121,4; CH	6,53; dd (8,0; 1,8)	121,1	6,56; dd (1,8; 8,0)
H-7'a/H-7'b	39,2; CH ₂	2,58; 2,39; dd (13,9; 4,9/13,9; 10,2)	34,3	2,64/2,54; dd (7,4; 13,9/7,9; 13,9)
8'	50,8; CH	2,32; m (1,2; 4,9; 10,2; 3,6)	48,3	2,40 ^a ; m
9'	102,0; CH	4,95; d (1,2)	100,5	5,01; d (bs) (0,2)
OMe'	55,9; CH ₃	3,73; s	55,9-56,0	3,75-3,72; s

^aPřekrývající se signály.

Ve frakci č. 3 z preparativní HPLC byl v čisté formě izolován 7'-hydroxylariciresinol, jehož struktura byla potvrzena pomocí NMR (**tab. 15**). ¹H NMR spektra ukázaly dva dublety při 4,44 ppm (H-7) a 4,47 ppm (H-7') s interakčními konstantami 8,8 a 9,2 Hz a korespondující ¹³C NMR signály při 84,4 ppm (C-7) a 77,0 ppm (C-7'). To poukazuje na přítomnost benzylového alkoholu a benzylového etheru a tedy strukturu 7'-hydroxylariciresinolu. Tento stereochemický vztah byl dále studován pomocí spekter NOE-diff, 1D-NOESY a NOESY. H-8 ukázal čistou korelaci k H-9 a H-7'. Dále byla pozorována korelace mezi H-8' a H-9, H-7'. Ačkoliv mezi H-8 a H-8' byla v NOESY spektru nalezena pouze slabá korelace, naznačuje to trans polohy mezi pozicemi 8 a 8'. Nedostatek NOE interakcí mezi H-7 a H-8 představuje trans isomerii, například všechny velké skupiny ve všech trans-substituentech THF kruhu jsou v ekvatoriální rovině. Protony H-7 a H-8' v axiální rovině také vykazují NOE interakce v NOESY spektrech. V souhrnu může být tedy relativní konfigurace demonstrována jako 7*S*, 8*R*, 8'*S* a prostorové uspořádání na C-7' jako *R* na základě NOE interakcí s H-8 a vysokou interakční konstantou, která je anti-parallelní k H-8'.

Struktura je zobrazena na **obr. 5**. Pokud je nám známo, tato relativní konfigurace je v literatuře popsána poprvé.

Optická rotace 7'-hydroxylariciresinolu byla $[\alpha]_D = -13,1^\circ$ (koncentrace $1,76 \text{ mg.l}^{-1}$, v methanolu), což koresponduje s již dříve publikovanými daty pro tento lignan ve smrku ztepilém (Andersson et al., 1975).

Tabulka 14. NMR spketrokopická data pro (9'R,7R)-9'-hydroxylariciresinol a (9'R,7S)-9'-hydroxylariciresinol (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Pozice	(9'R,7R)-9'-Hydroxylariciresinol		(9'R,7S)-9'-Hydroxylariciresinol	
	δ_C ; Typ	δ_H (J v Hz)	δ_C	δ_H (J v Hz)
1	135,1; C		135,9	
2	111,5; CH	7,1; d (1,9)	110,1	6,81; d (2,0)
3	147,9-147,6; C		147,9-147,6	
4	146,1-145,7; C		146,1-145,7	
5	115,2-115,9; CH	6,71; d (8,1)	115,2-115,9	6,71-6,68 ^a
6	119,7; CH	6,77; dd (1,9; 8,1)	118,2	6,67; dd (2,0; 8,0)
7	82,3; CH	4,56; d (9,1)	82,3	4,96; d (3,1)
8	51,5; CH	2,47 ^a ; m	46,8	2,47 ^a ; m
H-9a/H-9b	58,2; CH ₂	3,6/3,38 (dd) (10,4; 9,5/10,4; 5,3)	60,9	3,62/3,72 ^a
OMe	55,9-56,0; CH ₃	3,75-3,72; s	55,9-56,0	3,75-3,72; s
1'	131,8; C		132,1	
2'	113,4; CH	6,76; d (2,0)	113,4	6,82; s
3'	147,9-147,6; C		147,9-147,6	
4'	145,1-144,7; C		145,1-144,7	
5'	115,2-115,9; CH	6,71-6,68 ^a	115,2-115,9	6,71-6,68 ^a
6'	121,4; CH	6,59; d (2,0; 8,0)	121,0	6,62; d (2,0; 8,0)
H-7'a/H-7'b	30,9; CH ₂	2,80/2,27; dd (4,5; 13,7/11,9; 13,7)	30,5	3,68/3,64 ^a
8'	49,5; CH	2,4 ^a ; m	50,6	2,04 ^a ; m
9'	98,4; CH	4,49; d (4,6)	98,5	5,22; d (4,7)
OMe'	55,9-56,0; CH ₃	3,75-3,72; s	55,9-56,0	3,75-3,72; s

^aPřekrývající se signály.

Tabulka 15. NMR spektroskopická data pro 7'-hydroxyliciresinol (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Pozice	7'-Hydroxyliciresinol	
	δ_C ; Typ	δ_H (J v Hz)
1	134,5; C	
2	110,8; CH	7,03; d (1,7)
3	148,0; C	
4	146,7; C	
5	115,1; CH	6,79; d (8,0)
6	119,2; CH	6,84; dd (1,7; 8,0)
7	84,8; CH	4,44; d (8,8)
8	56,5; CH	2,24; m (8,0; 4,2)
H-9a/H-9b	63,1; CH ₂	3,67/3,62; dd (10,5; 4,2/8,0; 10,5)
OMe	56,4; CH ₃	3,85; s
1'	136,4; C	
2'	110,6; CH	6,99; d (8,0)
3'	148,0; C	
4'	146,7; C	
5'	115,0; CH	6,78; d (8,0)
6'	120,2; CH	6,82; dd (1,7; 8,0)
7'	77,0; CH	4,47; d (9,2)
8'	70,7; CH	2,59; q (8,0)
9'	70,7; CH ₂	3,67/3,51; t/dd (8,5; 4,2/8,5)
OMe'	56,4; CH ₃	3,85; s

5.2.2.2 Interpretace hmotnostních spekter

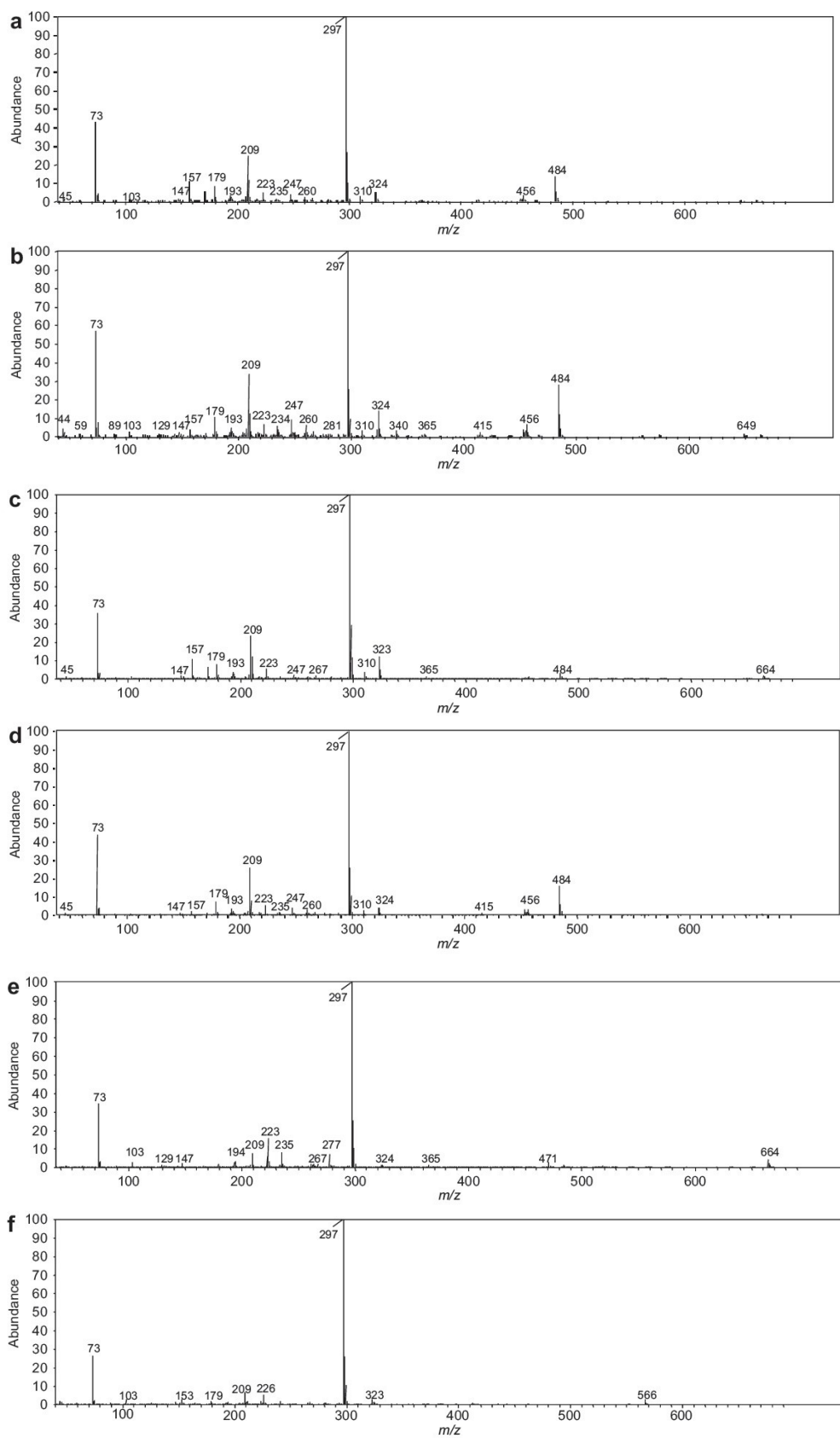
Identifikace cílených lignanů interpretací hmotnostních spekter byla výrazně ztížena absencí či pouze nepatrným molekulárním iontem u většiny látek při využití elektronové ionizace (EI-MS). Ale ani využití chemické ionizace GC-CI-MS nevedlo k jasnému rozlišení molekulárních iontů vzhledem k nestabilitě cílených lignanů.

Ze souboru studovaných lignanů jsou známy hmotnostní fragmentace pro 7'-hydroxyliciresinol [trimetylsilyl (TMS) ether], publikované Ekmanem (1976) a Yamamotem et al. (2004). Zde se tedy budeme zabývat fragmentací pro TMS ethery todolaktolu, isoliovilu, liovilu a 9'-hydroxyliciresinolu.

Todolaktoly, isoliovily, 7'-hydroxyliciresinoly a liovily mají hydroxylovou skupinu na C-7 nebo C-7' (*obr. 5*) a ukazují tak dominantní fragment m/z 297 [G-CH-OTMS]⁺ (G=guajacylový kruh) (*obr. 18*). Navržené MS fragmentační cesty těchto typů lignanů jsou zobrazeny na *obrázku 20*.

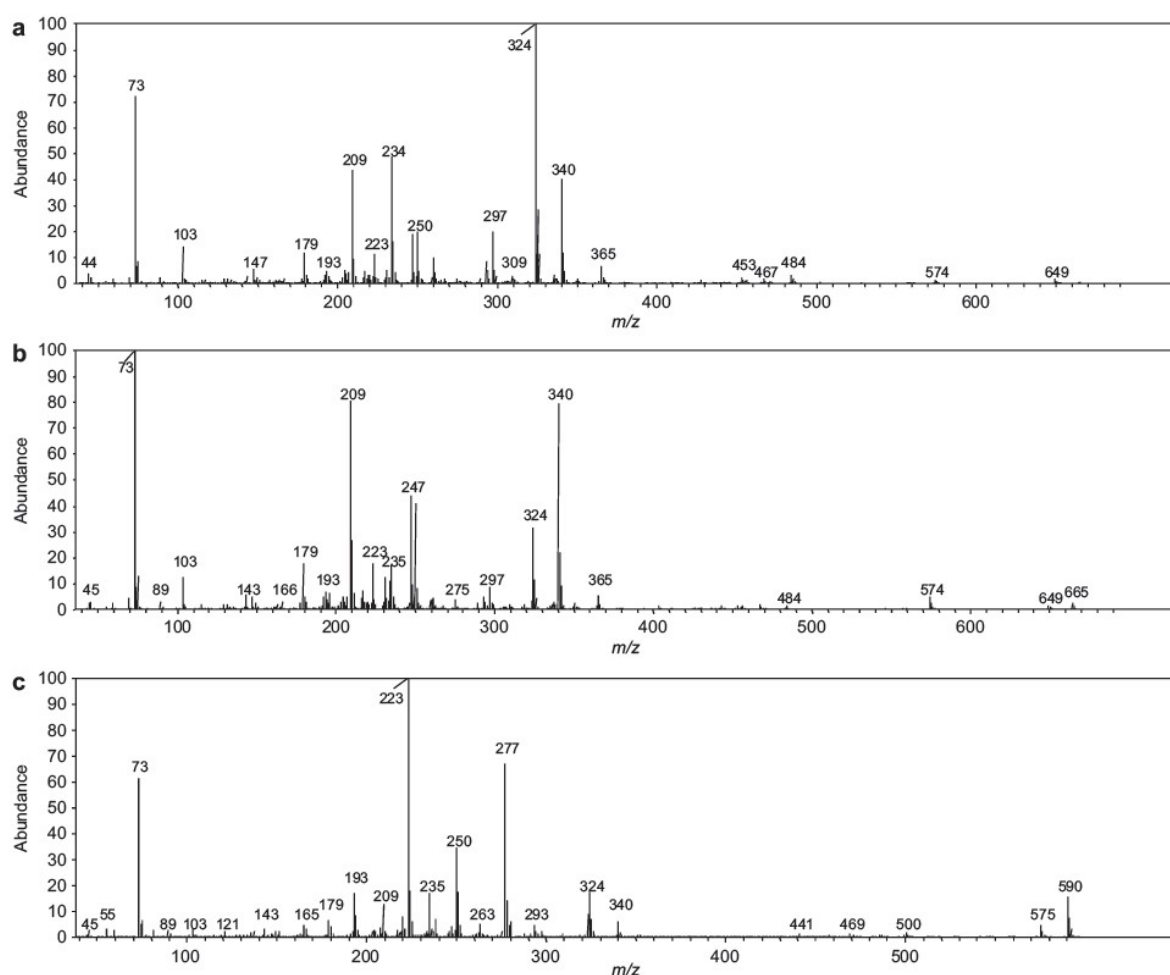
Hmotnostní spektrum 7*S*-todolaktolu (*obr. 18 a*) je téměř totožné se sepektry pro isolioivily (*obr. 18 b* a *18 d*). 7*R*-todolaktol (*obr. 18 c*) se od 7*S*-todolaktolu a isoliovilů liší menší intenzitou fragmentů *m/z* 484 (M-2 TMSOH) a *m/z* 456 a místo fragmentu *m/z* 324 obsahuje fragment *m/z* 323 [G-C(OTMS)=CH-CH₂]⁺ (Ekman, 1976) (*obr. 20*). Mezi hmotnostmi spektry todolaktolů a isoliovilů můžeme pozorovat dvě mírné odlišnosti. Fragment *m/z* 484 je více intenzivní v hmotnostních spektrech isoliovilů a fragment *m/z* 157 je naopak méně intenzivní. V hmotnostním spektru 7'-hydroxylariciresinolu je fragment *m/z* 484 zanedbatelný (*obr. 18 e*), pravděpodobně z důvodu vazby dalšího hydroxyly na C-9 připojením na sekundární nikoliv terciální atom uhlíku. Todolaktoly, isolioivily a 7'-hydroxylariciresinoly obsahují hydroxylovou skupinu na C-9 nebo C-9', tvoří tak fragment *m/z* 324 (Ekman, 1976) (*obr. 20*). V předběžně identifikovaných liovilech jsou obsaženy hydroxylové skupiny na C-7 a C-7' a proto hmotnostní spektra neobsahují fragment *m/z* 484, pravděpodobně také z důvodu absence hydroxylové skupiny na THF kruhu.

Mezi hmotnostním spektrem 7'-hydroxylariciresinolu a předběžně identifikovanými liovily je velmi malý rozdíl (*obr. 18 e* a *18 f*). 7'-Hydroxylariciresinol obsahuje fragment s nízkou intenzitou *m/z* 223 [G-C≡O]⁺ (Ekman, 1976, Yamamoto et al., 2004) (*obr. 20*), který chybí v MS liovilů, protože neobsahují kyslík na α uhlíku. Mezi hmotnostními spektry 7'-hydroxylariciresinolu a isoliovilů či todolaktolů jsou také patrné rozdíly. V hmotnostním spektru 7'-hydroxylariciresinolu je fragment *m/z* 223 více intenzivní než fragment 209 (Ekman 1976, Yamamoto et al., 2004) (*obr. 18 e*), kdežto pro todolaktoly a isolioivily to platí opačně (*obr. 18 a-d*). Podařilo se nám identifikovat několik různých lignanů, kromě známého 7'-hydroxylariciresinolu, zejména todolaktoly a isolioivily s typicky dominantním fragmentem *m/z* 297, což platilo pro 11 z 15 neznámých lignanů. Sedm z těchto lignanů obsahovaly fragment s nízkou intenzitou *m/z* 484 (lignany **2**, **4**, **6**, **9**, **10**, **11** a **12**) a pravděpodobně se jedná o todolaktoly a/nebo isolioivily, které se liší prostorovým uspořádáním na uhlících C-8 a C-8'. Pět lignanů **1**, **3**, **5**, **7** a **13** s dominantním *m/z* 297 neobsahuje fragment *m/z* 484. Jedná se pravděpodobně o liovily, které se neliší jen konfigurací na C-7 a C-7', ale také na uhlících C-8 C-8'.



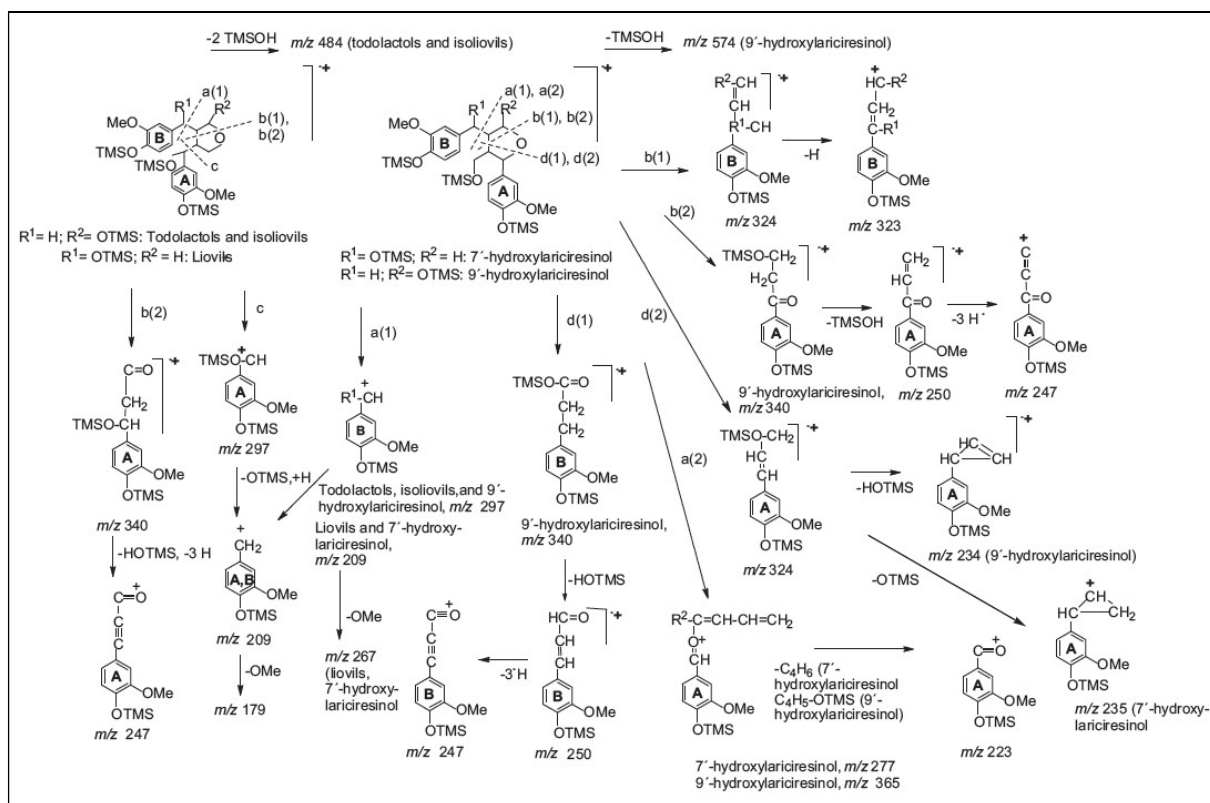
Obrázek 18. Hmotnostní spektra trimethylsilyl (TMS) etherů (a) 7*S*-todolaktolu, (b) 7*S*-isoliovilu, (c) 7*R*-todolaktolu, (d) 7*R*-isoliovilu, (e) 7'-hydroxyariciresinolu a (f) liovilu (předběžně).

Hmotnostní spektra 9'-hydroxylariciresinolů (*obr. 19 a* a *19 b*) obsahují jako jeden z typických fragmentů m/z 324 (*obr. 20*), v porovnání s todolaktoly a isoliolivy a 7'-hydroxylariciresinoly, je tento fragment daleko více intenzivní. Dalším typickým fragmentem 9'-hydroxylariciresinolu je m/z 340 (*obr. 20*). Intenzita fragmentu m/z 324 v porovnání s m/z 340 je u obou 9'-hydroxylariciresinolů rozdílná. U jednoho z identifikovaných 9'-hydroxylariciresinolů je intenzivní fragment m/z 324, zatímco u druhého je více intenzivní fragment m/z 340. Absolutní konfigurace obou 9'-hydroxylariciresinolů byla stanovena na základě analýzy NMR. Zdá se, že prostorové uspořádání na uhlíku C-7 ovlivňuje formování fragmentu m/z 340, například rozštěpením vazby mezi kyslíkem na THF kruhu a C-7 nebo C-9'. 9'-Hydroxylariciresinoly dále obsahují intenzivní fragmenty m/z 250 a m/z 247, které jsou pravděpodobně tvořeny rozštěpením THSOH z fragmentu m/z 340.



Obrázek 19. Hmotnostní spektra TMS etherů (a) 9'-hydroxylariciresinolu1, (b) 9'-hydroxylariciresinolu2 a (c) 7'-oxolariciresinolu (18) (předběžně).

Ve frakcích z preparativní HPLC byly detekovány další lignany (**8**, **14**, **15** a **17**), které ukazovaly rozdílná hmotnostní spektra od výše identifikovaných lignanů. Sloučenina **18** je pravděpodobně 7'-oxolariciresinol (*obr. 19c*), který byl dříve identifikován v bylině *Vladimiria souliei* a byla označena názvem vladinol D (Tan et al., 1990). Hmotnostní fragmentace tuto strukturu podporuje. Velmi intenzivní je fragment m/z 223 [G-C≡O]⁺ a fragmenty m/z 340, 324, 277 a 250 naznačují strukturu lariciresinolu (*obr. 20*).

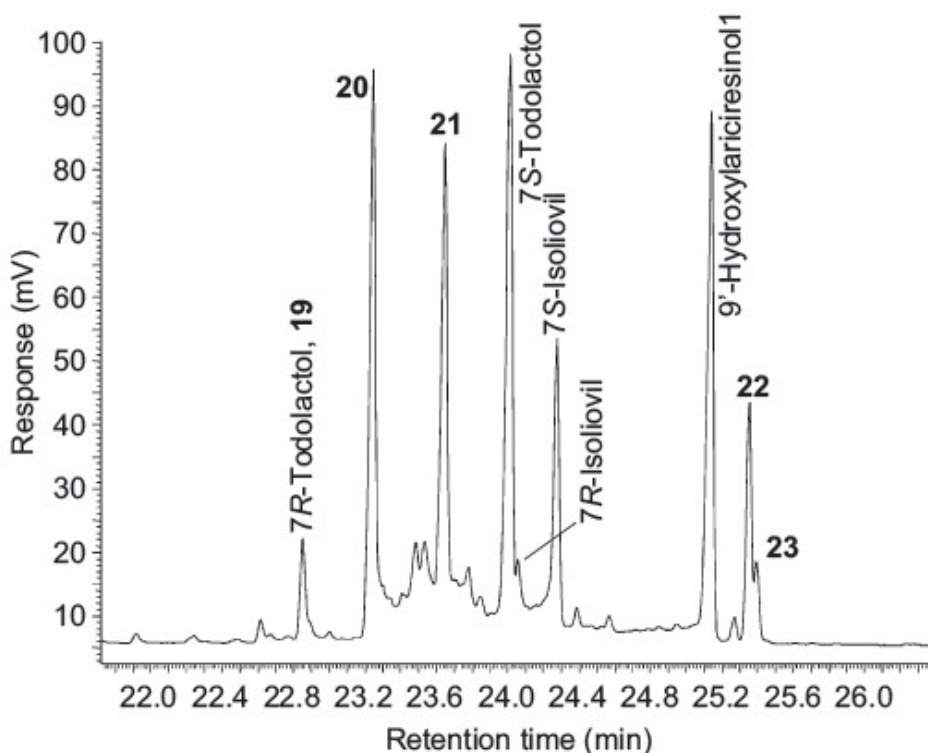


Obrázek 20. Navržené hmotnostní fragmentace pro todolaktoly, isolioivly, liovily, 7'-hydroxyariciresinoly a 9'-hydroxyariciresinoly.

5.2.2.3 Stabilita 7S-todolaktolu A v roztoku

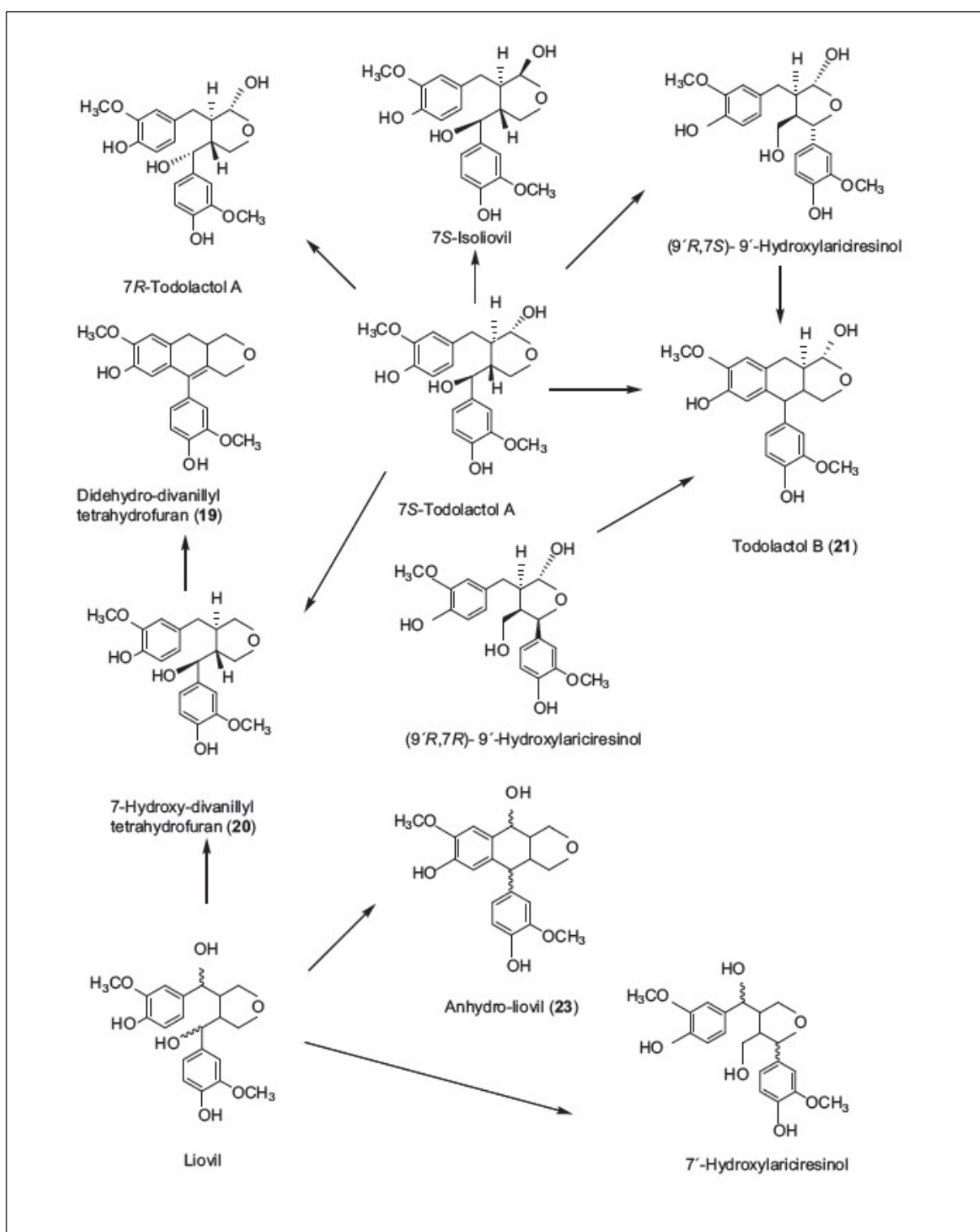
Jak již bylo dříve uvedeno 7S-todolaktol, který byl dominujícím lignanem mezi neznámými lignany a zároveň který byl také dominantním lignanem v izolované frakci 4 z preparativní HPLC, byl shledán velmi nestabilní sloučeninou jak ve vodném roztoku, tak v DMSO. Tento poznatek je velmi pozoruhodný, jelikož 7R-todolaktol se zdá být ve vodném roztoku (při pH 4) stabilní, stejně tak 7'-hydroxyariciresinol. Eklund et al. (2004b) zaznamenali rozdíl mezi stabilitou 7S a 7R epimerů HMR a také v tomto případě byla zjištěna menší stabilita 7S epimeru.

Na základě analýzy NMR bylo zjištěno, že v roztoku DMSO byly z čisté sloučeniny 7*S*-todolaktolu tvořeny pouze 7*R*-todolaktol a dva identifikované 9'-hydroxylariciresinoly. Při skladování frakce 4 z preparativní HPLC při pH okolo 4 (v 0,1 % kyselině octové) při teplotě místnosti vzrostl poměr 7*S*-isoliovilu, 9'-hydroxylariciresinolu1 a lignanu, u kterého bylo zaznamenáno podobné hmotnostní spektrum jako u liovilů (**20**), druhý epimer 9'-hydroxylariciresinolu ze směsi vymizel a bylo vytvořeno několik nových lignanů (**obr. 21**).



Obrázek 21. GC-MS chromatogram po silylaci preparativní HPLC frakce 4 uchované v 0,1 % roztoku kyseliny octové při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Popis očíslovaných píků je znázorněn v souhrnné *tabulce 12*.

Probíhající reakční přeměny 7*S*-todolaktolu ve vodných roztocích mají s velkou pravděpodobností podobný průběh jako reakce probíhající u 7*S*-HMR (Eklund et al., 2004b), na **obrázku 22** jsou znázorněny navržené transformační reakce. Z tohoto poznatku také vychází předpoklad pro tvorbu 7*R*-todolaktolu. Bohužel nebylo možné tvorbu tohoto epimeru potvrdit, vzhledem k vytvoření dalších přeměněných produktů, které se vzájemně v GC chromatogramch se 7*R*-todolaktolem překrývaly. S ohledem na zvýšení poměru 7*S*-isoliovilu se dále zdá, že ve vodném roztoku probíhá epimerizace na C-9' uhlíku 7*S*-todolaktolu.

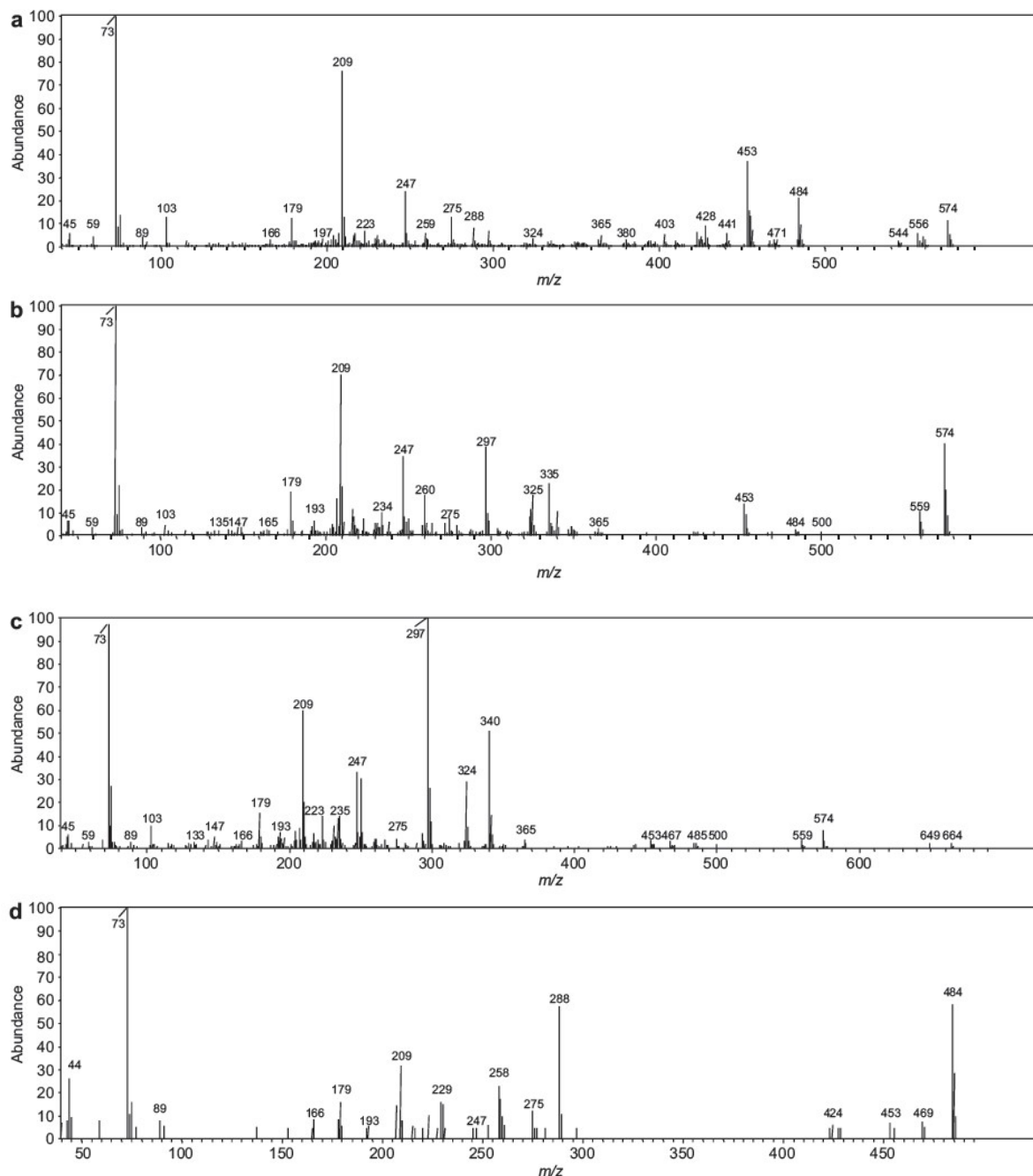


Obrázek 22. Navržené reakční přeměny lignanů, probíhající v roztoku preparativní HPLC frakce 4.

Dále také očekáváme, že dochází k tvorbě 9'-hydroxylariciresinolu, konkrétně 9*R*,7*S*-epimeru, podobně jako při tvorbě iso-HMR z HMR (Eklund et al., 2004b). Proto je také pravděpodobně prvním eluujícím lignanem 7*S*- epimer 9'-hydroxylariciresinolu a druhým 7*R*- epimer. 7*R*-9'*R*-Hydroxylariciresinol se zdá být ve vodném roztoku také nestabilní. Tvoří pravděpodobně sloučeninu **21**, která je zřejmě dehydratovanou formou todolaktolu, dříve byla tato sloučenina popsána v literatuře s názvem todolaktol B (Ozawa a Sasaya, 1987). Tato přeměna koresponduje s tvorbou cyklolariciresinolu z lariciresinolu (Eklund et al. 2002). Na **obr. 23 a** je znázorněno hmotnostní spektrum tohoto lignanu. Lignan **21** mohl být vytvořen přímo z todolaktolu, podobně jako při tvorbě conidendrinu z HMR (Eklund et al., 2004b). Sloučenina **23** se zdá být podobná lignanu **21** (**obr. 23 a** a **23 b**). Tento lignan je tvořen při pH 4, ale ne při pH 2 nebo pH 9, dále obsahuje fragment m/z 297, který u lignanu **21** není obsažen. Je tedy možné, že je tato sloučenina dehydrogenovanou formou liovilu. S podobným hmotnostním spektrem jako mají 9'-hydroxylariciresinoly byl tvořen lignan **22**, který obsahuje dominantní fragment m/z 297 (**obr. 23 c**), jež značí hydroxylovou skupinu také na C-7 nebo C-7'. Lignany jako je todolaktol, isoliovily a 7'-hydroxylariciresinol mají fragmenty m/z 324 a 340 daleko méně intenzivní. Je tedy možné, že sloučenina **22** je dalším stereoisomerem 7'-hydroxylariciresinolu, který snáze tvoří fragmenty m/z 324 a 340 než známé stereoisomery. Tento další stereoisomer 7'-hydroxylariciresinolu mohl být vytvořen z některého liovilu přítomného ve vodném roztoku preparativní HPLC frakce 4. Sloučenina **19** zřejmě neobsahuje hydroxylové skupiny na C-7 a C-9, jak je patrné z **obr. 23 d**. Nejedná se o lignan anhydro-sekoisolariciresinol (divanillyl THF), protože ten v hmotnostním spektru obsahuje molekulární iont m/z 488. Podle hmotnostního spektra by se ale mohlo jednat o didehydrodivanillyl THF, vznikající odstraněním dvou molekul vody z todolaktolu. Fragment m/z 484 by mohl být molekulární iont a fragment m/z 288 mohl být vytvořen odstraněním trisubstituovaného guajacylového kruhu. Sloučenina **20** je pravděpodobně tvořena ze 7*S*-todolaktolu, proto se nejspíše nejedná o liovil. S větší pravděpodobností se jedná o 7-hydroxy-divanillyl THF, vytvořený odstraněním 9'-hydroxyly z todolaktolu. Tento lignan byl dříve popsán a zaznamenán v chebuli srdčité (*Tinospora cordifolia*) (Hanuman et al., 1986).

7*S*-todolaktol byl velmi nestabilní dokonce i při neutrálním pH (za pokojové teploty), kdy docházelo k okamžitému nárůstu sloučenin: 7*S*-isoliovilu, 7*S*-9'-hydroxylariciresinolu, sloučenině **19** a/nebo 7*R*-todolaktolu a dále sloučeniny **21**. Z nějakého důvodu docházelo k reakčním přeměnám v daleko větší míře při pH 4 než při pH 9 nebo pH 2. Po 24 hodinách

při pH 2 vzrostl poměr sloučeniny **19** a/nebo 7*R*-todolaktolu, naopak zastoupení sloučeniny **20** pokleslo, což naznačuje, že sloučenina **19** je pravděpodobně tvořena ze sloučeniny **20**. Při pH 9 ihned naroste obsah všech výše zmíněných sloučenin kromě látky **23**, ale po 24 hodinách obsah všech sloučenin zase poklesl. Jsou zřejmě nestabilní v zásaditém prostředí.



Obrázek 23. Hmotnostní spektra TMS etherů lignanů z preparativní HPLC frakce 4, skladované 24 h za pokojové teploty: (a) sloučenina 21, (b) sloučenina 23, (c) sloučenina 22, (d) sloučenina 19. Předběžně byly tyto lignany identifikovány jako todolaktol B (21), anhydroliovil (23), a stereoisomer 7'-hydroxylariciresinolu (22) a didehydro-divanillyl THF (19).

5.3 Stanovení lignanů v obilovinách a pseudocereáliích

Z pokusného pozemku Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byly v letech 2011 a 2012 sklizeny tři odrůdy pohanky seté, jmenovitě odrůda Jana (J), Pyra (P) a Špačinská (S) a v roce 2012 pohanka tatarská a v obou letech čtyři odrůdy prosa setého – Unikum (U), Veselopodoliaskoe (V, Veselop.), Omskoe (O) a Yantarnoe (E) s cílem identifikace lignanů a popisu jejich distribuce v jednotlivých částech rostlin. V době sklizně byly odebrány vzorky kořenů, stonků (slámy) a semen, přičemž z části semen – nažek pohanky a obilek prosa byly odděleny obalové vrstvy – slupky.

Analýza lignanů ve vybraných částech jednotlivých odrůd pohanky a prosa byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Byl proveden screening všech dostupných standardů lignanů (**kap. 4.1**) a následně vybraných extraktů všech částí pohanky – odrůdy Jana a prosa – Unikum (z roku 2011) pro identifikaci lignanů. Celkem bylo kvantifikováno 10 lignanů: cyklolariciresinol (CLAR), hydroxymatairesinol (HMR), lariciresinol (LAR), sekoisolariciresinol (SEC), α -conidendrin (CONI), pinoresinol (PIN), syringaresinol (SYR), matairesinol (MR), arctigenin (ARC) a dále derivát 7-oxomatairesinolu (dOMR), jehož přesná konfigurace bude v rámci dalších experimentů stanovena pomocí kapalinové chromatografie s detekcí nukleární magnetické resonance (LC-NMR). V **tabulce 16** jsou uvedeny limity detekce a kvantifikace pro jednotlivé lignany, jejich řazení odpovídá retenčnímu času, vyjma derivátu OMR, jehož retenční čas leží mezi LAR a PIN.

Tabulka 16. Meze detekce a stanovitelnosti lignanů pro metodu LC-MS.

Lignany	LOD (ng.ml ⁻¹)	LOQ (ng.ml ⁻¹)
CLAR	2,39	7,96
HMR	1,18	3,92
SEC	1,63	5,45
LAR	1,18	3,94
PIN	2,71	9,03
SYR	1,78	5,93
CONI	0,94	3,14
MR	2,40	7,99
ARC	1,56	5,19
dOMR	0,83	2,77

LOD = limit of detection, mez detekce byla stanovena jako trojnásobek šumu základní linie;

Popis k tabulce 16. LOQ = limit of quantification, mez kvantifikace byla stanovena jako desetinásobek šumu základní linie.

5.3.1 Stanovení lignanů v pohance

5.3.1.1 Zastoupení lignanů v odrůdách pohanky

Profil zastoupení jednotlivých lignanů je ve všech třech odrůdách pohanky seté pro oba roky 2011 a 2012 podobný. Výsledky analýz jsou shrnuty v *tabulkách 17 a 18* a na *obr. 24 a 25*, kde je celková suma lignanů na ose y vyjádřena v logaritmickém měřítku z důvodu výrazných rozdílů v koncentraci lignanů. Obsahy lignanů v tabulkách jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky či sumy lignanů jednotlivých odrůd pohanky seté (v mg.kg^{-1}) pro roky 2011 a 2012. Uvedené hodnoty zahrnují průměry a sumy lignanů pro všechny analyzované části rostlin, tzn. v případě odrůdy Jana - kořeny, stonky, slupky i nažky a v případě odrůd Pyra a Špačinská kořeny, stonky a slupky. Nažky posledně zmíněných odrůd byly v roce 2011 znehodnoceny spárkatou zvěří, proto nebyly analyzovány. Jednotlivé části rostlin pro každou odrůdu byly měřeny 3x. Pro rok 2012 byly obsahy lignanů pro všechny odrůdy vyjádřeny jako průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky či sumy zahrnující kořeny, stonky, slupky a nažky.

Při porovnání výsledků z obou let je patrné, že obsahy jednotlivých lignanů jsou zpravidla v roce 2012 nižší. Mezi nejvíce dominantní lignany patří SYR s celkovým obsahem pro rok 2011 od 315 mg.kg^{-1} pro odrůdu Špačinská po 678 mg.kg^{-1} pro odrůdu Jana, odrůda Pyra má celkový obsah SYR 471 mg.kg^{-1} . V roce 2012 byl obsah SYR nejvyšší v odrůdě Pyra 329 mg.kg^{-1} , v odrůdě Špačinská 303 mg.kg^{-1} a nejnižší v odrůdě Jana 248 mg.kg^{-1} . Další nejvíce zastoupený lignan je CLAR s obsahem od 177 mg.kg^{-1} (Pyra) do 267 mg.kg^{-1} (Jana) pro rok 2011 a od 131 mg.kg^{-1} (Pyra) do 176 mg.kg^{-1} (Špačinská) v roce 2012; dále derivát OMR obsažený v koncentraci od 109 mg.kg^{-1} (Pyra) do 131 mg.kg^{-1} (Jana) v roce 2011 a v koncentraci od $97,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Jana) do 151 mg.kg^{-1} (Špačinská) v roce 2012. O řád níže se pohybují lignany PIN ($38,3$ až $56,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, 2011; $32,4$ až $57,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, 2012) a LAR ($18,4$ – $29,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, 2011 a $31,2$ až $56,7 \text{ mg.kg}^{-1}$, 2012). Z uvedených výsledků (*tab. 17 a 18*) je patrné, že vyhodnocené směrodatné odchylky lignanů vyjadřují velmi široký rozptyl hodnot, který je odrazem vysoké variability obsahu lignanů v jednotlivých částech rostliny.

Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v obsahu lignanů mezi odrůdami v roce 2011 byl zaznamenán pouze u lignanů HMR a MR. (Průměrné hodnoty lignanů, které se u jednotlivých odrůd statisticky významně liší ($p < 0,05$) jsou v tabulkách vyznačeny kurzívou). HMR je ve

vyšší koncentraci obsažen v odrůdě Špačinská a MR byl kvantifikován pouze u odrůdy Jana. V roce 2012 byl statisticky významný rozíl ($p < 0,05$) mezi odrůdami zjištěn také u HMR, který je nejvíce obsažen v odrůdě Jana a u ARC, který je obsažen pouze v této odrůdě. Obsahy jednotlivých lignanů jsou zpravidla v roce 2012 nižší vyjma MR, který byl v roce 2012 kvantifikován pro všechny tři odrůdy, zatímco v roce 2011 pouze v odrůdě Jana a jeho obsah je nižší, a dále již zmíněný ARC, který v roce 2011 nebyl detekován v žádné z odrůd a v roce 2012 byl kvantifikován pouze v odrůdě Jana.

Tabulka 17. Zastoupení lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2011 vyjádřené v mg.kg^{-1} .

Lignany	Pohanka setá - odrůdy 2011					
	Jana (n = 12)		Pyra (n = 9) ^a		Špačinská (n = 9) ^a	
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma
CLAR	66.8 ± 44.6	267	59.1 ± 18.6	177	86.7 ± 9.04	260
HMR	1.91 ± 1.95 ^b	7.66	1.33 ± 0.12	3.99	3.63 ± 1.74	10.9
SEC	1.13 ± 1.03	4.52	1.05 ± 1.07	3.15	2.04 ± 2.55	6.13
LAR	7.31 ± 3.20	29.2	6.14 ± 2.94	18.4	9.15 ± 5.49	27.4
PIN	13.1 ± 14.8	52.5	12.8 ± 13.4	38.4	18.7 ± 20.0	56.1
SYR	169 ± 269	678	157 ± 200	471	105 ± 124	315
CONI	0.44 ± 0.39	1.76	0.65 ± 0.63	1.93	0.84 ± 0.80	2.53
MR	0.32 ± 0.35	1.28	ND		ND	
ARC	ND		ND		ND	
dOMR	32.8 ± 49.2	131	36.3 ± 44.3	109	39.3 ± 48.3	118

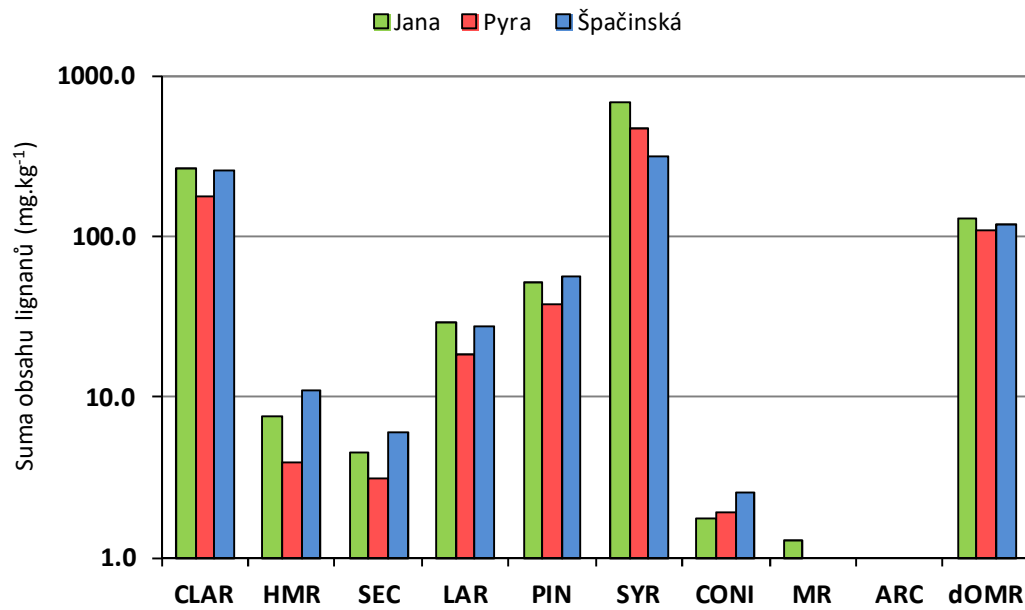
^aHodnoty ve sloupci vyjádřeny bez nážek; ^bprůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.

Tabulka 18. Zastoupení lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2012 vyjádřené v mg.kg^{-1} .

Lignany	Pohanka setá - odrůdy 2012					
	Jana (n = 12)		Pyra (n = 12)		Špačinská (n = 12)	
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma
CLAR	37.3 ± 16.8	149	32.7 ± 14.4	131	43.9 ± 25.7	176
HMR	5.93 ± 6.15 ^b	23.7	2.37 ± 2.60	9.49	1.02 ± 0.85	4.08
SEC	1.43 ± 0.64	5.72	1.04 ± 0.65	4.17	1.27 ± 1.00	5.09
LAR	14.2 ± 8.40	56.9	7.80 ± 6.04	31.2	8.85 ± 5.10	35.4
PIN	14.3 ± 12.1	57.3	8.09 ± 9.32	32.4	12.8 ± 14.5	51.3
SYR	62.1 ± 89.5	248	82.3 ± 120	329	75.8 ± 109	303
CONI	1.57 ± 1.48	6.27	0.80 ± 0.48	3.21	0.74 ± 0.65	2.97
MR	1.35 ± 0.82	5.40	0.94 ± 0.76	3.75	0.85 ± 1.29	3.38
ARC	0.06 ± 0.11	0.24	ND		ND	
dOMR	24.4 ± 37.4	97.6	25.1 ± 37.2	100	37.7 ± 59.6	151

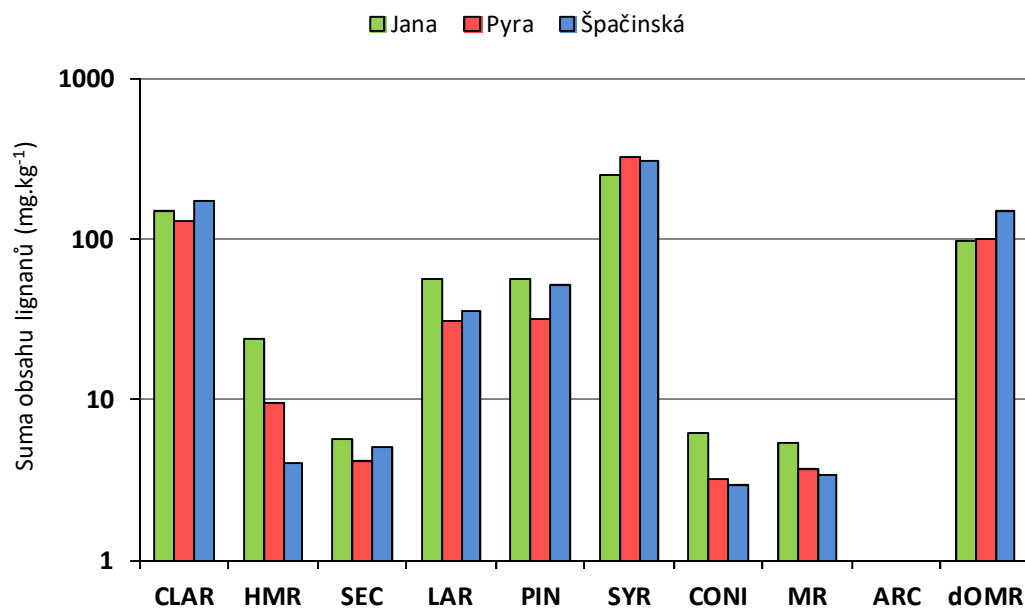
^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.

Pohanka setá - odrůdy 2011



Obrázek 24. Zastoupení lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2011.

Pohanka setá - odrůdy 2012



Obrázek 25. Zastoupení lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2012.

Tabulka 19 a **obrázek 26** znázorňují souhrnné výsledky pro jednotlivé odrůdy pohanky seté pro oba roky v porovnání s pohankou tatarskou, jejíž kořeny a stonky byly pro analýzu k dispozici pouze v roce 2012. V roce 2011 byla z hlediska celkového obsahu lignanů nejbohatší odrůda Jana - 1173 mg.kg⁻¹ a celkový obsah lignanů bez nažek činil 1143 mg.kg⁻¹. Pro celkové porovnání obsahu lignanů z hlediska jednotlivých odrůd pro oba roky, byla celková suma lignanů dále vyjádřena jako suma lignanů v potravinářsky nevyužívaných částech – tj. suma stonků (S), kořenů (K) a slupek (SL), zejména s ohledem na chybějící data pro nažky odrůd Pyra a Špačinská pro rok 2011, a dále sumu nažek. Distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky bude podrobně popsána v **kap. 5.3.1.2**.

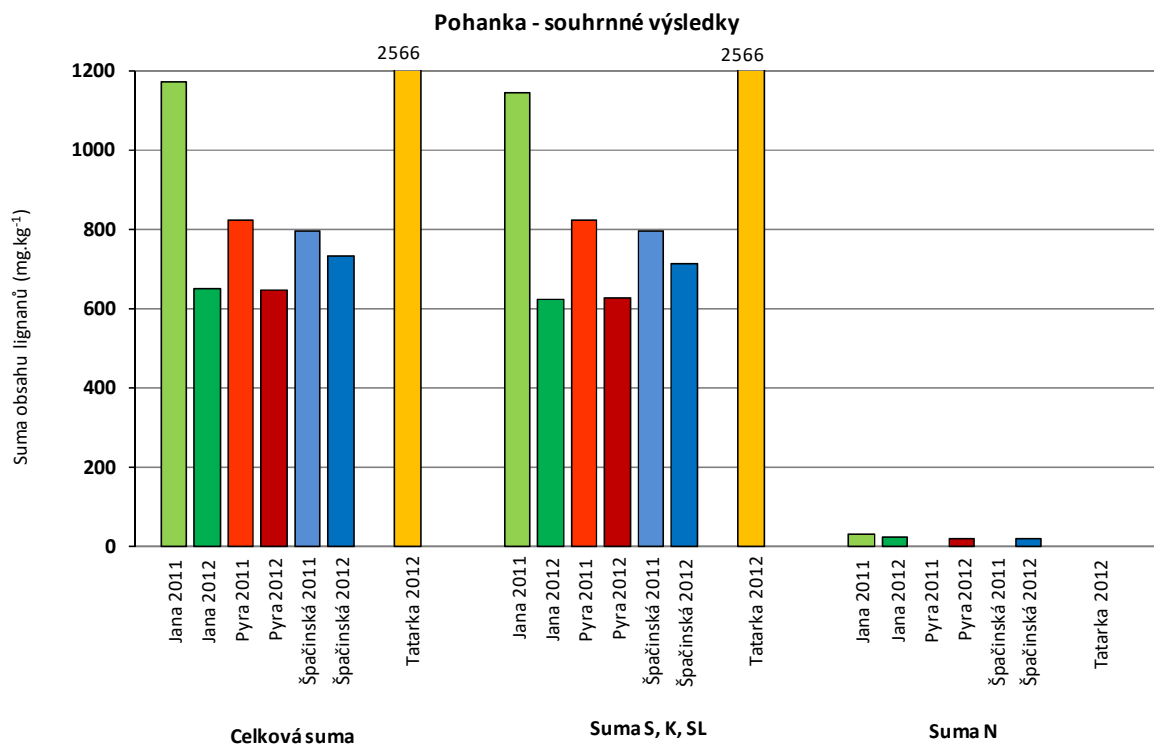
Tabulka 19. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2011 a 2012 vyjádřené jako suma ± SD v mg.kg⁻¹.

Lignany	Pohanka setá - odrůdy 2011, 2012			Pohanka tatarská
	Jana (n = 12)	Pyra (n = 9) ^a	Špačinská (n = 9) ^a	(n = 6) ^b
2011				
Celková suma	1173 ± 110	823 ± 86.3	796 ± 60.7	
Suma S, K, SL^c	1143 ± 115	823 ± 86.3	796 ± 60.7	
Suma N^d	30.4 ± 5.60			
2012				
Celková suma	651 ± 37.3	645 ± 48.5	732 ± 50.2	2566 ± 413
Suma S, K, SL	623 ± 41.9	625 ± 55.2	712 ± 56.4	2566 ± 413
Suma N	22.4 ± 4.07	19.7 ± 3.35	20.1 ± 3.52	

^aHodnoty ve sloupci vyjádřeny bez nažek; ^bhodnoty ve sloupci zahrnují jen kořeny a stonky; ^cS – stonky, K – kořeny, SL – slupky; ^dN – nažky.

Odrůdy Pyra a Špačinská dosáhly hodnoty 823 mg.kg⁻¹ a 796 mg.kg⁻¹, přičemž absence nažek zde nehrála tak významnou roli (**obr. 26**). V roce 2012 byla nejbohatší na celkový obsah lignanů odrůda Špačinská s obsahem 732 mg.kg⁻¹, následovaná Janou a Pyrou (651 a 645 mg.kg⁻¹). Celkově všechny tři odrůdy pohanky seté obsahovaly v roce 2012 méně lignanů než v roce 2011. V případě odrůdy Jana byl rozdíl v obsahu lignanů v roce 2011 a 2012 téměř dvojnásobný. Tento fakt mohl být způsoben agroekologickými faktory, zejména odlišnými klimatickými a povětrnostními podmínkami v obou letech. Při porovnání celkového obsahu lignanů v pohance seté a pohance tatarské je zřejmé, že pohanka tatarská obsahuje až 3x více lignanů, ačkoliv je suma lignanů tvořena pouze kořeny a stonky. Tento rozdíl mohl být naopak způsoben spíše vnitřními faktory tedy odlišným genotypem obou rostlin. Pohanka tatarská se vyznačuje vyšším obsahem některých flavonoidních látek (kvercetin i rutinu) i

vyšší odolností vůči vnějším podmínkám. Je tedy také vhodná pro pěstování ve vyšších nadmořských výškách (Rysová et al., 2008).



Obrázek 26. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v odrůdách pohanky seté pro rok 2011 a 2012 a pohanky tatarské (2012); S – stonky, K – kořeny, SL – slupky, N – nažky.

5.3.1.2 Distribuce lignanů v pohance

V následujících **tabulkách 20 a 21** a na **obrázcích 27 a 28** jsou uvedeny průměrné obsahy lignanů, všech odrůd zastoupené v jednotlivých částech rostliny – stoncích, kořenech, slupkách a nažkách pohanky seté pro roky 2011 a 2012. Z grafů i tabulek je zřejmé, že zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky je značně nerovnoměrné. Tomu odpovídá i statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi obsahy lignanů ve stoncích, kořenech, slupkách a nažkách. V roce 2011 vykazovaly statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) všechny lignany kromě HMR a ARC, který nebyl detekován v žádné z částí a v roce 2012 se statisticky významně lišily ($p < 0,05$) všechny lignany kromě HMR. Průměrné obsahy lignanů se tak stávají charakteristické pro jednotlivé části pohanky.

Nejhojněji zastoupeným lignanem pro oba roky byl opět SYR, který dominuje zejména v kořenech a jehož průměrný obsah v roce 2011 činil 435 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 247 mg.kg⁻¹, je o řád vyšší než ve stoncích a o dva řády vyšší než ve slupkách a nažkách. V kořenech dále převažuje derivát OMR a CLAR s průměrnými obsahy 104 a 98,6 mg.kg⁻¹ (2011) a 102 a 50,7 mg.kg⁻¹ (2012). Významnější je dále obsah PIN 11,7 mg.kg⁻¹ v roce 2012 a 4,9 mg.kg⁻¹ (2011).

Ve stoncích je nejvyšší průměrný obsah CLAR (58,6 a 29,8 mg.kg⁻¹ pro roky 2011 a 2012), následovaný SYR (49,0 a 42,1 mg.kg⁻¹ pro roky 2011 a 2012), PIN (37,7 a 29,0 mg.kg⁻¹; 2011, 2012), derivátem OMR (14,5 a 12,5 mg.kg⁻¹; 2011, 2012) a LAR (9,1 a 18,5 mg.kg⁻¹).

Slupky a nažky vykazují pro oba roky podobný profil zastoupení lignanů. Ve slupkách i nažkách dominuje CLAR s průměrnými obsahy 71,7 a 58,5 mg.kg⁻¹ ve slupkách pro roky 2011 a 2012, resp. 17,7 a 12,9 mg.kg⁻¹ pro nažky. Dále je zde obsažen LAR (ve slupkách 11,5 a 10,7 mg.kg⁻¹ pro roky 2011 a 2012; v nažkách 5,1 a 3,8 mg.kg⁻¹, 2011 a 2012), následovaný PIN ve slupkách a SYR v nažkách. Zastoupení lignanů v nažkách pohanky v naší studii je z dostupných literárních zdrojů možné porovnat pouze s výsledky studie Smeds et al. (2007). Při porovnání dat z obou studií bylo v našich vzorcích pohanky kvantifikováno o řád více CLAR a PIN, podobný obsah byl zaznamenán u SYR, MR a dOMR a nižší koncentrace u HMR a SEC, CONI byl kvantifikován jen v naší studii. Ve studii Smeds et al. (2007) byly dále kvantifikovány některé další lignany, obsažené v nižších koncentracích jako např. todolaktol, nortrachelogenin či medioresinol.

Tabulka 20. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky seté pro rok 2011 vyjádřené jako průměr ± SD v mg.kg⁻¹.

Pohanka setá - části 2011				
Lignany	Stonky (n = 9)	Kořeny (n = 9)	Slupky (n = 9)	Nažky (n = 3) ^a
CLAR	58.6 ± 19.1 ^b	98.6 ± 27.2	71.7 ± 20.6	17.7 ± 0.65
HMR	2.57 ± 2.55	2.93 ± 1.63	1.86 ± 0.66	0.50 ± 0.02
SEC	ND	0.68 ± 0.07	3.49 ± 1.44	1.28 ± 0.05
LAR	9.08 ± 1.50	2.74 ± 0.88	11.5 ± 2.58	5.14 ± 0.14
PIN	37.7 ± 6.37	4.90 ± 2.62	5.59 ± 1.68	2.36 ± 0.11
SYR	49.0 ± 8.23	435 ± 150	3.09 ± 1.20	2.41 ± 0.05
CONI	ND	0.72 ± 0.20	1.29 ± 0.53	0.19 ± 0.01
MR	ND	ND	0.26 ± 0.39	0.51 ± 0.03
ARC	ND	ND	ND	ND
dOMR	14.5 ± 1.65	104 ± 8.69	0.83 ± 0.30	0.31 ± 0.03

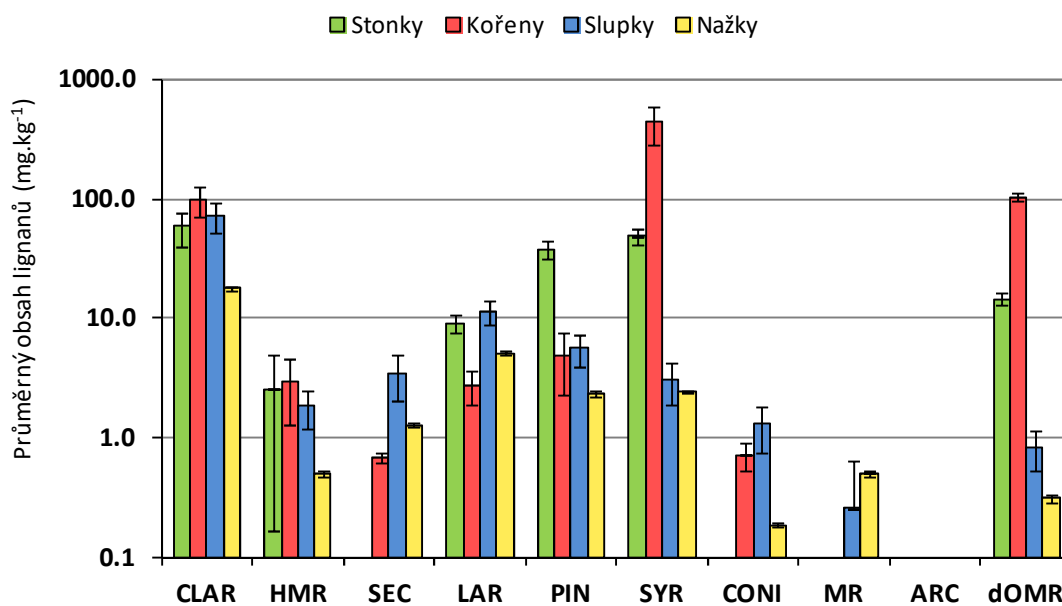
^aHodnoty ve sloupci zahrnují průměrné hodnoty pouze odrůdy Jana; ^bprůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti (p < 0,05); ND = nebylo detekováno.

Tabulka 21. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky seté pro rok 2012 vyjádřené jako průměr ± SD v mg.kg⁻¹.

Pohanka setá - části 2012				
Lignany	Stonky (n = 9)	Kořeny (n = 9)	Slupky (n = 9)	Nažky (n = 9)
CLAR	29.8 ± 1.97 ^b	50.7 ± 6.32	58.5 ± 13.6	12.9 ± 2.62
HMR	4.25 ± 2.09	5.58 ± 7.78	1.82 ± 0.07	0.78 ± 0.61
SEC	0.75 ± 0.08	0.94 ± 0.53	2.45 ± 0.38	0.86 ± 0.11
LAR	18.5 ± 5.46	8.13 ± 7.15	10.7 ± 2.82	3.78 ± 0.30
PIN	29.0 ± 6.21	11.7 ± 9.83	4.83 ± 0.88	1.48 ± 0.24
SYR	42.1 ± 5.51	247 ± 31.2	2.58 ± 0.67	1.82 ± 0.28
CONI	0.74 ± 0.35	1.70 ± 1.69	1.46 ± 0.25	0.25 ± 0.12
MR	2.52 ± 0.35	0.81 ± 0.68	0.56 ± 0.42	0.29 ± 0.22
ARC	ND	ND	0.08 ± 0.12	ND
dOMR	12.5 ± 1.85	103 ± 25.13	0.94 ± 0.20	0.22 ± 0.05

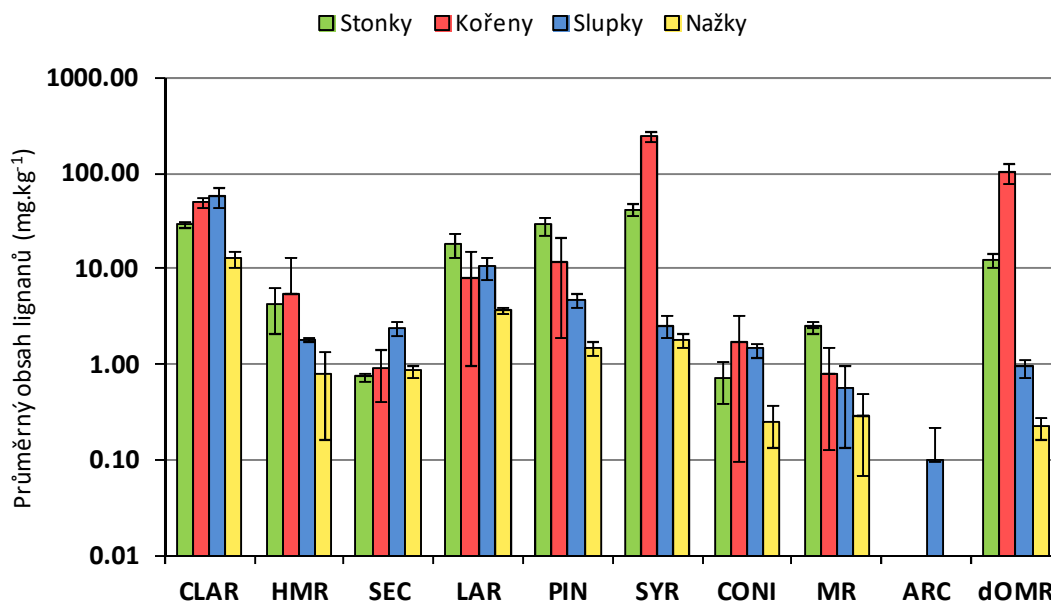
^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti (p < 0,05); ND = nebylo detekováno.

Pohanka setá - části 2011



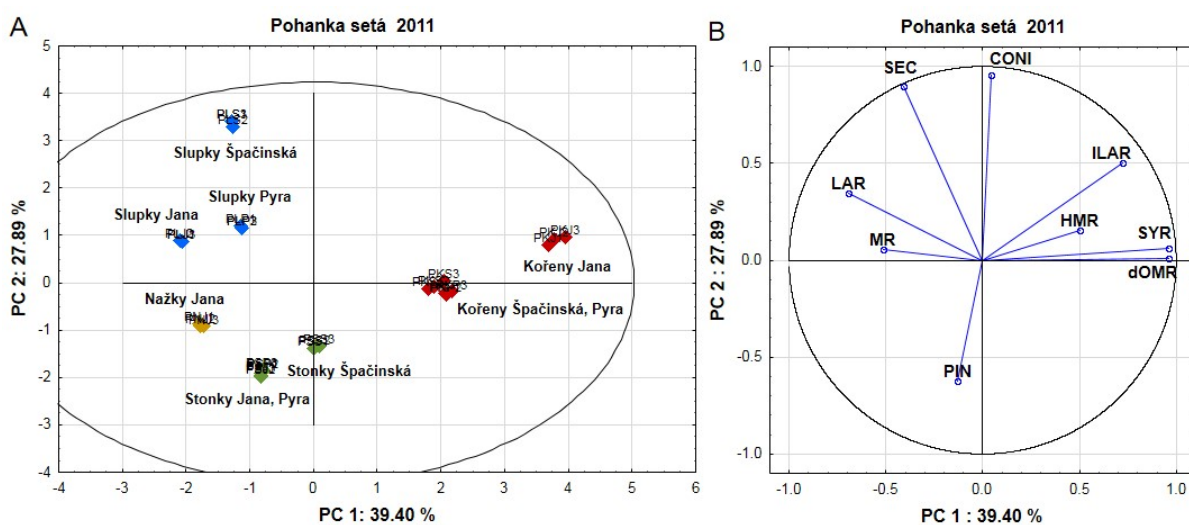
Obrázek 27. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky seté pro rok 2011.

Pohanka setá - části 2012

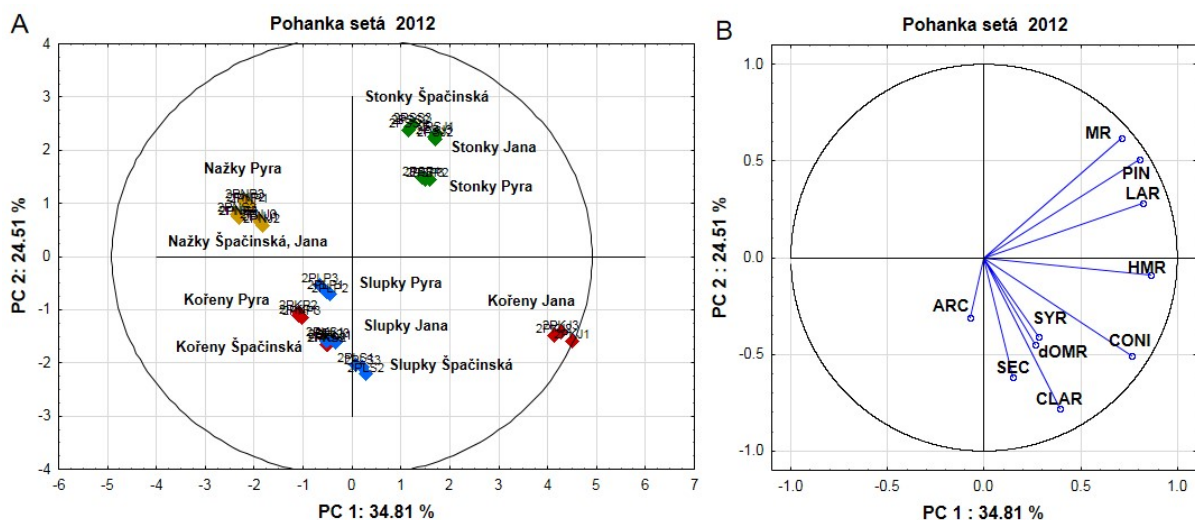


Obrázek 28. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky seté pro rok 2012.

Pro celkové zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky seté byl dále aplikován model analýzy hlavních komponent (PCA). Z modelu PCA na **obrázku 29** pro rok 2011 jednoznačně vyplývají korelace určitých skupin vzorků, které reprezentují dané části rostliny, přičemž je z modelu také patrné odlišení většiny částí rostliny vázaných na konkrétní odrůdy. První hlavní komponenta (PC 1) vystihuje variabilitu vzorků z 39 % a je tvořena převážně derivátem OMR a SYR z 26 % a 25,9 %, dále CLAR z 14,7 %, LAR (13,5 %) a MR a HMR (7,5 a 7,2 %). Druhá hlavní komponenta (PC 2) rozlišuje vzorky z 28 % a tvoří ji převážně CONI (36,4 %), SEC (32,1 %), PIN (15,4 %) a CLAR (10,0 %). Při porovnání obou projekcí do komponentní roviny (**obr. 29 A a B**) je zřejmé, že v kořenech ve srovnání s ostatními částmi převažují lignany dOMR, SYR, HMR a CLAR. Lignany PIN, CONI a SEC rozlišují zejména stonky od slupek a nažek. PIN je z těchto tří částí obsažen nejvíce ve stoncích, SEC, CONI a LAR ve slupkách a v nažkách MR. Model této analýzy tak vystihuje jednoznačný vliv části rostliny na obsah určitých lignanů. Vliv odrůdy je v tomto směru nevýznamný.



Obrázek 29. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků pohanky seté do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky pro rok 2011; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

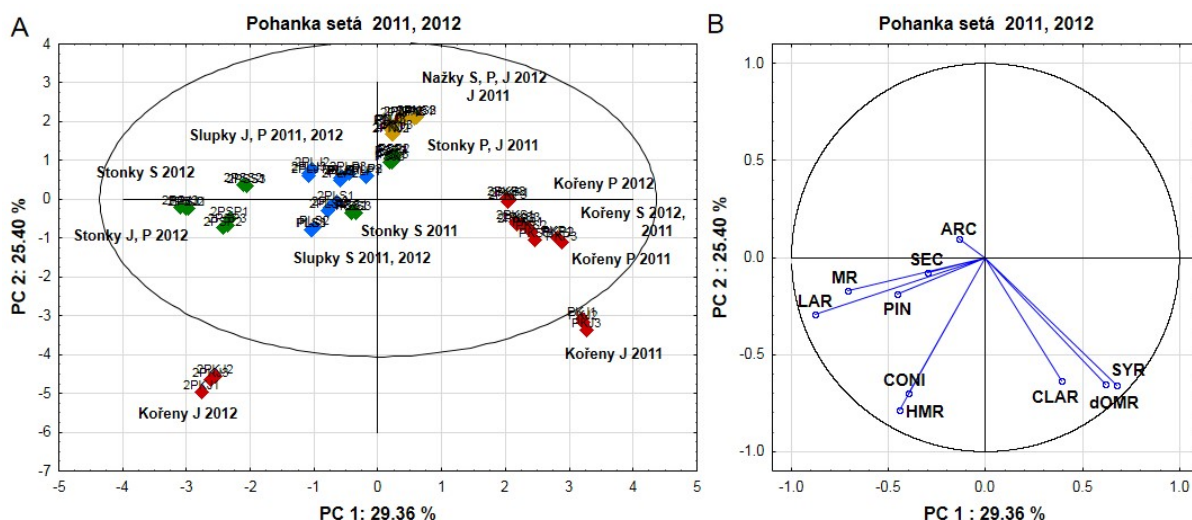


Obrázek 30. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků pohanky seté do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky pro rok 2012; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

Model PCA pro pohanku setou pro rok 2012 je znázorněn na **obrázku 30**. PC 1 vystihuje variabilitu proměnných z 35 % a je tvořena zejména HMR (21,4 %), PIN (18,5 %), CONI (16,9 %) a MR (14,6 %). PC 2 vystihuje proměnlivost souboru z 25 % a je tvořena CLAR (25,0 %), SEC a MR (15,6 %), PIN (10,6 %), CONI (10,5 %) a dOMR (8,3 %). Z rozptylového diagramu komponentních skóre (**obr. 30 A**) a grafu komponentních vah (**obr. 30 B**) vyplývají zřetelné korelace jednotlivých částí pohanky. Nejvíce navzájem korelují nažky a i přesto je možné z grafu rozlišit také jednotlivé odrůdy. Dále významně korelují stonky i slupky. Ve stoncích oproti ostatním částem dominuje lignan MR, PIN a LAR. Ve slupkách byl jako v jediné části detekován a kvantifikován ARC, dále je zde v porovnání s ostatními částmi významněji obsažen SEC a CLAR. Kořeny spíše korelují se slupkami, přičemž nejvíce odlišné jsou kořeny odrůdy Jana. Z podrobné analýzy jednotlivých částí vázaných na konkrétní odrůdy bylo patrné, že kořeny odrůdy Jana (J) obsahují v porovnání s ostatními kořeny odrůd Pyra a Špačinská, mnohonásobně větší množství HMR – 15,9 mg.kg⁻¹ ve srovnání s odrůdou Pyra (P) 0,8 mg.kg⁻¹, v odrůdě Špačinská (S) nebyl HMR detekován; dále LAR (J 17,6 mg.kg⁻¹, P 2,4 mg.kg⁻¹, S 4,4 mg.kg⁻¹), CONI a MR v koncentracích o řád vyšší.

Souhrnná PC analýza pro pohanku setou pro oba roky je znázorněna na **obrázku 31 A a B**. Z modelu PCA je patrné, že některé z částí pohanky spolu korelují silněji a jiné méně výrazně. Silná korelace je pro oba roky zřejmá u nažek. Dále spolu významně korelují slupky

všech odrůd a kořeny odrůd Pyra a Špačinská, u kořenů odrůdy Jana je zřetelná odlišnost v zastoupení a koncentraci některých lignanů, zejména se jedná o výrazně vyšší obsah HMR, ale také PIN a LAR v obou letech. Hlavní komponenta (PC 1) vzorky rozlišuje z 29 %, je tvořena převážně LAR (26,3 %), MR (17,2 %), SYR (15,6 %) a dOMR (13,1 %). Druhá hlavní komponenta (PC 2) vzorky rozlišuje z 25 % a tvoří ji převážně HMR (24,5 %), CONI (19,2 %), SYR (17,0 %), dOMR (16,9 %) a CLAR (16,0 %).



Obrázek 31. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků pohanky seté do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky pro roky 2011 a 2012; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

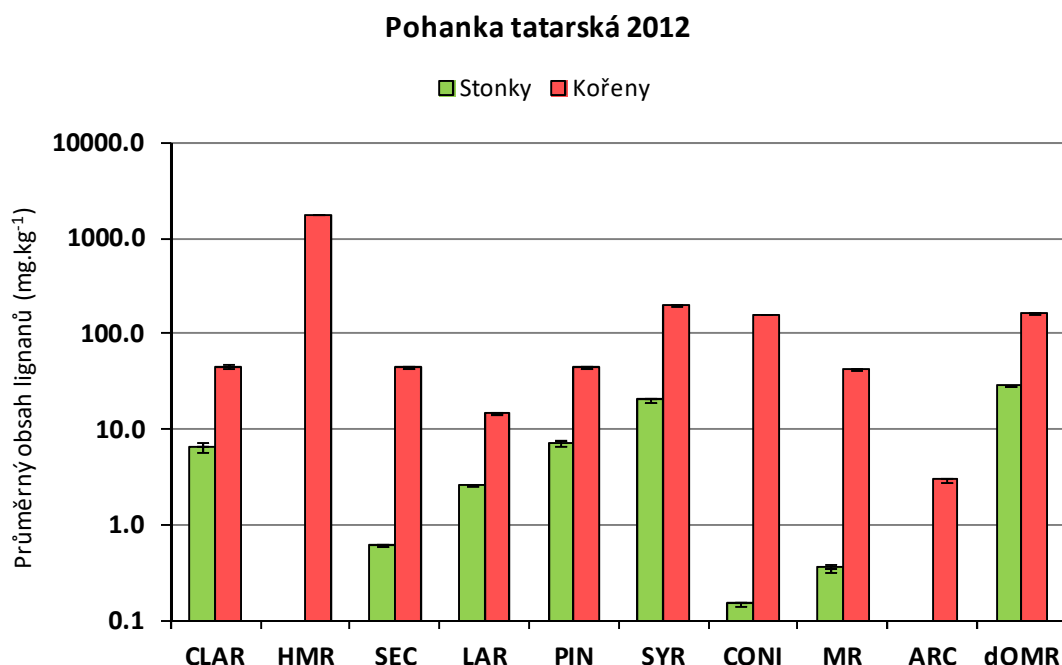
Jak již bylo zmíněno výše, v roce 2012 byly sklizeny také kořeny a stonky pohanky tatarské (tatarky). Profil lignanů pohanky tatarské je znázorněn v *tabulce 22* a na *obrázku 32*. Všechny kvantifikované lignany vykazovaly statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi obsahem ve stoncích a kořenech. Dominantním lignanem byl zejména HMR obsažený v kořenech. Obsah HMR 1778 mg.kg^{-1} tak řádově převyšuje nejen další lignany v samotném vzorku kořenu, ale je až o tři řády vyšší než u ostatních odrůd pohanky seté. Kořeny pohanky seté - odrůdy Jana v roce 2011 a 2012 obsahovaly $5,0$ a $15,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ lignanů, zdaleka nejvíce z ostatních odrůd. Kořeny odrůdy Pyra dosahovaly koncentrace $1,5$ a $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ a odrůda Špačinská $2,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ v roce 2011, v roce 2012 nebyl HMR detekován. Mezi další hojně zastoupené lignany v kořenech tatarky patří SYR (200 mg.kg^{-1}), derivát OMR (166 mg.kg^{-1}) a

CONI (159 mg.kg⁻¹). CONI je tvořen z HMR v alkalickém a (pH > 8) a kyselém prostředí (pH < 2) (Smeds et al., 2007), proto bývá zpravidla HMR doprovázen i CONI a naopak.

Tabulka 22. Zastoupení lignanů ve stoncích a kořenech pohanky tatarské pro rok 2012 vyjádřené jako průměr ± SD a suma ± SD v mg.kg⁻¹.

Lignany	Pohanka tatarská - části 2012		
	Stonky	Kořeny	Suma
CLAR	6.59 ± 0.76 ^b	45.3 ± 1.95	51.9 ± 0.84
HMR	ND	1778 ± 22.7	1778 ± 22.7
SEC	0.62 ± 0.03	44.4 ± 1.31	45.0 ± 0.91
LAR	2.65 ± 0.05	15.1 ± 0.47	17.7 ± 0.30
PIN	7.23 ± 0.66	44.9 ± 1.93	52.1 ± 0.90
SYR	20.5 ± 1.23	200 ± 1.45	220 ± 0.15
CONI	0.15 ± 0.01	159 ± 0.69	160 ± 0.48
MR	0.36 ± 0.04	43.0 ± 1.04	43.4 ± 0.70
ARC	ND	2.98 ± 0.12	2.98 ± 0.12
dOMR	28.7 ± 0.36	166 ± 6.90	195 ± 4.62

^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti (p < 0,05); ND = nebylo detekováno.



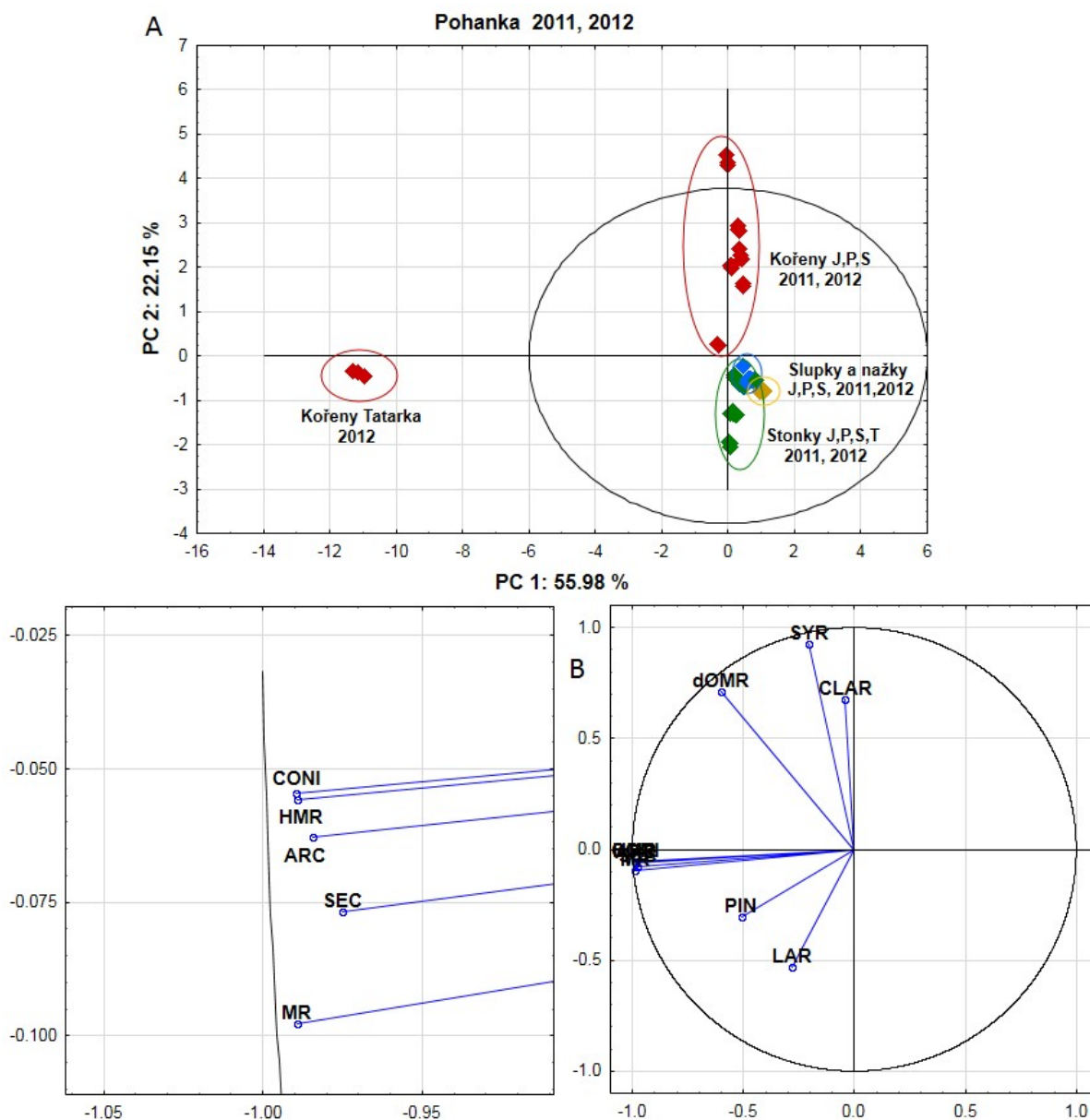
Obrázek 32. Zastoupení lignanů ve stoncích a kořenech pohanky tatarské pro rok 2012.

Pro celkové zhodnocení a porovnání zastoupení lignanů v pohance tatarské a pohance seté (pro oba roky) byla aplikována opět analýza hlavních komponent. Z PCA vyplývá (*obr. 33*) jednoznačná korelace vzorků pohanky seté, kdy kořeny, stonky, slupky i nažky tvoří společné klastry, zatímco kořeny pohanky tatarské se vzorky pohanky seté nekoreluje. V tomto směru se odráží již zmíněný několikanásobný rozdíl mezi obsahy lignanů HMR, CONI, ARC, SEC a MR (*obr. 33 B*) ve prospěch pohanky tatarské. PC 1 rozlišuje vzorky z 56 % a je tvořena zejména výše uvedenými lignany s procentuelním zastoupením HMR, CONI a MR shodně (17,5 %), ARC (17,3 %) a SEC (17 %). PC 2 vzorky rozlišuje z 22 % a tvoří ji zejména SYR (38,7 %), dOMR (22,8 %), CLAR (20,5 %) a LAR (12,7 %). Jak je z *obr. 33 B* patrné a z předešlých analýz, v kořenech pohanky seté převažují lignany SYR, CLAR a dOMR, které je zřetelně odliší od ostatních částí (stonků, slupek a nažek). Ve stoncích dominují lignany PIN a LAR vedle CLAR a dOMR, ve slupkách a nažkách CLAR a LAR.

Tabulka 23 shrnuje distribuci lignanů v jednotlivých částech pohanky. Lignan CLAR je nejvíce obsažen v kořenech a slupkách; HMR v kořenech a stoncích; SEC ve slupkách; LAR ve stoncích a slupkách; PIN ve stoncích; SYR v kořenech; CONI v kořenech a slupkách; MR ve slupkách a nažkách; ARC ve slupkách a dOMR v kořenech.

Tabulka 23. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech pohanky.

Pohnaka				
Lignany	Stonky	Kořeny	Slupky	Nažky
CLAR		X	X	
HMR	X	X		
SEC			X	
LAR	X		X	
PIN	X			
SYR		X		
CONI		X	X	
MR			X	X
ARC			X	
dOMR		X		



Obrázek 33. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků pohanky seté a tatarské do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech pohanky pro roky 2011 a 2012; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny, vpravo celá projekce, vlevo zvětšená výšeč projekce pro překryté analyty.

V následující **tabulce 24** a na **obrázku 34** jsou uvedeny souhrnné výsledky pro distribuci lignanů v pohance seté pro oba roky, včetně výsledků vázaných na konkrétní odrůdy, a pohanky tatarské pro rok 2012. V obou letech jsou z hlediska distribuce lignanů zdaleka nejbohatší části kořeny. Průměrný obsah lignanů v kořenech tvořil v roce 2011 68 % a v roce 2012 64 % z celkového obsahu lignanů. V roce 2011 činil průměrný obsah lignanů (ze všech tří odrůd) v kořenech 650 mg.kg^{-1} . Z odrůd pohanky seté bylo nejvíce lignanů obsaženo

v kořenech odrůdy Jana 881 mg.kg⁻¹, která výrazně převyšovala všechny ostatní odrůdy v obou letech, dokonce i stejnou odrůdu v roce 2012, kdy byl obsah lignanů v kořenech odrůdy Jana poloviční 412 mg.kg⁻¹. V porovnání s rokem 2012 byly mezi odrůdami v roce 2011 zaznamenány výraznější rozdíly v celkovém obsahu lignanů. Odrůda Pyra obsahovala 608 mg.kg⁻¹ a odrůda Špačinská 460 mg.kg⁻¹, což je stejný a zároveň nejvyšší obsah lignanů v kořenech pro rok 2012. V roce 2012 byl průměrný obsah všech lignanů v kořenech 429 mg.kg⁻¹. Výrazně nejvyšší obsah lignanů, až 4x vyšší, byl však zaznamenán v roce 2012 v kořenech pohanky tatarské - 2499 mg.kg⁻¹.

Průměrný obsah lignanů ve stoncích tvořil v roce 2011 18 % a v roce 2012 21 % z celkového obsahu lignanů. V roce 2011 byl průměrný obsah lignanů ve stoncích prosa 171 mg.kg⁻¹, nejvíce lignanů obsahovala odrůda Špačinská 200 mg.kg⁻¹, následovala odrůda Jana a Pyra. V roce 2012 byl průměrný obsah lignanů ve stoncích o něco nižší než v roce 2011 - 140 mg.kg⁻¹ s nejvyšším obsahem v odrůdě Špačinská, ale celkový obsah lignanů byl v tomto roce opět velice vyrovnaný pro všechny odrůdy. Ve stoncích pohanky tatarské byl obsah lignanů naopak 2x (2012) až 3x nižší (2013) než v pohance seté. Ve studii Hosseiniana a Mazza (2009) činil obsah lignanů ve stoncích tritikale pouze 2,7 mg. kg⁻¹ a v listech 2,3 mg. kg⁻¹, přičemž suma lignanů byla tvořena SDG a MR.

Obsah lignanů ve slupkách pohanky zaujímal v roce 2011 11 % a v roce 2012 12 % z celkového obsahu lignanů v pohance. V roce 2011 činil průměrný obsah lignanů 100 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 84 mg.kg⁻¹. Celkový obsah lignanů ve slupkách pohanky byl nejvyšší v odrůdě Špačinská pro oba roky (136 a 107 mg.kg⁻¹ pro rok 2011 a 2012), následovala odrůda Jana (90 a 78 mg.kg⁻¹; 2011, 2012) a Pyra (73 resp. 67 mg.kg⁻¹; 2011 a 2012). Pro srovnání v nedávné studii Smeds et al. (2012) byly kvantifikovány lignany v otrubách žita, pšenice a ovesa a celkový obsah lignanů v těchto vzorcích byl 45; 31 a 15 mg.kg⁻¹, tedy zhruba poloviční, třetinový až šestinový než ve slupkách pohanky. Ve studii Hosseiniana a Mazza (2009) činil obsah lignanů v otrubách tritikale pouze 0,1 mg.kg⁻¹.

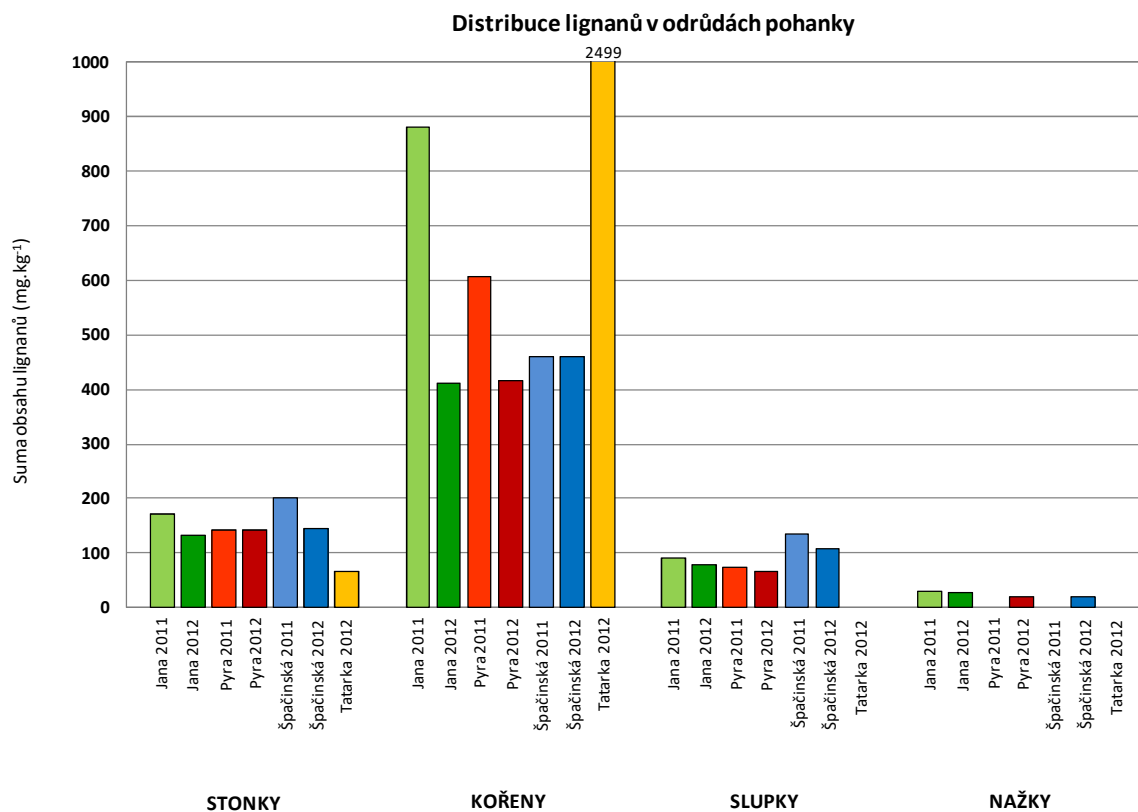
Nažky obsahují ze všech částí pohanky nejnižší množství lignanů, v porovnání s kořeny až 20x méně a 6x méně než stonky. Průměrný obsah lignanů v nažkách v roce 2011 tvořila pouze odrůda Jana, vzhledem k znehodnocení nážek u odrůdy Pyra a Špačinská. Průměrný obsah lignanů tvořil v roce 2011 a 2012 3 % z celkového obsahu lignanů. V nažkách odrůdy Jana byl obsah lignanů v roce 2011 30 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 28 mg.kg⁻¹. Odrůdy Pyra a Špačinská obsahovaly celkem 20 mg.kg⁻¹ v roce 2012. Celkový obsah lignanů v nažkách je možné porovnat pouze se zmíněnou studií Smeds et al. (2007), ačkoliv i v této studii je

celkový obsah lignanů jen orientační s ohledem na uvedné obsahy kvantifikovaných lignanů vždy jen pro nejvíce účinnou metodu extrakce (ve studii byly porovnány čtyři metody extrakce). V této souvislosti byl obsah lignanů v nažkách z obou let v naší studii vyšší - 30 a 22 mg.kg⁻¹ ve srovnání s 16 mg.kg⁻¹ finských autorů. Ve studii Smeds et al. (2007) byl dále porovnán obsah lignanů v nažkách a slupkách, kdy autoři došli k závěru, že na rozdíl od jiných druhů obilovin jako je žito, pšenice a oves, ve slupkách pohanky, prosa a tritikale nejsou lignany koncentrovány tak jako v nažkách/obilkách. Celkový obsah lignanů v celém zrně/nažce byl v rozmezí 62 až 78 %. V případě pšenice byl obsah lignanů v obilce 9,6 %, u žita, ova, ječmene a pšenice špaldy 25 až 40 %. V naší studii byl celkový obsah lignanů v nažkách v případě odrůdy Jana pro rok 2011 34 % a pro rok 2012 35 %, pro odrůdu Pyra (2012) 30 % a odrůdu Špačinská (2012) jen necelých 19 %, z čehož vyplývá opačný závěr, že lignany jsou spíše koncentrovány v obalových vrstvách tedy ve slupkách. Z hlediska potravinářského využití je ale tato skutečnost méně výhodná.

Tabulka 24. Souhrnné výsledky obsahu lignanů (mg.kg⁻¹) v jednotlivých částech a odrůdách pohanky seté a tatarské pro rok 2011 a 2012.

Pohanka setá - části 2011, 2012				
Lignany	Stonky	Kořeny	Slupky	Nažky
Suma 2011	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 3) ^a
Celkem průměr	171 ± 23.3	650 ± 152	100 ± 23.3	30.4 ± 5.60
Jana	172 ± 23.1	881 ± 192	89.9 ± 19.9	30.4 ± 5.60
Pyra	142 ± 18.7	608 ± 132	72.9 ± 16.0	
Špačinská	200 ± 27.9	460 ± 87.1	136 ± 30.0	
Suma 2012	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)
Celkem průměr	140 ± 14.9	429 ± 81.1	84.0 ± 18.5	22.4 ± 4.05
Jana	133 ± 13.8	412 ± 64.8	78.2 ± 16.3	27.5 ± 4.92
Pyra	143 ± 15.6	416 ± 88.2	66.6 ± 14.0	19.7 ± 3.35
Špačinská	145 ± 16.9	460 ± 84.9	107 ± 23.3	20.1 ± 3.52
Pohanka tatarská - části 2012				
Celkem	66.8 ± 10.0	2499 ± 541		

^aHodnoty ve sloupci zahrnují pouze odrůdu Jana (2011).



Obrázek 34. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v jednotlivých částech a odrůdách pohanky seté a tatarské pro roky 2011 a 2012.

5.3.2 Stanovení lignanů v prosu

5.3.2.1 Zastoupení lignanů v odrůdách prosa

Profil zastoupení jednotlivých lignanů je ve všech čtyřech odrůdách prosa setého pro oba roky 2011 a 2012 podobný. Výsledky jsou shrnuty v *tabulkách 25 a 26* na *obrázcích 35 a 36* (pozn. jednotky osy y jsou v grafech vyjádřeny v logaritmickém měřítku). Obsahy lignanů jsou zde vyjádřeny jako průměrné hodnoty a sumy lignanů zahrnující všechny části rostliny, tj. stonky, kořeny, slupky a obilky, platí pro všechny čtyři odrůdy v obou letech.

Mezi nejvíce dominantní lignany patří derivát OMR s celkovým obsahem pro rok 2011 od 226 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Omskoe do 294 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Unikum. V roce 2012 byl obsah dOMR od 244 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Yantarnoe do 272 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Omskoe. Další hojně zastoupené lignany jsou SYR a LAR pro oba roky. Obsah SYR pro rok 2011 je od 55 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Omskoe do 131 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Unikum; pro rok 2012 36 mg.kg⁻¹ též pro odrůdu Omskoe do 70 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Unikum. LAR se v roce 2011 pohyboval

v koncentracích od 59 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Yantarnoe do 90 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Unikum. V roce 2012 se LAR pohyboval na hladinách od 72 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Yantarnoe do 120 mg.kg⁻¹ pro odrůdu Unikum.

Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v obsahu lignanů mezi odrůdami byl zaznamenán v roce 2011 u lignanů CLAR a HMR a v roce 2012 pouze u HMR. HMR je ve vyšší koncentraci obsažen v odrůdě Unikum (31 mg.kg⁻¹ pro rok 2011; 25 mg.kg⁻¹ pro rok 2012) a nejnižší obsah v roce 2011 v odrůdě Omskoe (6,6 mg.kg⁻¹) a v roce 2012 v odrůdě Yantarnoe (11 mg.kg⁻¹). Nejnižší obsah CLAR byl v roce 2011 zaznamenán v odrůdě Omskoe (0,55 mg.kg⁻¹) a nejvyšší v odrůdě Unikum (2,6 mg.kg⁻¹).

Tabulka 25. Zastoupení lignanů v jednotlivých odrůdách prosa setého pro rok 2011 vyjádřené v mg.kg⁻¹.

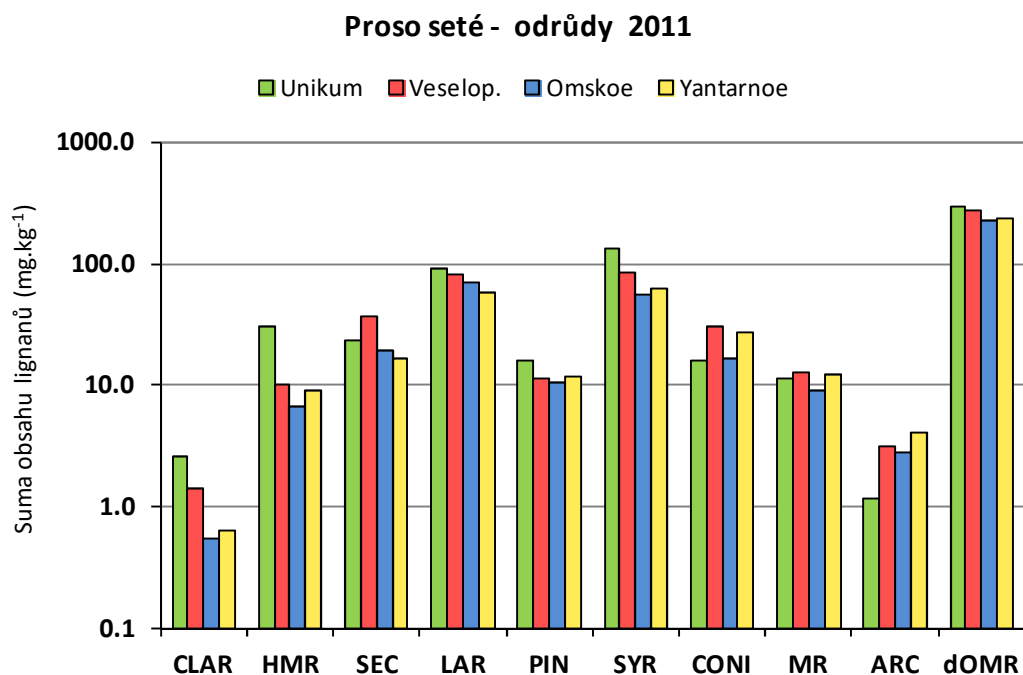
Proso seté - odrůdy 2011								
Lignany	Unikum (n = 12)		Veselop. ^a (n = 12)		Omskoe (n = 12)		Yantarnoe (n = 12)	
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma
CLAR	0.66 ± 0.41 ^b	2.64	0.35 ± 0.39	1.40	0.14 ± 0.25	0.55	0.16 ± 0.29	0.63
HMR	7.64 ± 9.45	30.5	2.52 ± 1.47	10.1	1.65 ± 0.91	6.58	2.30 ± 1.51	9.18
SEC	5.85 ± 4.44	23.4	9.28 ± 9.54	37.1	4.86 ± 4.22	19.4	4.10 ± 3.48	16.4
LAR	22.5 ± 9.85	89.8	20.3 ± 12.6	81.1	17.7 ± 14.7	70.9	14.7 ± 12.9	59.0
PIN	3.97 ± 2.18	15.9	2.86 ± 2.41	11.5	2.58 ± 2.23	10.3	2.90 ± 1.85	11.6
SYR	32.9 ± 35.6	131	21.2 ± 22.9	84.9	13.7 ± 14.0	55.0	15.9 ± 16.1	63.5
CONI	4.06 ± 2.85	16.2	7.54 ± 6.66	30.1	4.21 ± 2.63	16.8	6.74 ± 4.20	27.0
MR	2.81 ± 3.33	11.2	3.18 ± 2.14	12.7	2.25 ± 2.05	9.01	3.02 ± 1.58	12.1
ARC	0.29 ± 0.37	1.16	0.79 ± 0.74	3.16	0.70 ± 1.26	2.79	1.01 ± 0.89	4.05
dOMR	73.4 ± 73.6	294	69.3 ± 53.0	277	56.5 ± 48.9	226	58.9 ± 51.2	235

^aOdrůda Veselopodoliaskoe; ^bprůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$).

Tabulka 26. Zastoupení lignanů v jednotlivých odrůdách prosa setého pro rok 2012 vyjádřené v mg.kg⁻¹.

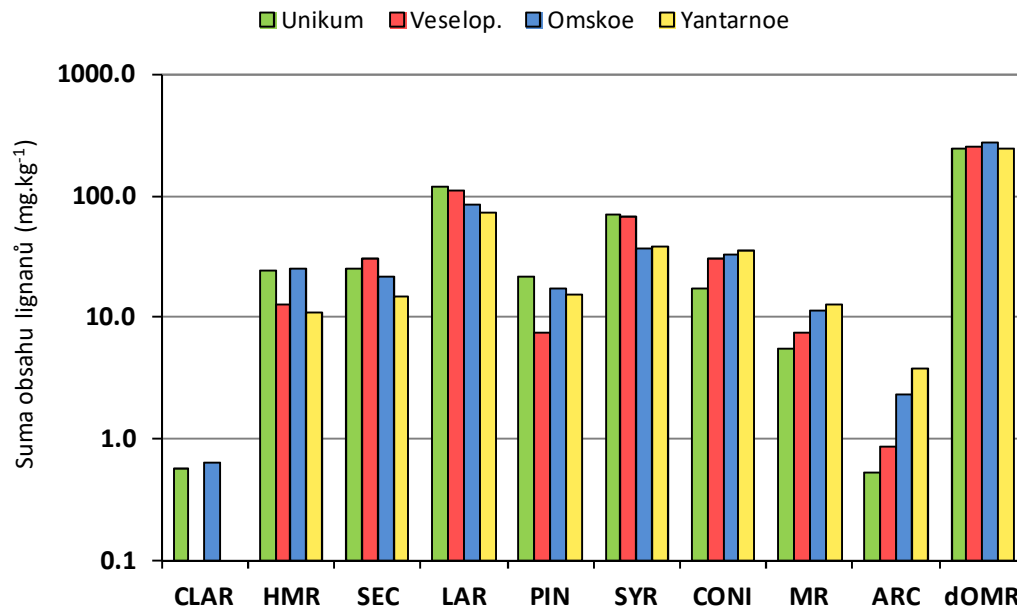
Proso seté - odrůdy 2012								
Lignany	Unikum (n = 12)		Veselop. ^a (n = 12)		Omskoe (n = 12)		Yantarnoe (n = 12)	
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma
CLAR	0.14 ± 0.26	0.57	ND		0.16 ± 0.28	0.63	ND	
HMR	6.11 ± 3.58 ^b	24.4	3.16 ± 1.89	12.6	6.24 ± 4.93	24.9	2.74 ± 1.73	11.0
SEC	6.18 ± 4.10	24.7	7.58 ± 7.84	30.3	5.39 ± 5.28	21.6	3.65 ± 3.49	14.6
LAR	29.7 ± 16.4	119	27.1 ± 24.0	108	21.5 ± 18.9	86.0	18.0 ± 18.0	72.0
PIN	5.37 ± 4.61	21.5	1.88 ± 1.18	7.53	4.24 ± 3.18	16.9	3.78 ± 2.60	15.1
SYR	17.5 ± 19.0	69.9	16.7 ± 20.2	66.7	9.10 ± 11.1	36.4	9.62 ± 14.4	38.5
CONI	4.28 ± 3.00	17.1	7.62 ± 4.89	30.5	8.21 ± 6.16	32.8	8.96 ± 5.96	35.9
MR	1.36 ± 0.97	5.46	1.87 ± 1.02	7.46	2.84 ± 2.48	11.4	3.17 ± 2.48	12.7
ARC	0.13 ± 0.24	0.53	0.22 ± 0.39	0.86	0.58 ± 1.06	2.33	0.94 ± 1.70	3.76
dOMR	61.2 ± 58.2	245	64.1 ± 52.6	257	68.0 ± 65.8	272	61.1 ± 54.7	244

^aOdrůda Veselopodoliaskoe; ^bprůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.



Obrázek 35. Zastoupení lignanů v jednotlivých odrůdách prosa setého pro rok 2011.

Proso seté - odrůdy 2012



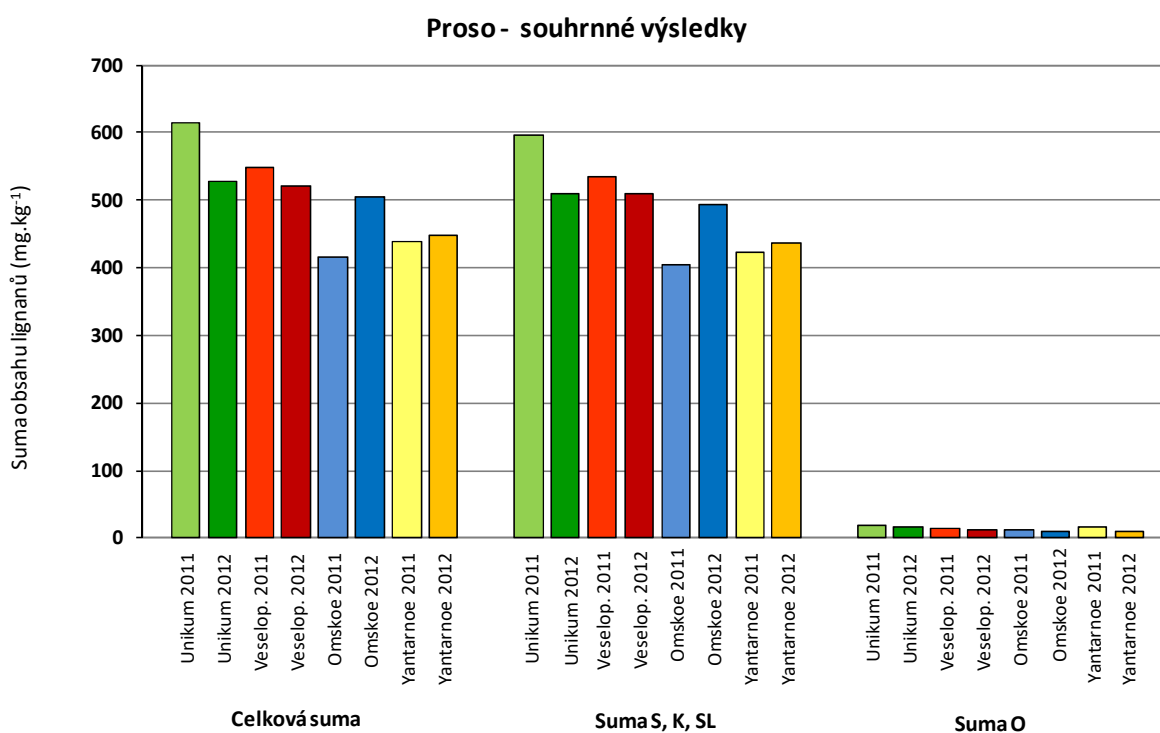
Obrázek 36. Zastoupení lignanů v jednotlivých odrůdách prosa setého pro rok 2012.

Tabulka 27 a **obrázek 37** znázorňují souhrnné výsledky pro jednotlivé odrůdy prosa setého pro oba roky. V roce 2011 i 2012 byla z hlediska celkového obsahu lignanů nejbohatší odrůda Unikum (616 a 528 mg.kg⁻¹, pro roky 2011 a 2012). Následovala odrůda Veselop. (549 a 521 mg.kg⁻¹; 2011, 2012), Omskoe (417 a 505 mg.kg⁻¹) a Yantarnoe s celkovým obsahem lignanů 439 a 448 mg.kg⁻¹ pro roky 2011 a 2012. Odrůdy Unikum a Veselop. dosáhly v roce 2011 vyšších hodnot než v roce 2012, zatímco odrůdy Omskoe a Yantarnoe naopak v roce 2012 obsahovaly vyšší koncentrace lignanů než v roce 2011. Dále odrůdy Yantarnoe a Veselop. nevykazovaly v obou letech výraznější rozdíly (2 a 5 %) v obsahu lignanů. U odrůd Unikum a Omskoe byl rozdíl mezi jednotlivými roky výraznější (14 a 17 %). Mezi oběma roky nebyl v celkovém součtu obsahu lignanů ze všech odrůd významnější rozdíl, hladina lignanů v roce 2011 byla jen o něco málo vyšší než v roce 2012. Celkové sumy lignanů v potravinářsky nevyužitelných částech (sumy stonků, kořenů a slupek) všech odrůd prosa korespondují s celkovými obsahy lignanů, obsah lignanů v obilkách tak tvoří pouze od 2,1 do 3,9 % z celkového obsahu lignanů. Podrobná distribuce lignanů v jednotlivých částech prosa je popsána v následující **kapitole 5.3.2.2.**

Tabulka 27. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v odrůdách prosa setého pro rok 2011 a 2012 vyjádřené jako suma \pm SD v mg.kg^{-1} .

Proso seté - odrůdy 2011, 2012				
Lignany	Unikum (n = 12)	Veselop. ^a (n = 12)	Omskoe (n = 12)	Yantarnoe (n = 12)
2011				
Celková suma	616 \pm 35.5	549 \pm 28.1	417 \pm 22.5	439 \pm 25.4
Suma S, K, SL^b	597 \pm 38.9	534 \pm 30.9	405 \pm 27.6	423 \pm 27.9
Suma O^c	18.5 \pm 2.60	15.1 \pm 2.16	12.5 \pm 1.44	16.2 \pm 2.01
2012				
Celková suma	528 \pm 28.9	521 \pm 29.3	505 \pm 31.1	448 \pm 27.5
Suma S, K, SL	511 \pm 31.7	509 \pm 32.1	494 \pm 34.6	437 \pm 30.7
Suma O	17.4 \pm 2.29	11.5 \pm 1.61	10.7 \pm 1.42	10.9 \pm 1.56

^aOdrůda Veselopodoliaskoe; ^bS – stonky, K – kořeny, SL – slupky; ^cO – obilky.



Obrázek 37. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v odrůdách prosa setého pro rok 2011 a 2012; S – stonky, K – kořeny, SL – slupky, O – obilky.

5.3.2.2 Distribuce lignanů v prosu

Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa – tj. ve stoncích, kořenech, slupkách a obilkách je podobně jako u vzorků pohanky značně nerovnoměrné. V *tabulkách 28 a 29* jsou uvedeny průměrné obsahy lignanů v analyzovaných částech rostliny, které zahrnují všechny odrůdy. Jak je z tabulek patrné, statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl byl zaznamenán u všech kvantifikovaných lignanů v obou letech. Z čehož vyplývá, že zastoupení konkrétních lignanů je vázáno na danou část rostliny podobně jako u vzorků pohanky.

Profil lignanů je pro oba roky 2011 i 2012 podobný (*obrázky 38 a 39*), pouze v případě lignanů CLAR a ARC byly zaznamenány jisté odlišnosti. V roce 2011 nebyly lignany CLAR a ARC kvantifikovány pouze u obilek a v roce 2012 byly naopak CLAR i ARC kvantifikovány pouze u stonků.

Ve všech částech prosa v obou letech dominuje především derivát OMR, jeho obsah je v kořenech o řád vyšší než ve stoncích a slupkách a o dva řády vyšší než v obilkách. Dále je ve všech částech rostliny hojně obsažen SYR a LAR.

V kořenech byl průměrný obsah dOMR 142 a 135 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro roky 2011 a 2012. Obsah SYR se pohyboval v roce 2011 na hladině 48 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a v roce 2012 13 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Obsah SYR byl v roce 2012 nižší než ve stoncích. To platí také pro LAR, jeho obsah v kořenech byl v roce 2011 i 2012 nižší než ve stoncích (23 a 34 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Ve stoncích byl nejhojněji obsažen již zmíněný derivát OMR, s obsahem 84 a 97 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro roky 2011 a 2012. Dále LAR, v roce 2011 byl jeho obsah 36 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a v roce 2012 48 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Vedle dOMR a LAR ve stoncích dominuje SYR (34 a 38 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Významnější je ještě obsah SEC (13 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro oba roky).

Ve slupkách je nejvyšší průměrný obsah dOMR 27 a 19 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro roky 2011 a 2012 a dále LAR 13 a 12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a HMR a CONI 4 a 8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro 2011 a 8 a 14 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro rok 2012.

V obilkách je obsah dOMR 6 a 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro rok 2011 a 2012, a LAR (4 a 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 2011 a 2012). Významnější je dále obsah CONI (2 a 4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Při porovnání obsahů jednotlivých lignanů v naší studii a studii finských autorů (Smeds et al. 2007) bylo vyšší hladiny lignanů dosaženo u dOMR (5,5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. 0,6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a LAR (4,4 vs. 0,3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), u ostatních lignanů bylo dosaženo nižších hladin.

Tabulka 28. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa setého pro rok 2011 vyjádřené v mg.kg⁻¹.

Proso seté - části 2011				
Lignany	Stonky (n = 12)	Kořeny (n = 12)	Slupky (n = 12)	Obilky (n = 12)
CLAR	0.70 ± 0.13 ^b	0.39 ± 0.45	0.21 ± 0.39	ND
HMR	8.47 ± 8.74	1.24 ± 0.75	3.57 ± 1.37	0.82 ± 0.67
SEC	12.5 ± 6.71	9.05 ± 2.68	1.85 ± 0.71	0.72 ± 0.26
LAR	35.6 ± 3.27	22.6 ± 5.13	12.6 ± 6.50	4.38 ± 2.06
PIN	2.40 ± 0.64	4.39 ± 2.57	4.69 ± 1.54	0.84 ± 0.31
SYR	34.2 ± 10.0	48.0 ± 22.6	1.14 ± 0.94	0.38 ± 0.23
CONI	2.36 ± 0.96	9.99 ± 4.69	7.98 ± 3.49	2.21 ± 0.91
MR	2.40 ± 1.12	4.62 ± 2.80	3.51 ± 2.14	0.73 ± 0.50
ARC	1.39 ± 1.22	0.96 ± 0.72	0.44 ± 0.33	ND
dOMR	83.8 ± 7.62	142 ± 29.8	26.6 ± 13.2	5.50 ± 1.44

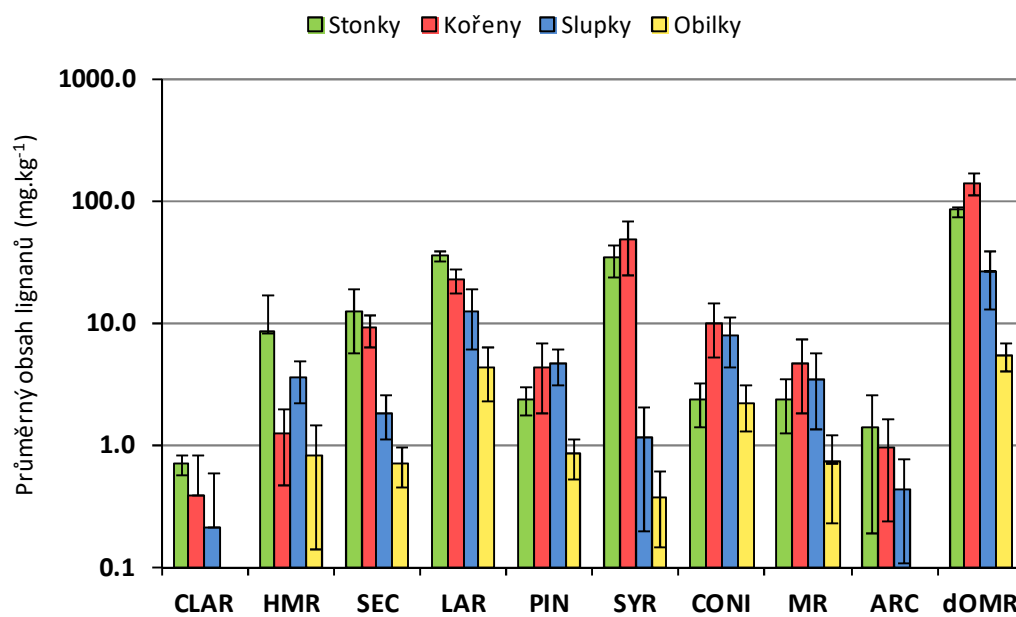
^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.

Tabulka 29. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa setého pro rok 2012 vyjádřené v mg.kg⁻¹.

Proso seté - části 2012				
Lignany	Stonky (n = 12)	Kořeny (n = 12)	Slupky (n = 12)	Obilky (n = 12)
CLAR	0.30 ± 0.31 ^b	ND	ND	ND
HMR	3.36 ± 1.00	6.02 ± 1.32	8.13 ± 4.28	0.74 ± 0.63
SEC	12.7 ± 3.83	7.73 ± 2.66	1.95 ± 1.22	0.41 ± 0.35
LAR	47.6 ± 8.87	33.6 ± 10.8	12.1 ± 8.46	2.96 ± 2.27
PIN	2.43 ± 0.92	7.25 ± 3.60	5.06 ± 2.04	0.53 ± 0.19
SYR	38.3 ± 9.20	12.9 ± 7.48	1.42 ± 0.49	0.21 ± 0.12
CONI	2.17 ± 0.71	9.30 ± 2.64	14.0 ± 3.79	3.59 ± 1.16
MR	1.61 ± 0.22	2.71 ± 0.49	4.41 ± 2.66	0.51 ± 0.33
ARC	1.87 ± 1.35	ND	ND	ND
dOMR	97.1 ± 18.7	135 ± 17.2	19.0 ± 6.34	3.68 ± 1.21

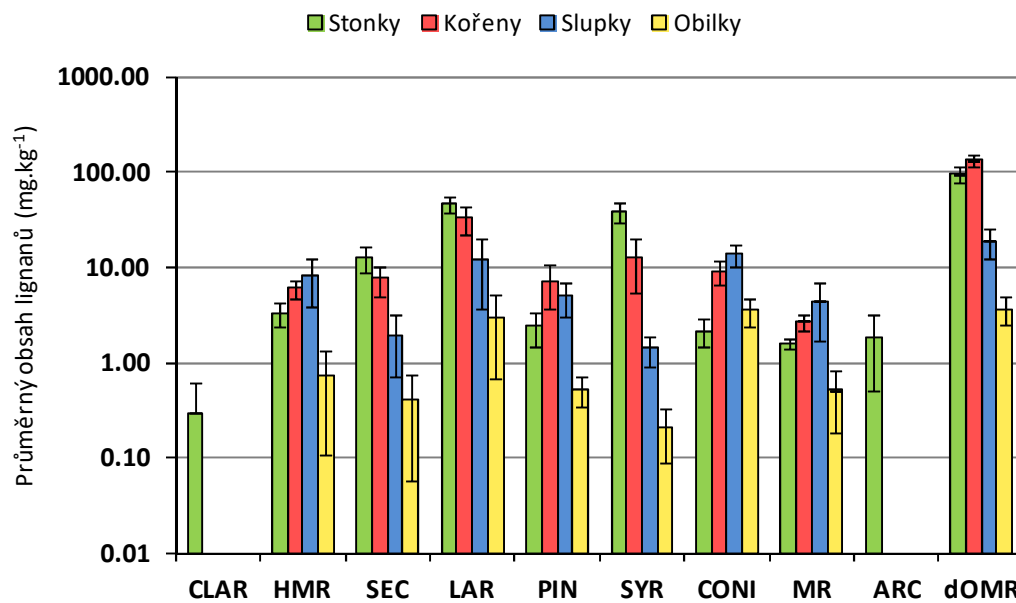
^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.

Proso seté - části 2011



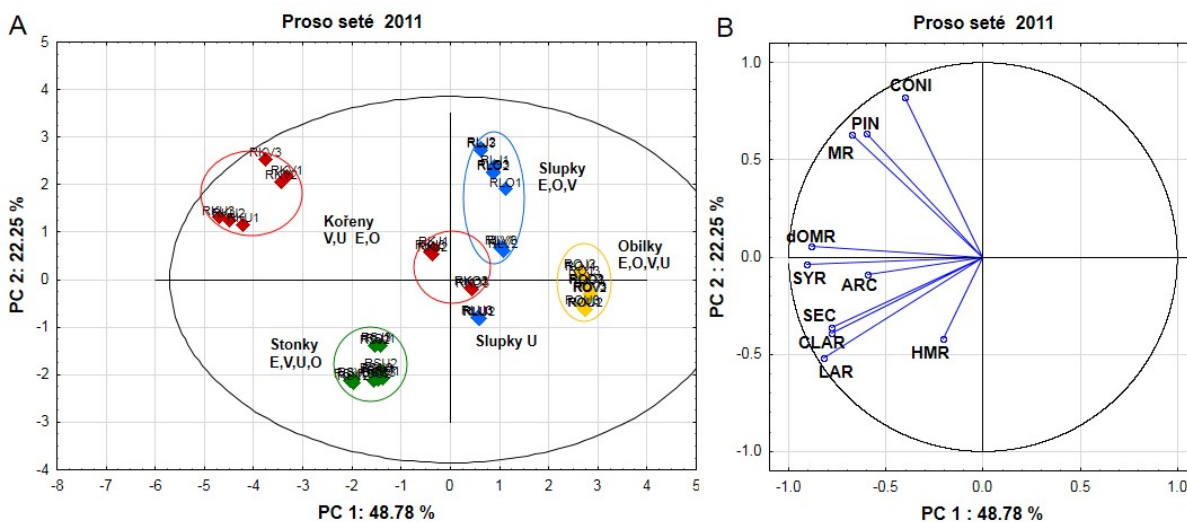
Obrázek 38. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa setého pro rok 2011.

Proso seté - části 2012

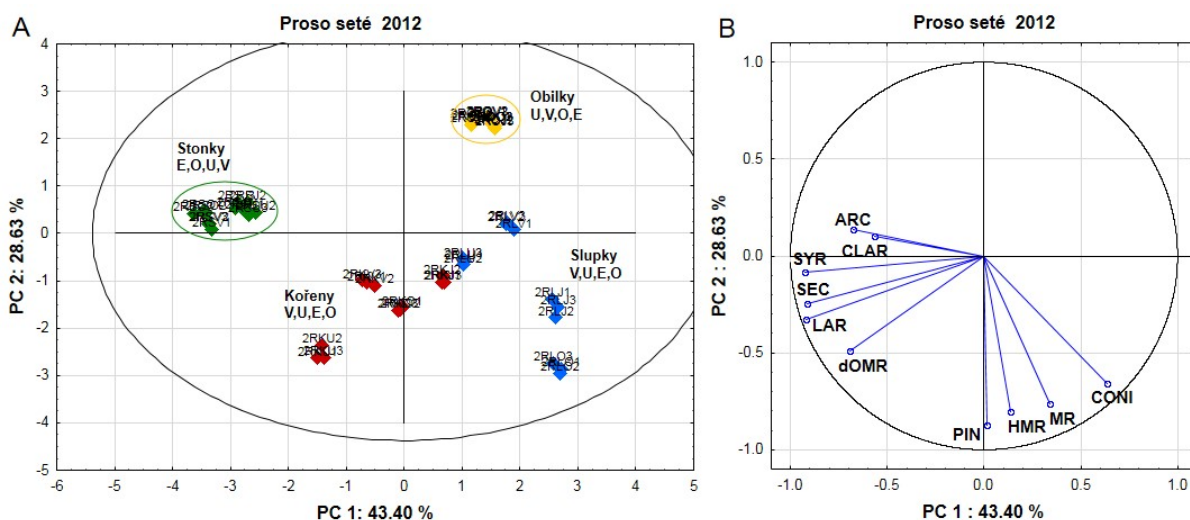


Obrázek 39. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa setého pro rok 2012.

Na **obrázku 40** je znázorněna analýza hlavních komponent (PCA) vzorků prosa pro rok 2011. Z modelu PCA jsou zřejmé korelace jednotlivých skupin vzorků pro dané části rostliny. Nejvíce je patrná korelace všech odrůd obilek podobně jako vzorků nažek u pohanky, dále spolu silně korelují stonky všech odrůd, slupky odrůd Jantarnoe (E), Omskoe (O) a Veselopodoliaskoe. (V), kořeny odrůd Veselop. (V) a Unikum a kořeny odrůd Jantarnoe (E) a Omskoe (O). První hlavní komponenta (PC 1) vystihuje variabilitu vzorků ze 49 % a je tvořena převážně SYR (16,8 %) a dOMR (16,1 %), dále LAR (13,8%), SEC (12,5 %) a CLAR (12,4 %). Druhá hlavní komponenta (PC 2) rozlišuje vzorky z 22 % a tvoří ji převážně CONI (30,4 %), PIN (18,1 %), MR (17,9 %) a LAR (12,2 %). Při porovnání obou projekcí do komponentní roviny je patrné, že v kořenech převažuje dOMR, v kořenech a stoncích dále SYR, LAR, CLAR a ARC. Kořeny odrůd Veselop. a Unikum spolu silněji korelují s ohledem na vyšší podíl dOMR, SYR, LAR, SEC a CLAR než v odrůdách Jantarnoe a Omskoe. Stonky odrůdy Unikum méně korelují s ostatními vzorky s ohledem na vyšší podíl SYR, částečně i LAR a zejména díky nepřítomnosti HMR. Ve slupkách a kořenech je hojně obsažen CONI a PIN, v obilkách je nejnižší obsah dOMR, proto jsou vzorky obilek znázorněny na opačné straně projekce než kořeny.



Obrázek 40. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků prosa setého do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech prosa pro rok 2011; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

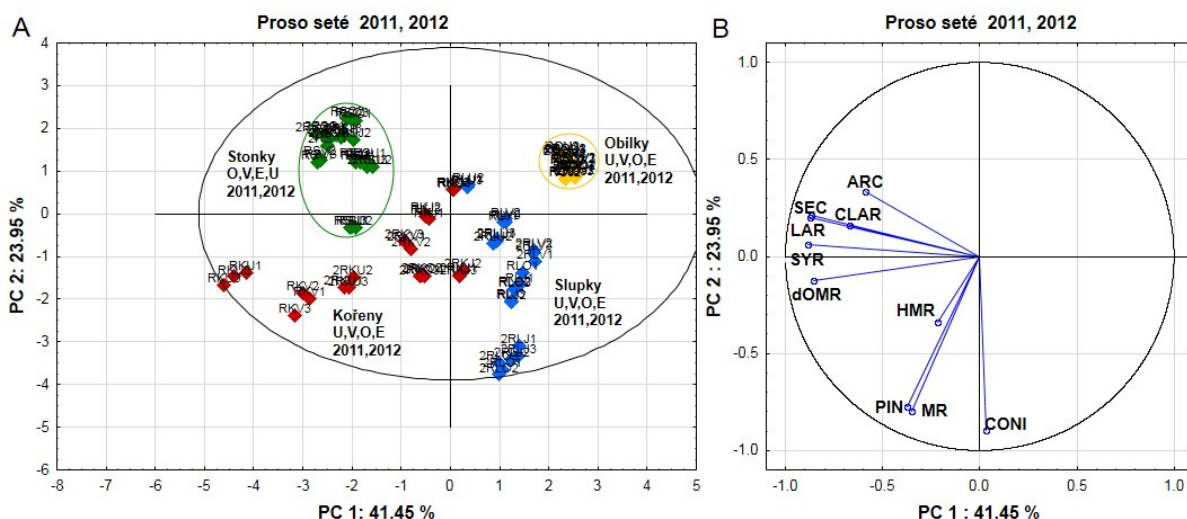


Obrázek 41. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků prosa setého do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech prosa pro rok 2012; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

Model PCA prosa setého pro rok 2012 je znázorněn na **obrázku 41**. PC 1 vystihuje variabilitu proměnných ze 43 % a je tvořena zejména SYR (19,7 %), LAR (19,4 %) a CONI (19,2 %), dále dOMR (11,2 %) a ARC (10,6 %). PC 2 vystihuje proměnlivost souboru z 29 % a je tvořena převážně PIN (26,7 %), HMR (22,5 %), MR (20,3 %) a CONI (15,1 %). Podobně jako v roce 2011 i v roce 2012 spolu silně korelují vzorky všech odrůd obilky a stonků. Mezi vzorky kořenů a slupek je patrná mírná odlišnost v koncentraci a zastoupení jednotlivých lignanů. Ve stoncích je oproti ostatním částem obsažen ARC, dominuje LAR, SYR a SEC. V kořenech opět dominuje dOMR a ve slupkách CONI, HMR, PIN a MR.

Souhrnný model PCA pro oba roky 2011 a 2012 je znázorněn na **obrázku 42**. PC 1 vystihuje variabilitu proměnných ze 42 % a je tvořena převážně SYR (19,0 %), SEC (18,5 %), LAR (18,2 %), dOMR (17,7 %) a CLAR (10,9 %). PC 2 vystihuje proměnlivost souboru z 24 % a je tvořena převážně CONI (33,5 %), MR (26,4 %) a PIN (25,2 %). Z uvedených projekcí do komponentní roviny vyplývají silné korelace obilky pro oba roky 2011 a 2012 a dále významné korelace stonků, kde se částečně oddělily pouze stonky odrůdy Unikum pro rok 2011. Tato odrůda v roce 2011 jako jediná neobsahuje ARC a je zde výrazněji zastoupen HMR (23 mg.kg⁻¹), ostatní odrůdy z roku 2011 a všechny odrůdy v roce 2012 obsahují o řád méně HMR. Z projekcí je dále patrná korelace kořenů i slupek, přičemž jsou mezi jednotlivými odrůdami patrné částečné rozdíly v zastoupení a koncentraci konkrétních

lignanů. V kořenech výrazněji dominuje dOMR a ve slupkách HMR, v roce 2011 je ve slupkách více PIN a v roce 2012 i CONI a MR.



Obrázek 42. Analýza hlavních komponent; (A) projekce vzorků prosa setého do komponentní roviny pro zhodnocení distribuce lignanů v jednotlivých částech prosa pro roky 2011 a 2012; (B) projekce kvantifikovaných lignanů do komponentní roviny.

Souhrnné výsledky, charakterizující distribuci lignanů v jednotlivých částech a odrůdách prosa setého pro oba roky 2011 a 2012, jsou uvedeny v *tabulce 30* a na *obrázku 43*. Nejbohatší částí z hlediska celkového obsahu lignanů byly jako v případě pohanky kořeny, avšak u vzorků prosa nebyl zaznamenán tak výrazný rozdíl v obsahu lignanů od ostatních částí rostliny. V roce 2011 zaujímaly kořeny v průměru 48 % z celkového obsahu lignanů a v roce 2012 43 %. Průměrný obsah lignanů byl v kořenech 243 mg.kg⁻¹ v roce 2011 a v roce 2012 214 mg.kg⁻¹. Mezi jednotlivými odrůdami byly v roce 2011 zaznamenány výraznější rozdíly v celkovém obsahu lignanů než v roce 2012. V roce 2011 byl nevyšší obsah lignanů v kořenech odrůdy Unikum (333 mg.kg⁻¹), následovala odrůda Veselop. (271 mg.kg⁻¹) odrůda Omskoe (174 mg.kg⁻¹) a Yantarnoe (195 mg.kg⁻¹). V roce 2012 byl celkový obsah lignanů v kořenech vyrovnanější, nejbohatší byla opět odrůda Unikum (258 mg.kg⁻¹), následovala odrůda Omskoe a Veselop. (220 a 213 mg.kg⁻¹) a nejnižší obsah lignanů byl v odrůdě Yantarnoe (165 mg.kg⁻¹).

Stonky zaujímaly v roce 2011 36 % z celkového obsahu lignanů v prosu a v roce 2012 42 %. Průměrný obsah lignanů ve stoncích byl v roce 2011 184 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 207 mg.kg⁻¹. Jednotlivé odrůdy vykazovaly v obou letech poměrně vyrovnané hladiny

celkových lignanů. V roce 2011 bylo nejvíce lignanů ve stoncích obsaženo v odrůdě Unikum (201 mg.kg^{-1}) a v roce 2012 naopak nejméně (173 mg.kg^{-1}). V roce 2012 bylo nejvíce lignanů ve stoncích obsaženo v odrůdě Veselop. (232 mg.kg^{-1}) a naopak v roce 2011 dosáhla nejnižších hodnot ze všech odrůd (176 mg.kg^{-1}).

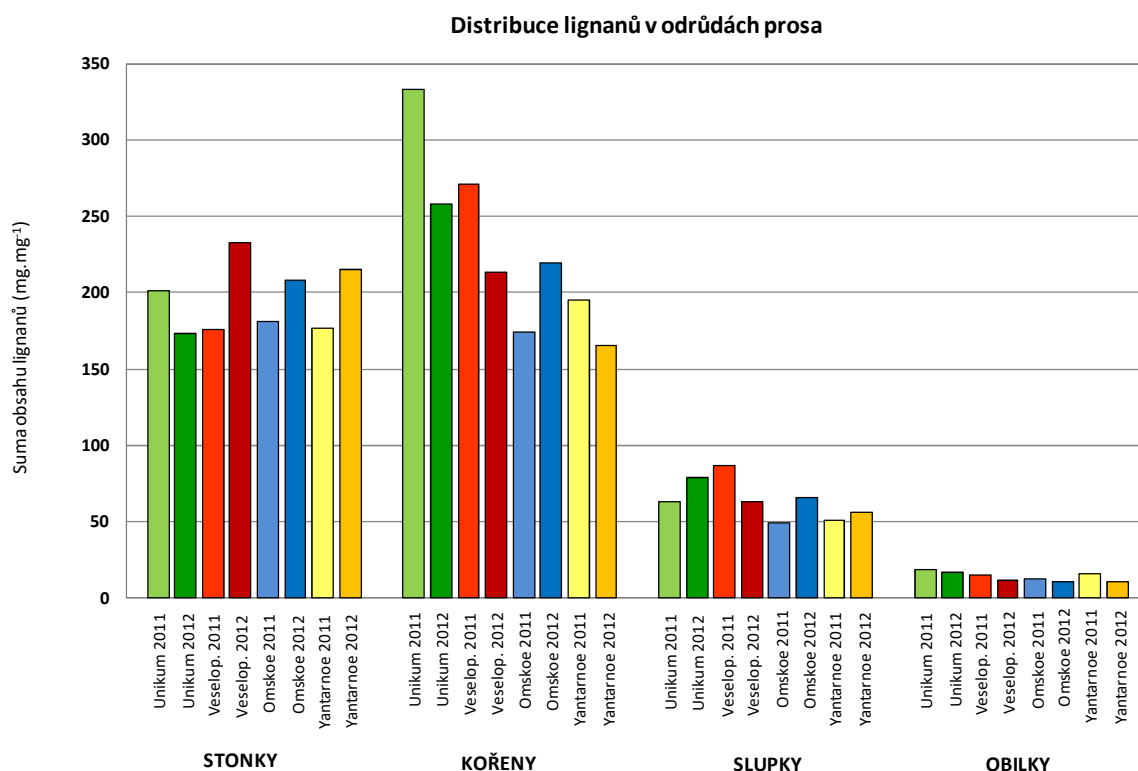
Obsah lignanů ve slupkách byl pro oba roky jako v případě pohanky poměrně vyrovnaný a tvořil v průměru 12 a 13 % z celkového obsahu lignanů. Průměrný obsah lignanů ze všech čtyřech odrůd činil v roce 2011 63 mg.kg^{-1} a v roce 2012 66 mg.kg^{-1} . Z hlediska odrůd bylo nejvíce lignanů ve slupkách obsaženo v odrůdě Veselop. (86 mg.kg^{-1}), nejméně v odrůdě Yantarnoe (51 mg.kg^{-1}). V roce 2012 byl nejvyšší obsah lignanů v odrůdě Unikum (79 mg.kg^{-1}) a nejméně opět v odrůdě Yantarnoe (56 mg.kg^{-1}). Opět se zde nabízí porovnání s výsledky dosaženými v nedávné studii Smeds et al. (2012), kde byl celkový obsah lignanů ve slupkách žita 45 mg.kg^{-1} , pšenice (31 mg.kg^{-1}) a ovsa (15 mg.kg^{-1}).

Nejnižší hladina lignanů byla zaznamenána v obilkách prosa. Jak již bylo uvedeno výše, tvořil obsah lignanů v obilkách pouze v průměru 3 a 2,5 % z celkového obsahu lignanů pro roky 2011 a 2012. Průměrný obsah lignanů byl v roce 16 a 13 mg.kg^{-1} pro roky 2011 a 2012, což je více než ve studii finských autorů (Smeds et al. 2007), kde byl celkový obsah lignanů v prosu 9 mg.kg^{-1} , ačkoliv kvantifikované spektrum lignanů bylo širší. Nejvyšší obsah lignanů byl zaznamenán v odrůdě Unikum pro oba roky (19 a 17 mg.kg^{-1}). Při porovnání obsahu lignanů v obilkách a slupkách prosa byl obsah lignanů v obilkách v roce 2011 od 17 do 32 %, což je poměrně široký rozsah. V roce 2012 byl průměrný obsah lignanů v obilkách prosa v rozmezí od 16 do 22 %, přičemž větší podíl lignanů v obilkách prosa byl zaznamenán v odrůdách Yantarnoe (32 a 20 %) a Unikum (29 a 22 %) pro oba roky. Rozdíl v obsahu lignanů ve zmíněných odrůdách v porovnání s odrůdami Veselop. a Omskoe, ve kterých byl zaznamenán nižší obsah lignanů, může souviset se specifickou strukturou obilek, zejména s podílem obalových vrstev tedy s perispermem (oplodím) a perikarpem (osemením). Z uvedených výsledků vyplývá, že jsou lignany koncentrovány zejména v obalových vrstvách. Došli jsme tedy k opačnému závěru než finští autoři (Smeds et al. 2007).

Tabulka 30. Souhrnné výsledky obsahu lignanů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v jednotlivých částech a odrůdách prosa setého pro rok 2011 a 2012.

Proso seté - části 2011, 2012				
Lignany	Stonky	Kořeny	Slupky	Obilky
Suma 2011	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)
Celkem průměr	184 ± 26.5	243 ± 43.8	62.6 ± 8.10	15.6 ± 1.95
Unikum	201 ± 26.4	333 ± 58.8	63.2 ± 8.56	18.5 ± 2.60
Veselop.^a	176 ± 24.3	271 ± 44.9	86.5 ± 14.7	15.1 ± 2.16
Omskoe	181 ± 30.0	174 ± 34.0	49.3 ± 5.33	12.5 ± 1.44
Yantarnoe	176 ± 27.1	195 ± 38.4	51.4 ± 5.78	16.2 ± 2.01
Suma 2012	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)
Celkem průměr	207 ± 31.7	214 ± 44.6	66.1 ± 6.26	12.6 ± 1.54
Unikum	173 ± 24.2	258 ± 45.7	78.9 ± 9.23	17.4 ± 2.29
Veselop.^a	232 ± 33.5	213 ± 39.3	63.4 ± 8.56	11.5 ± 1.61
Omskoe	209 ± 34.2	220 ± 45.8	66.0 ± 5.96	10.7 ± 1.42
Yantarnoe	215 ± 36.5	165 ± 33.6	56.0 ± 6.06	10.9 ± 1.56

^aOdrůda Veselopodoliaskoe.



Obrázek 43. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v jednotlivých částech a odrůdách prosa setého pro rok 2011 a 2012.

5.3.3 Souhrnný obsah lignanů v pohance a v prosu

V *tabulce 31* jsou uvedeny souhrnné výsledky průměrných obsahů jednotlivých lignanů v pohance seté pro roky 2011 a 2012 a jejich součty (*obr. 44*), dále průměrné hodnoty pohanky seté a tatarské dosažené v roce 2012 a celkové průměrné hodnoty pro roky 2011 a 2012 bez a s pohankou tatarkou. Z výsledků analýz je zřejmé, že v roce 2011 byl celkový obsah lignanů v pohance seté ve všech analyzovaných částech všech tří odrůd zhruba o třetinu vyšší než v roce 2012. Z hlediska statistické významnosti ($p < 0,05$) se v letech 2011 a 2012 mezi sebou lišily hladiny CLAR a MR. Při zahrnutí výsledků pohanky tatarské se statisticky významný rozdíl omezuje pouze na CLAR. Nejvyšší obsah lignanů byl v obou letech zaznamenán pro SYR 490 a 294 mg.kg⁻¹ (pro roky 2011 a 2012), CLAR 247 a 152 mg.kg⁻¹ a derivátu OMR 120 a 116 mg.kg⁻¹. Dalšími významnými lignany v pohance jsou PIN (51 a 47 mg.kg⁻¹; 2011, 2012) a LAR (29 a 41 mg.kg⁻¹; 2011, 2012).

Souhrnné výsledky profilu lignanů pro vzorky prosa setého pro roky 2011 a 2012 jsou uvedeny v *tabulce 32* a na *obrázku 44*. Z hlediska celkového obsahu lignanů nedošlo mezi roky 2011 a 2012 u vzorků prosa k výraznějším rozdílům jako u vzorků pohanky. Celkový obsah lignanů činil v roce 2011 505 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 500 mg.kg⁻¹. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi oběma roky byl zaznamenán pouze u lignanu CLAR. Nejvyšší obsah lignanů byl zaznamenán u derivátu OMR 258 a 254 mg.kg⁻¹ pro rok 2011 a 2012. Dalšími významnými lignany jsou LAR (75 a 96 mg.kg⁻¹; 2011 a 2012) a SYR s obsahy (84 a 53 mg.kg⁻¹; 2011 a 2012).

Při porovnání celkového průměrného obsahu lignanů v obou druzích plodin v obou letech 2011 a 2012, bylo dosaženo ve vzorcích pohanky (ze tří odrůd) v průměru 219 mg.kg⁻¹ a v prosu (ze čtyř odrůd) 126 mg.kg⁻¹, což je zhruba o polovinu méně než v pohance. Tento rozdíl je zřejmě dán druhovou specifičností obou plodin.

Tabulka 31. Souhrnné výsledky obsahu lignanů (mg.kg⁻¹) v pohance seté a tatarské pro rok 2011 a 2012.

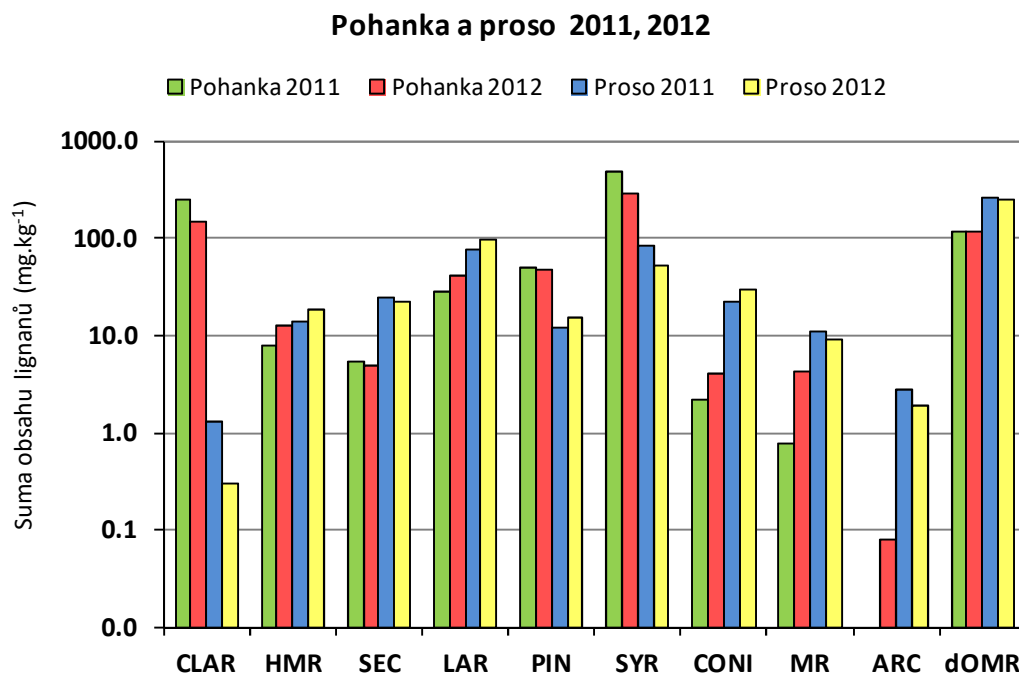
Lignany	Pohanka - celkem 2011, 2012						
	2011 Pohanka setá (n = 30)		2012 Pohanka setá (n = 36)		2012 Pohanka setá, p. tatarská (n = 42)	2011, 2012 Pohanka setá (n = 66)	2011, 2012 Pohanka setá, p. tatarská (n = 72)
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma			
CLAR	70.5 ± 31.6 ^b	247	38.0 ± 19.6	152	36.3 ± 20.0	52.7 ± 29.7	50.5 ± 30.5
HMR	2.25 ± 1.78	7.8	3.11 ± 4.32	12.4	130 ± 463	2.72 ± 365	76.6 ± 357
SEC	1.38 ± 1.65	5.5	1.25 ± 0.77	5.00	4.29 ± 11.3	1.31 ± 8.94	3.08 ± 8.77
LAR	7.51 ± 4.00	28.5	10.3 ± 7.07	41.2	10.1 ± 6.97	9.02 ± 6.00	9.01 ± 6.02
PIN	14.7 ± 15.8	50.5	11.8 ± 12.1	47.0	13.8 ± 14.2	13.1 ± 15.1	14.2 ± 14.8
SYR	146 ± 209	490	73.4 ± 104	294	78.7 ± 103	107 ± 161	107 ± 158
CONI	0.62 ± 0.61	2.2	1.04 ± 1.02	4.15	12.3 ± 41.3	0.85 ± 32.6	7.43 ± 31.9
MR	0.13 ± 0.27	0.8	1.04 ± 0.98	4.18	4.00 ± 11.0	0.63 ± 8.75	2.38 ± 8.58
ARC	ND	ND	0.02 ± 0.07	0.08	0.23 ± 0.77	0.01 ± 0.61	0.13 ± 0.60
dOMR	35.8 ± 46.0	120	29.1 ± 45.0	116	38.9 ± 54.9	32.1 ± 52.1	37.6 ± 51.0
Suma	279 ± 49.1	951	169 ± 23.8	676	328 ± 41.5	219 ± 34.4	308 ± 36.7

^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.

Tabulka 32. Souhrnné výsledky obsahu lignanů (mg.kg⁻¹) v prosu setém pro rok 2011 a 2012.

Lignany	Proso seté - celkem 2011, 2012				
	2011 (n = 48)		2012 (n = 48)		2011, 2012 (n = 96)
	průměr ± SD	suma	průměr ± SD	suma	
CLAR	0.33 ± 0.39 ^b	1.30	0.07 ± 0.20	0.30	0.20 ± 0.33
HMR	3.52 ± 5.29	14.1	4.56 ± 3.59	18.3	4.04 ± 4.53
SEC	6.02 ± 6.08	24.1	5.70 ± 5.46	22.8	5.86 ± 5.75
LAR	18.8 ± 12.6	75.2	24.1 ± 19.5	96.3	21.4 ± 16.5
PIN	3.08 ± 2.17	12.3	3.82 ± 3.30	15.3	3.45 ± 2.80
SYR	20.9 ± 24.1	83.7	13.2 ± 16.5	52.9	17.1 ± 20.9
CONI	5.64 ± 4.52	22.5	7.27 ± 5.31	29.1	6.45 ± 4.97
MR	2.82 ± 2.32	11.3	2.31 ± 1.97	9.24	2.56 ± 2.15
ARC	0.70 ± 0.88	2.79	0.47 ± 1.05	1.87	0.58 ± 0.97
dOMR	64.5 ± 56.1	258	63.6 ± 56.2	254	64.0 ± 55.9
Suma	126 ± 19.6	505	125 ± 19.3	500	126 ± 19.4

^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$).



Obrázek 44. Souhrnné výsledky obsahu lignanů v pohance a prosu pro rok 2011 a 2012.

5.3.4 Stanovení lignanů v amarantu

5.3.4.1 Distribuce lignanů v amarantu

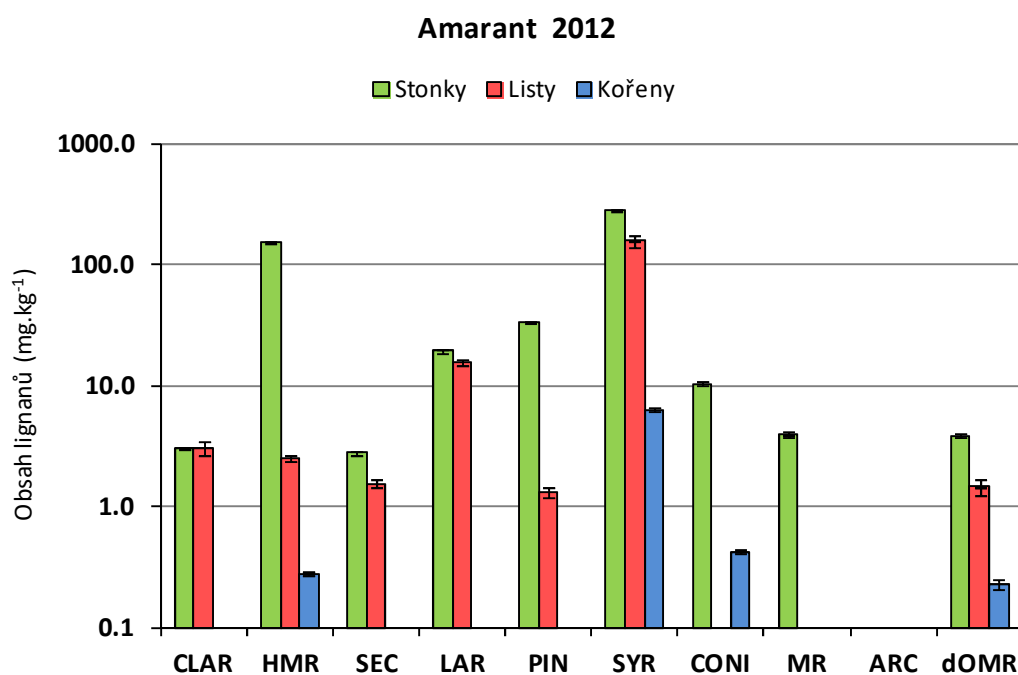
Profil zastoupení lignanů je v jednotlivých částech tj. v kořenech, stoncích a listech amarantu značně nerovnoměrný. Z výsledků analýz, které jsou shrnuty v *tabulce 33* a na *obrázku 45*, je zřejmé, že nejvyšší obsah lignanů je soustředěn ve stoncích 518 mg.kg⁻¹. V listech je celkový obsah lignanů téměř třikrát nižší než ve stoncích 183 mg.kg⁻¹ a nejnižší hladina lignanů byla zaznamenána v kořenech 7,3 mg.kg⁻¹. Nejvíce zastoupeným lignanem byl ve všech částech amarantu SYR s 76 % zastoupením (56 % ve stoncích, 86 % v listech a 87 % v kořenech). Všechny kvantifikované lignany vykazovaly statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi jednotlivými částmi amarantu.

Obsah SYR ve stoncích amarantu činil 288 mg.kg⁻¹, dále zde byl významně zastoupen HMR (30 %) 153 mg.kg⁻¹. Koncentrace ostatních lignanů ve stoncích amarantu se pohybovala o řád až dva níže než SYR a HMR. V listech byl obsah SYR 158 mg.kg⁻¹ a o řád níže se pohyboval LAR (8,5 %) 15,5 mg.kg⁻¹. Obsah lignanů v kořenech amarantu byl výrazně nižší než v ostatních částech rostliny a nesrovnatelně nízký v porovnání s pohankou a prosem.

Tabulka 33. Zastoupení lignanů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v jednotlivých částech amarantu pro rok 2012 (průměr \pm SD, $n = 3$; suma).

<i>Amaranthus hypochondriacus</i> 2012					
Lignany	Stonky	Listy	Kořeny	Celkem	Suma
CLAR	3.06 ± 0.09^b	3.09 ± 0.40	ND	2.05 ± 1.55	6.15
HMR	153 ± 3.17	2.53 ± 0.19	0.28 ± 0.01	52.0 ± 76.0	156
SEC	2.81 ± 0.09	1.56 ± 0.12	ND	1.46 ± 1.22	4.37
LAR	19.5 ± 0.59	15.5 ± 0.81	ND	11.7 ± 8.94	35.0
PIN	33.6 ± 0.57	1.35 ± 0.12	ND	11.6 ± 16.5	34.9
SYR	288 ± 5.56	158 ± 19.9	6.40 ± 0.20	151 ± 122	452
CONI	10.4 ± 0.34	ND	0.43 ± 0.02	3.61 ± 5.10	10.8
MR	3.98 ± 0.16	ND	ND	1.33 ± 1.99	3.98
ARC	ND	ND	ND	ND	ND
dOMR	3.90 ± 0.10	1.45 ± 0.22	0.23 ± 0.02	1.86 ± 1.62	5.58
Suma	518 ± 94.9	183 ± 49.3	7.34 ± 2.00	236 ± 49.4	709

^bPrůměrné hodnoty v řádcích – vyznačené kurzívou se statisticky významně liší na hladině pravděpodobnosti ($p < 0,05$); ND = nebylo detekováno.



Obrázek 45. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech amarantu pro rok 2012.

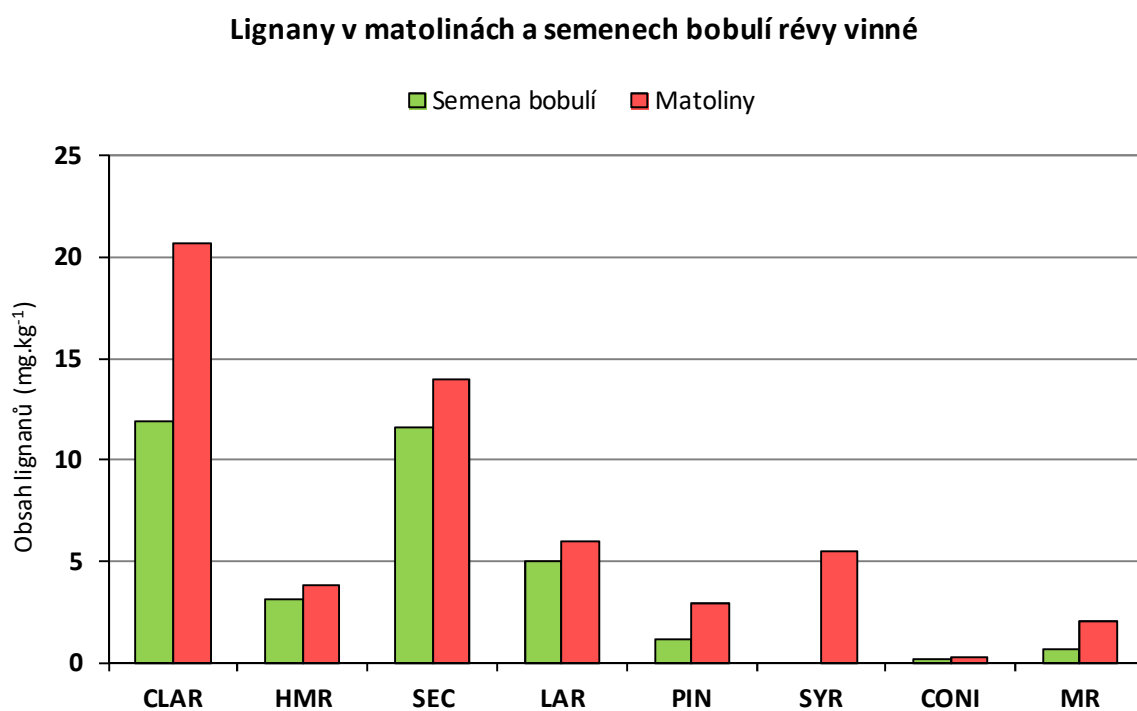
5.4 Stanovení lignanů v matolinách a semenech bobulí révy vinné

Pro stanovení lignanů byly dále využity odpadní produkty vznikající při zpracování hroznů révy vinné – matoliny a semena bobulí, oba směsné vzorky pocházely z modrých odrůd. Studie, které se dosud zabývaly chemickým složením matolin a dalších vinařských odpadních produktů byly většinou zaměřeny na stanovení polyfenolických sloučenin, zejména *trans*-resveratrolu či *trans*-viniferinu, nebo na stanovení vitaminů A a E (Lachman et al., 2011; Tríska et al., 2012). Z literatury jsou dostupné pouze informace o obsahu lignanů ve vínech (Mazur, 1998; Mazur a Adlercreutz, 2000; Nurmi et al., 2003; Milder et al., 2005; Thompson et al., 2006; Kuhnle et al., 2008), proto jsme předpokládali, že lignany by mohly být přítomny také v matolinách. Z uvedených studií vyplývá, že vyšší hladiny lignanů byly zjištěny ve vínech červených než ve vínech bílých. Nejrozsáhlejší studie (Nurmi et al., 2003) byla zaměřena na analýzu deseti vzorků vín (8 červených a 2 bílá vína), různých proveniencí a odrůd a celkem bylo kvantifikováno pět lignanů (SEC, MR, LAR, SYR a CLAR) z devíti (plus PIN, TRACH, ARC, ANSEC), s celkovým obsahem lignanů od 0,81 do 1,4 mg.l⁻¹ pro červená vína a 0,35 – 0,64 mg.l⁻¹ pro bílá vína. Nejhojněji obsaženým lignanem byl ve všech vzorcích vín CLAR s 63 % zastoupením z celkového obsahu lignanů a s průměrným obsahem 0,70 mg.l⁻¹, následoval SEC s 26 % a průměrným obsahem 0,29 mg.l⁻¹, dále LAR (4,8 % a 0,054 mg.l⁻¹), MAT (3,6 %, 0,040 mg.l⁻¹) a SYR (3,4 % a 0,038 mg.l⁻¹). Uvedená data platí pro červená vína. Vzorky vína byly analyzovány pomocí HPLC s coulometrickou detekcí.

Matoliny a semena bobulí modrých odrůd byly v rámci naší studie analyzovány pomocí LC-MS. Celkový obsah lignanů v matolinách se pohyboval na hladině 55,3 mg.kg⁻¹ a u semen bobulí 33,7 mg.kg⁻¹ (**tabulka 34 a obrázek 46**). Nejvíce zastoupeným lignanem v matolinách i v semenech bobulí byl podobně jako ve vzorcích vín CLAR, s 35 - 37 % zastoupením a obsahem 11,9 - 20,7 mg.kg⁻¹ (semena, matoliny), dále SEC (34 – 25 %) a obsahem 11,6 – 14,0 mg.kg⁻¹ a LAR (15 - 11 %) 5,0 – 6,0 mg.kg⁻¹. V matolinách byl dále významnější obsah SYR (10 %) s koncentrací 5,6 mg.kg⁻¹, který v semenech bobulí nebyl detekován. Dále byly ve vzorcích matolin a semen bobulí kvantifikovány lignany HMR, PIN, MR a CONI, přičemž lignany HMR a CONI nebyly dosud ve vzorcích vín detekovány.

Tabulka 34. Obsah lignanů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v matolinách a semenech bobulí (průměr, $n = 2$, $\text{RSD} < 20\%$).

Lignany	Semena bobulí révy vinné	Matoliny
CLAR	11.9	20.7
HMR	3.15	3.81
SEC	11.6	14.0
LAR	5.04	6.03
PIN	1.15	2.99
SYR	ND	5.55
CONI	0.21	0.26
MR	0.64	2.04
Suma	33.7	55.3



Obrázek 46. Zastoupení lignanů v matolinách a semenech bobulí.

5.5 Stanovení lignanů v přírodních vodách

Ve vybraných lokalitách s výskytem mokřadů a různým zastoupením dřevin, které rostou přímo ve vodě nebo na břehu, byly odebrány vzorky vody (Mokré, tankodrom a rozvodí Lužnice) s předpokladem vyluhování lignanů (zejména HMR) obsažených v biomase stromů. V případě potvrzení tohoto předpokladu by přítomnost lignanů ve vodě mohla být biomarkerem lužního lesa.

Analýza lignanů ve vybraných vzorcích přírodních vod byla provedena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) (*obr. 47 a 48*). V *tabulce 35* jsou uvedeny výsledky stanovení lignanů v proměřených lokalitách. Výsledky jsou doplněny o stanovení rozpuštěného uhlíku (DOC) (Hydrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.) a o porovnání získaných dat s literárními údaji (Smeds et al., 2007b).

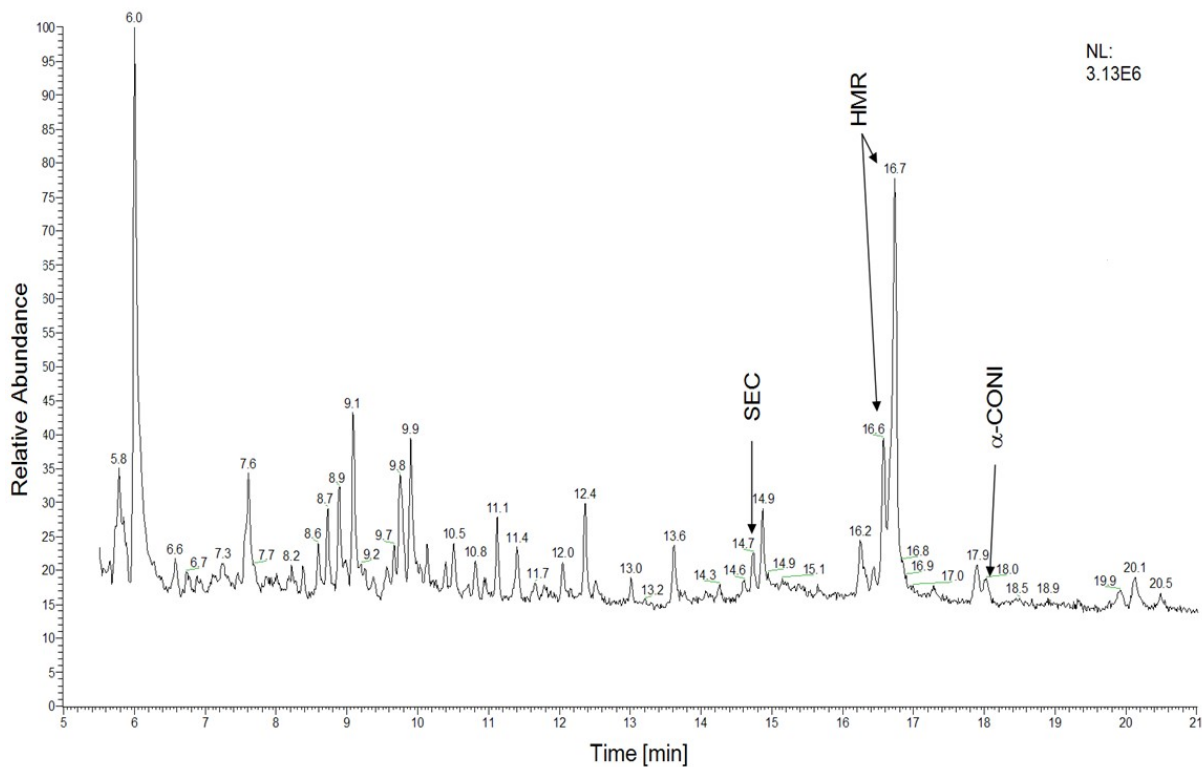
Tabulka 35. Obsah lignanů v přírodních vodách a porovnání výsledků s literaturou.

Lokalita	HMR ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	SEC ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	DOC (mg.l^{-1})
Mokré ^a	27,1	D	8,7
Tankodrom ^a	206,6	D	8,2
Rozvodí Lužnice ^a	64,9	D	14,4
Mořská voda ^b	0,000049	ND	
Vodovodní voda ^b	0,157	ND	
Přírodní huminová voda ^b	0,071	0,0279	

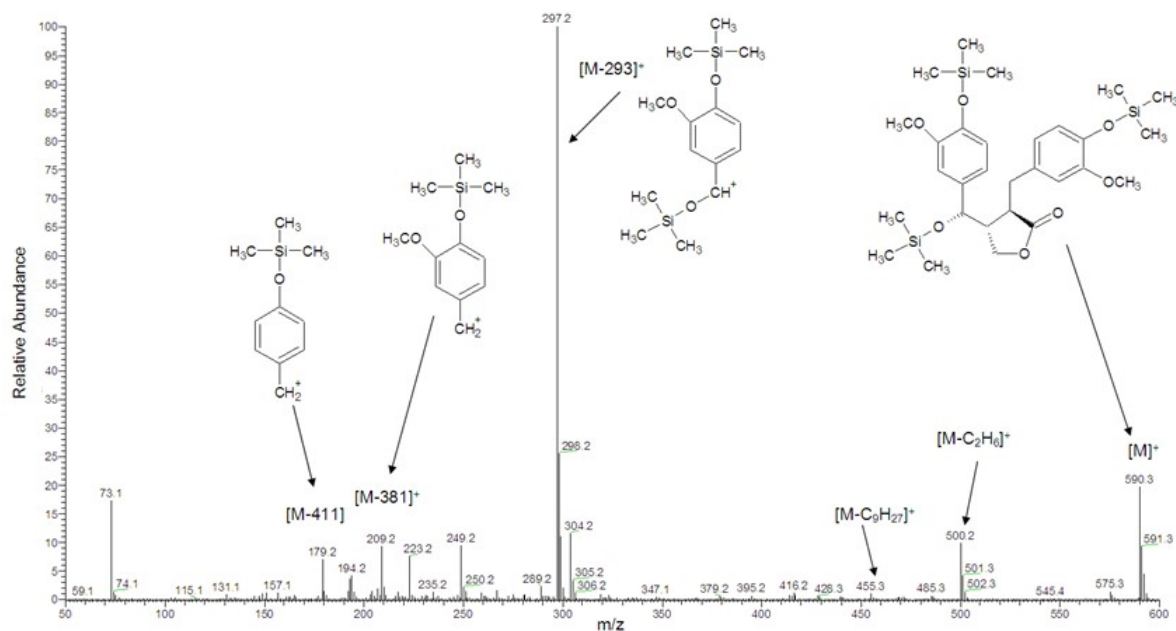
^aDetekován též CONI; ^bstudie (Smeds et al., 2007b); D = detekováno; ND = nebylo detekováno.

Z naměřených výsledků je patrné, že na lokalitě „tankodrom“ byl nalezen nejvyšší obsah HMR, což je dáno pravděpodobně tím, že na uvedené lokalitě se nacházejí trvale zamokřené plochy se stojící vodou, ve které rostou různé dřeviny, převážně vrby a olše. Vezme-li se v úvahu obsah rozpuštěného organického uhlíku, pak cca 2,5 % z tohoto množství tvoří HMR, což je poměrně velké množství. Naproti tomu ve vzorku rozvodí Lužnice klesá toto množství na cca 0,5 % při stoupající hodnotě DOC, což znamená, že ve vodě musí být přítomny další látky, které nepatří mezi lignany. Ve všech odebraných vzorcích vod je přítomen rovněž SEC a CONI (*obr. 47*), ale jejich koncentrace se pohybovaly v oblasti limitu detekce pro HMR 1,32 – 3,78 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Na potvrzení hypotézy, že by přítomnost lignanů ve vodě mohla být biomarkerem lužního lesa se stále pracuje a zkoumají se vzorky z různých vodních ekosystémů (jižní Čechy, Šumava, jižní Morava, Vltava aj.).



Obrázek 47. GC-MS chromatogram vzorku vody odebraného v rozvodí řeky Lužnice.



Obrázek 48. Hmotnostní spektrum trimethylsilyl (TMS) etheru HMR ve vzorku vody z rozvodí Lužnice.

6. ZÁVĚRY

- Předložená disertační práce byla zaměřena na studium distribuce lignanů v biomase dřevin, zejména smrku ztepilém, v biomase vybraných druhů obilovin a pseudocereálií, v prosu, pohance a amarantu a v odpadních zemědělských produktech. Důležitou součástí práce byl vývoj a optimalizace metod pro přípravu, zpracování a vlastní analýzu vybraných vzorků. Dílčím cílem práce byla identifikace lignanů ve vodním ekosystému.
- Pro zpracování vzorků byla z testovaných extrakčních technik nejúčinnější metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE) za použití methanolu nebo směsi acetonu s vodou (70:30 nebo 95:5 v.v⁻¹) po odstranění lipofilních látek *n*-hexanem. Pro analýzu lignanů byla optimalizována metoda kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS) za využití chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v negativním modu.
- Část studie byla zaměřena na identifikaci neznámých lignanů, izolovaných ze suků smrku ztepilého. V přečištěných HPLC frakcích byly za využití metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) identifikovány lignany 7*S*-todolaktol A a 7*R*-todolaktol A, 7'-hydroxylariciresinol a dva stereoisomery 9'-hydroxylariciresinolu. Struktury těchto lignanů byly potvrzeny pomocí nukleární magnetické resonance (NMR). Identifikace 7*S*- a 7*R*-isoliolů byla potvrzena na základě hmotnostních spekter, dále byl předběžně identifikován 7'-oxolariciresinol. Z uvedených lignanů byl ve smrku ztepilém identifikován pouze 7'-hydroxylariciresinol. V extraktu suku bylo dále detekováno několik desítek dalších lignanů, některé z nich měly podobná hmotnostní spektra jako todolaktoly, isoliolovy a 7'-hydroxylariciresinol, u dalších lignanů struktura není známa. Neznámé lignany tvořily přibližně 6 % sušiny extraktu.
- Distribuce lignanů byla sledována v biomase tří odrůd pohanky seté, pohanky tatarské, čtyř odrůd prosa setého a amarantu, sklizených v letech 2011 a 2012. Ve vzorcích bylo využitím metody LC-MS kvantifikováno 10 lignanů. Profil zastoupení jednotlivých lignanů byl ve všech třech odrůdách pohanky seté pro oba roky 2011 a 2012 podobný. Nejvíce lignanů v roce 2011 obsahovala odrůda Jana 1173 mg.kg⁻¹ a v roce 2012 odrůda Špačinská 732 mg.kg⁻¹, s nejvíce dominantními lignany syringaresinolem (SYR), dále cyklolariciresinolem (CLAR) a derivátem oxomatairesinolu (dOMR). V obou letech byly

u všech analyzovaných částí pohanky (stonky, kořeny, slupky a nažky) zaznamenány statisticky významné rozdíly v obsahu lignanů, vyjma HMR. Nejvyšší obsah lignanů byl nalezen v kořenech (66 %) s dominantním SYR. Až 4x vyšší obsah lignanů 2 500 mg.kg⁻¹ byl v roce 2012 zjištěn v kořenech pohanky tatarské s dominantním HMR. Stonky pohanky obsahovaly 19,5 % a slupky 11,5 % z celkového obsahu lignanů. Slupky nažek dále obsahovaly 2x až 6x více lignanů než jaké bylo zjištěno v otrubách žita, pšenice a ovsa. Lignany jsou spíše koncentrovány v obalových vrstvách nažek, přičemž nažky tvořily jen 3 % z celkového obsahu lignanů

- Ze souhrnné analýzy hlavních komponent (PCA) vyplynuly silné korelace vzorků nažek všech analyzovaných odrůd pro oba roky. Dále spolu významně korelovaly slupky všech odrůd a kořeny odrůd Pyra a Špačinská. Z modelů PCA pro oba roky jednoznačně vyplynuly korelace skupin vzorků, které reprezentovaly dané části rostliny, přičemž bylo z modelů patrné odlišení většiny částí rostliny vázané na konkrétní odrůdy. Celkový obsah lignanů byl v roce 2011 ve všech analyzovaných částech všech tří odrůd pohanky seté zhruba o třetinu vyšší než v roce 2012 951 a 676 mg.kg⁻¹. Ve vzorcích prosa byly naopak hladiny celkového obsahu lignanů vyrovnané 505 a 500 mg.kg⁻¹, ale v porovnání s pohankou nižší.
- Profil zastoupení lignanů byl ve všech čtyřech odrůdách prosa setého pro oba roky podobný. Nejvíce lignanů bylo obsaženo v odrůdě Unikum (616 a 528 mg.kg⁻¹, pro roky 2011 a 2012) a odrůdě Veselop. Zastoupení lignanů v jednotlivých částech prosa bylo podobně jako u vzorků pohanky značně nerovnoměrné. Významně se v obou letech lišily hladiny všech kvantifikovaných lignanů pro všechny analyzované části. V obou letech dominovaly především derivát OMR, dále SYR a lariciresinol (LAR). Nejbohatší částí z hlediska celkového obsahu lignanů byly jako v případě pohanky kořeny 45,5 %, ale rozdíl mezi kořeny a stonky nebyl tak výrazný. Stonky tvořily 39 %, slupky 12,5 % a obilky prosa pouze 3 % z celkového obsahu lignanů. Lignany jsou také u obilek koncentrovány v obalových vrstvách. Ze souhrnného modelu PCA vyplynuly silné korelace obilek pro oba roky 2011 a 2012 a dále významné korelace stonků. Z projekcí vzorků prosa do komponentní roviny byla dále patrná korelace kořenů i slupek, přičemž byly mezi jednotlivými odrůdami patrné částečné rozdíly v zastoupení a koncentraci konkrétních lignanů.
- Zastoupení lignanů v jednotlivých částech tj. v kořenech, stoncích a listech amarantu bylo opět značně nerovnoměrné. Nejvyšší obsah lignanů byl soustředěn ve stoncích

(518 mg.kg⁻¹). V listech byl celkový obsah lignanů téměř třikrát nižší než ve stoncích a nejnižší hladina lignanů byla zaznamenána v kořenech. Obsah lignanů v kořenech amarantu byl výrazně nižší než v pohance (74x) a prosu (33x). Nejvíce zastoupeným lignanem byl ve všech částech amarantu SYR (76 %) a dále HMR. Všechny kvantifikované lignany vykazovaly mezi jednotlivými částmi amarantu statisticky významné rozdíly.

- Pro stanovení lignanů byly dále využity odpadní produkty vznikající při zpracování hroznů révy vinné – matoliny a semena bobulí, oba směsné vzorky pocházely z modrých odrůd. Celkový obsah lignanů se v matolinách pohyboval na hladině 55,3 mg.kg⁻¹ a u semen bobulí 33,7 mg.kg⁻¹. Nejvíce zastoupeným lignanem v matolinách i v semenech bobulí byl podobně jako ve vzorcích vín CLAR (35 a 37 %), dále sekoisolariciresinol (SEC) a LAR.
- Metodou GC-MS byla provedena analýza lignanů ve vybraných vzorcích přírodních vod. Nejvyšší obsah HMR byl nalezen na lokalitě „tankodrom“, s trvale zamokřenou plochou se stojící vodou, ve které rostou různé dřeviny. HMR tvořil z celkového rozpuštěného organického uhlíku cca 2,5 %. Na potvrzení hypotézy, že by přítomnost lignanů ve vodě mohla být biomarkerem lužního lesa se stále pracuje a zkoumají se vzorky z různých vodních ekosystémů.
- Výsledky této práce přináší vedle informací o nově identifikovaných lignanech v suchých smrkového dřeva či ve vzorcích přírodních vod, zejména nové poznatky o distribuci lignanů v biomase obilovin a pseudocereálií. Dosažené výsledky ukazují, že vedlejší produkty získané při zpracování těchto plodin mohou najít širší využití v potravinářském případně farmaceutickém průmyslu nebo jako technické produkty.

7. LITERATURA

Adlercreutz, H. Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2007, 44 (5-6), 483-525, ISSN 1040-8363.

Aehle, E., Müller, U., Eklund, P.C, Willför, S.M., Sippl, W., Dräger, B. Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, 2011, 72, 2396-2405.

Andersson, R., Popoff, T., Theander, O. A new lignan from Norway spruce. *Acta Chemica Scandinavica*. 1975, B29, 835-837.

Ayres D.C., Loike J.D. *Lignans: Chemical, biological and clinical properties*. Cambridge University Press, 1990.

Barrero, A.F., Haidour, A., Munoz Dorado, M. Lignans from the wood of *Abies pinsapo*. *Journal of Natural Products*. 1994, 57, 713-719.

Bárta, J., Kalinová, J., Moudrý, J., Čurn, V. Effects of selected environmental factors on protein content and composition in buckwheat flour. *Cereal Research Communications*. 2004, 32 (4), 541-548.

Bernini, R., Gualandi, G., Crestini, C., Bartonini, M., Belfiore, M.C., Willför, S., Eklund, P., Saladino, R. A novel and efficient synthesis of highly oxidized lignans by a methyltrioxorhenium/hydrogen peroxide catalytic system. Studies on their apoptogenic and antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009, 17, 5676-5682.

Castro M.A., Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., San Feliciano, A.S. The distribution of lignanoids in the order *Coniferae*. *Phytochemistry*. 1996, 41 (4), 995-1011.

Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. 2004, 65, 995-1016.

Eklund, P., Sillanpää, R., Sjöholm, R.J. Synthetic transformation of hydroxymatairesinol from Norway spruce (*Picea abies*) to 7-hydroxysecoisolariciresinol, (+)-lariciresinol and (+)-cyclolariciresinol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 2002, 1906-1910.

Eklund, P.C., Wilför, S.M., Smeds, A.I., Sundell, F.J., Sjöholm, R.E., Holmbom, B.R. A new lariciresinol-type butyrolactone lignan derived from hydroxymatairesinol and its identification in spruce wood. *American Chemical Society of Pharmacognosy*. 2004, 67 (6), 927-931.

Eklund, P., Sundell, F.J., Smeds, A.I., Sjöholm, R.E. Reactions of the natural lignan hydroxymatairesinol in basic and acidic nucleophilic media: formation and reactivity of a quinone methide intermediate. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2004b, 2, 2229-2235.

- Eklund, P.C., Backman, M.J., Kronberg, L.Å., Smeds, A.I., Sjöholm, R.E. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2008, 43, 97-107.
- Ekman, R. Analysis of lignans in Norway spruce by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Holtzforschung*. 1976, 30, 79-85.
- Ekman, R., Holmbom, B. Analysis by gas chromatography of the wood extractives in pulp and water samples from mechanical pulping of spruce. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*. 1989, 4, 16-24.
- Ekman, R., Willför, S., Sjöholm, R., Reunanen, M., Mäki, J., Lehtilä, C., Eckerman, C., Identification of the lignan nortrachelogenin in knot and branch heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Holtzforschung*. 2002, 56, 253-256.
- Freudenberg, K., Knof, L. Die Lignane des Fichtenholzes. *Chemische Berichte*. 1957, 90, 2857-2869.
- Freudenberg, K., Weinges, K. Lignane des Lärchen- und Erlenholzes. *Tetrahedron Letters*. 1959, 17, 19-22.
- Grougnet, R., Magiatis, P., Mitaku, S., Terzis, A., Tillequin, F., Skaltsounis, A.-L. New lignans from the perisperm of *Sesamum indicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 7570-7574.
- Hakkila, P. Structure and properties of wood and woody biomass. In: *Forest Resources and Sustainable Management*. Kellomäki, Tappi Press, Atlanta, GA, pp. 158-162.
- Hanuman, J.B., Mishra, A.K., Sabata, B.J. A natural phenolic lignan from *Tinospora cordifolia* Miers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1986, 1181-1185.
- Harmatha, J., Dinan, L. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews*. 2003, 2, 321-330.
- Harmatha, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů. *Chemické listy*. 2005, 99, 622-632.
- Holmbom, B., Eckerman, Ch., Eklund, P., Hemming, J., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K., Willför, S.M. Knots in trees – A new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews*. 2003, 2, 331-340.
- Holmbom, T., Reunanen, M., Fardim, P. Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, European larch and Douglas fir. *Holtzforschung*, 2008, 62 (4), 417-422.
- Horn-Ross, P.L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J.E., Koo, J., John, E.M., Smith, M., Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes & Control*. 2000, 11 (4), 289-298.

- Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., Fiksdahl, A. Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers. *Molecules*. 2006, 11 (1), 103-114.
- Huang, X., Song, F., Liu, Z., Liu, S. Studies on lignan constituents from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fruits using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, 42, 1148-1161.
- Jensen, S., Hansen, J., Boll, P.M. Lignans and neolignans from *Piperaceae*. *Phytochemistry*. 1993, 33 (3), 523-530.
- Jørgensen G., Carlberg G.E., Hoel H., Lystad E. Lignans in TMP effluents: Fate and effects, *Tappi Journal*, 1995, 78, 171-176.
- Kalinová, J., Moudrý, J. Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006, 61, 45-49.
- Kalinová, J., Dadáková, E. Varietal and year changes of rutin content in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Cereal Research Communication*. 2006, 34 (4), 1315-1321.
- Kalinová, J. Nutritionally important components of proso millet (*Panicum miliacem* L.). *Food 1*, 2007, 95-100.
- Keinan-Boker, L., van Der Schouw, Y.T., Grobbee, D.E., Peeters, P.H.M. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79, 282-288.
- Kuhnle, G.G.C., Dell' Aquila, C., Aspinall, S.M., Runswick, S.A., Mulligan, A.A., Bingham, S.A. Phytoestrogen content of beverages, nuts, seeds, and oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56 (16), 7311-7315.
- Lachman, J., Hejtmankova, A., Hejtmankova, K. Biologically active compounds in grape seeds, oil and marc – their acquisition and use. In: *International Nutrition & Diagnostics Conference*, Brno: Univerzita Pardubice, 2011, p. 45, ISBN 978-80-7395-378-2.
- Landete, J.M. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*. 2012, 46, 410-424.
- Li, X., Yuan, J.P., Xu, S.P., Wang, J.H., Liu, X. Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1185, 223-232.

- López, M.J.O., Innocenti, M., Leri, F., Giaccherini, C., Romani, A., Mulinacci, N. HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, 21, 62-70.
- Macias, F.A., López, A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G. Bioactive lignans from a cultivar of *Helianthus annuus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 6443-6447.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A., Adlercreutz, H. Isotope dilution gas chromatography – mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food amples. *Analytical Biochemistry*. 1996, 233, 169-180.
- Mazur, W. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998, 12 (4), 729-742.
- Mazur, W., Adlercreutz, H. Overview of naturely occuring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition*. 2000, 16, 654-687.
- Milder, I.E.J., Arts, I.C., Venema, D.P., Lasaroms, J.J., Wähälä, K., Hollman, P.C. Optimaization of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52, 4643-4651.
- Milder, I.E.J., Arts, I.C., van de Putte, B., Venema, D.P., Hollman, P.C. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*. 2005, 93, 393-402.
- Milder, I.E.J. *Lignan intake in the Netherlands and its relation with mortality*. 2007, p. 158. ISBN 978-90-8504-652-3.
- Miller, R.W., McLaughlin, J.L., Powell, R.G., Plattner, R.D., Weisleder, D., Smith, C.R. Jr. Lignans from *Taxus wallichiana*. *Journal of Natural Products*. 1982, 45, 78-82.
- Nuopponen, M., Willför, S., Jääskeläinen, A.S., Sundberg, A., Vuorinen, T. A UV resonance Raman (UVR) spectroscopic study on the extractable compounds of Scots pine (*Pinus sylvestris*) wood Part I: Lipophilic compounds. *Spectrochimica Acta Part A*. 2004, 60, 2953-2961.
- Nuopponen, M., Willför, S., Jääskeläinen, A.S., Vuorinen, T. A UV resonance Raman (UVR) spectroscopic study on the extractable compounds of Scots pine (*Pinus sylvestris*) wood Part II: Hydrophilic compounds. *Spectrochimica Acta Part A*. 2004b, 60, 2963-2968.
- Nurmi, T., Heinonen, S., Mazur, W., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H. Lignans in selected wines. *Food Chemistry*. 2003, 83, 303-309.

- Omori, S., Ozawa, S., Taneda, K. The extractives of Aomori Todomatsu (*Abies mariesii* Masters) – isolation of lignans from the heartwood. *Mokuzai Gakkaishi*. 1994, 40, 1107-1118.
- Ozawa, S., Sasaya, T. A new cyclolignan containing a lactol ring from *Abies sachalinensis* Masters. *Mokuzai Gakkaishi*. 1987, 33, 747-748.
- Ozawa, S., Sasaya, T. Extractives of Todomatsu *Abies sachalinensis* Masters. V. A novel dibenzylbutyrolactol lignan from the wood of *Abies sachalinensis*. *Mokuzai Gakkaishi*. 1988, 34, 851-857.
- Örså, F., Holmbom, B. A convenient method for the determination of wood extractives in papermaking process waters and effluents. *Journal of Pulp and Paper Science*. 1994, 20, 361-366.
- Penalvo, J.L. Haajanen, K.M., Botting, N., Adlercreutz, H., Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53 (24), 9342-9347.
- Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Holmbom, B.R. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*. 2006, 52, 436-444.
- Piispanen, R., Willför, S., Saranpää, P., Holmbom, B. Variation of lignans in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) knotwood: within-stem variation and the effect of fertilisation at two experimental sites in Finland. *Trees*. 2008, 22, 317-328.
- Prugar et al. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: VÚPS, a.s. 2008, s. 327, ISBN 978-80-86576-28-2.
- Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., Wähälä, K. Enterolignans. *Journal of Chromatography B*. 2002, 777, 29-43.
- Rysová, J., Paulíčková, I., Janovská, D., Ouhrabková, J., Gabrovská, D. Pohanka tatarská a její využití v potravinách. In: *XXXIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, Skalský Dvůr, 2008.
- Sahlberg, U., Influence of knot fibers on TMP properties. *Tappi Journal*, 78, 2005, pp. 162-168.
- Schwartz, H., Sontag, G. Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection. *Journal of Chromatography B*. 2006, 838, 78-85.
- Schwartz, H., Sontag, G., Plumb, J. Inventory of phytoestrogen database. *Food Chemistry*. 2009, 113, 736-747.

- Simakova, O.A, Smolentseva, E., Estrada, M., Murzina E.V., Beloshapkin, S., Willför, S.M., Simakov, A.V., Murzin, D.Y. From woody biomass extractives to health-promoting substances: Selective oxidation of the lignan hydroxymatairesinol to oxomatairesinol over Au, Pd, and Au-Pd heterogeneous catalysts. *Journal of Catalysis*. 2012, 291, 95-103.
- Simakova, O.A., Murzina, E.V., Leino, A.-R., Mäki-Arvela, P., Willför, S., Murzin, D.Y. Gold catalysts for selective aerobic oxidation of the lignan hydroxymatairesinol to oxomatairesinol: Catalyst deactivation and regeneration. *Catalysis Letters*. 2012b, 142, 1011-1019.
- Sirtori, C.R., Arnoldi, A., Johnson, S.K. Phytoestrogens: End of a tale? *Annals of Medicine*. 2005, 37, 1-16.
- Slanina, J. Biologická a farmakologická aktivita lignanů. *Chemické Listy*. 2000, 94, 111-116.
- Slanina, J., Glatz, Z. Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*. 2004, 812, 215-229.
- Smeds, A.I., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Willför, S.M., Nishibe, S., Deyama, T., Holmbom, B.R. Quantification of broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 1337-1346.
- Smeds, A.I., Willför, S.M., Pietarinen, S.P., Peltonen-Sainio, P., Reunanen, M.H.T. Occurrence of "mammalian" lignans in plant and water sources. *Planta*. 2007b, 226, 639-646.
- Smeds, A.I., Eklund, P.C., Willför, S.M. Content, composition, and stereochemical characterization of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*. 2012, 134, 1991-1998.
- Smeds, A. I., Češková I., Eklund, C. P., Willför, S. M. Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. *Holzforschung*. 2012b, 66, 553-567.
- Strohalm J., Halama R., Landfeld A., Houška M. Užitélný vzor: Zařízení na získání části využitelného odpadu při zpracování dřeva na řezivo. Zapsáno 14. 8. 2012 pod č. 24183.
- Suzuki, S., Umezawa, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of Wood Science*. 2007, 53, 273-284.
- Tan, R.X., Jakupovic, J., Jia, Z.J. Aromatic constituents from *Vladimira soulei*. *Planta medica*. 1990, 56, 475-477.
- Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., Cotterchio, M., Kreiger, N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutrition and Cancer – an International Journal*. 2006, 54 (2), 184-201.
- Tříška, J., Vrchotová, N., Olejníčková, J., Jílek, R., Sotolář, R. Separation and identification of highly fluorescent compounds derived from *trans*-resveratrol in the leaves of *Vitis vinifera* infected by *Plasmopara viticola*. *Molecules*. 2012, 17, 2773-2783.

- Umezawa, T. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*. 2003, 2, 371-390.
- Umezawa, T. Phylogenetic distribution of lignans producing plants. *Wood Research*. 2003b, 90, 27-110.
- Wang, L.Q. Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography B*. 2002, 777, 289-309.
- Willför, S.M. Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, CH., Holmbom, B. Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*. 2003, 57, 27-36.
- Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M., Holmbom, B. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforshung*. 2003b, 57, 395-372.
- Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H.T., Elkund, P.C., Sjöholm, R.E., Eckerman, CH.S.E., Pohjamo, S.P., Holmbom, B.R. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003c, 51, 7600-7606.
- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., Holmbom, B. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforschung*. 2004, 58, 335-344.
- Willför, S., Nisula, L., Hemming, J., Reunanen, M., Holmbom, B. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzforschung*. 2004b, 58 (6), 650-659.
- Willför, S., Reunanen, M., Eklund, P., Sjöholm, R., Kronberg, L., Fardim, P., Pietarinen, S., Holmbom, B. Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce stemwood. *Holzforschung*. 2004c, 58, 345-354.
- Willför, S., Eklund, P., Sjöholm, R., Reunanen, M., Sillanpää, R., von Schoultz, S., Hemming, J., Nisula, L., Holmbom, B. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part4: Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species. *Holzforshung*. 2005, 59, 413-417.
- Willför, S.M., Sundberg, A.C., Rehn, P.W., Holmbom, B.R., Holmbom, B.R., Saranpää, P.T. Distribution of lignans in knots and adjacent stemwood of *Picea abies*. *Holzforschung*. 2005b, 63, 353-357.
- Willför, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1112, 64-77.
- Willför, S., Hafizo~glu, H., Tümen, I., Yazici, H., Arfan, M., Ali, M., Holmbom, B. Extractives of Turkish and Pakistani Tree Species. *Holzforschung*. 2007, 65, 215-221.

Wojtowicz, P., Janečková, H., Friedecký, D., Adam, T. Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chemické Listy*. 2013, 107, 3-11.

Yamamoto, S., Otto, A., Simoneit, B.R.T. Lignans in resin of *Araucaria angustifolia* by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, 39, 1337-1347.

Zhang, Z.-L., Zhou, M.-L., Tang, Y., Li, F.-L., Tang, Y.-X., Shao, J.-R., Xue, W.-T., Wu, Y.-M. Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food Research International*. 2012, 49, 389–395.

Zhao, Y.-X., Li, C.-S., Luo, X.-D., Liu, Y.-Q., Zhuo, J. A new sesquilignan from *Tsuga dumosa*. *Acta Botanica Yunnanica*. 2005, 27, 217-222.

Zule, J., Kozjan, G. Polyphenols in different larch (*Larix* spp.) species. In: *Zbornik Gozdarstva in Lesarstva*, 2008, 86, pp. 51-58.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcOK	octan draselný
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Syndrom získaného selhání imunity
ANSEC	anhydrosekoisolariciresinol
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosferického tlaku
ARC	arctigenin
ASAR	asarinin
ASE	accelerated solvent extraction – zrychlená extrakce rozpouštědlem
AV ČR	Akademie věd České Republiky
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid
CARD	carthamosid
CART	carthamogenin
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
CEAD	coulometric electrode array detection – coulometrická detekce
CI	chemical ionization – chemická ionizace
CLAR	cyklolariciresinol
CONI	α -conidendrin
CUBE	cubebin
D	detected – bylo detekováno
DCM	dichlometan
DCUBE	deoxycubebin
dOMR	derivát oxo-matairesinolu
DMR	didemethylovaný matairesinol
DMSO	dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
ED	enterodiol
EI	electron ionization - elektronová ionizace
EL	enterolakton
ER	estrogenní receptor
ESI	electrospray ionization – ionizace elektrosprejem
GC	gas chromatography – plynová chromatografie
GC-FID	gas chromatography flame ionization detector – plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem

GC-MS	gas chromatography mass spectrometry – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GGE	guajacylglyceryl ether
HCUBE	dihydroxycubebin
HEL	hydroxyenterolakton
HIN	hinokinin
HIV	Human Immunodeficiency Virus – virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMR	hydroxymatairesinol
HPLC	high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iso-HMR	iso-hydroxymatairesinol
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LAR	lariciresinol
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LIO	liovil
LOD	limit of detection – mez detekce
LOQ	limit of quantitation – mez stanovitelnosti
MASE	microwave assisted solvent extraction – extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem
MED	medioresinol
MR	matairesinol
MR-d ₆	deuterovaný matairesinol
MS	mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie; hmotnostní spektra
MTBE	methyl <i>terc.</i> butyl ether
ND	not detected – nebylo detekováno
NDGA	nordihydroguajaretová kyselina
NMR	nuclear magnetic resonance – nukleární magnetická resonance
NOE	nuclear Overhauser effect – nukleární Overhauserův jev
NOE-diff	nuclear Overhauser effect difference spectroscopy
NOESY	nuclear Overhauser enhanced spectroscopy
OEL	7-oxo-enterolakton
OHEL	7-hydroxyenterolakton
OHSEC	7-hydroxy-sekoisolariciresinol
OMR	7-oxo-matairesinol
PHYLN	phylligenin

PDA	photodiode array detector – detektor diodového pole
PIN	pinoresinol
PODO	podophyllotoxin
RRT	relativní retenční čas
SDG	sekoisolariciresinol diglukosid
SEC	sekoisolariciresinol
SEC-d ₆	deuterovaný sekoisolariciresinol
SES	sesamin
SYR	syringaresinol
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography – chromatografie na tenké vrstvě
TMCS	trimethyl-chlorosilan
TMP	thermo-mechanical pulping - termo-mechanické zpracování dřeva
TMS	trimethylsilyl (deriváty lignanů)
TODA	todolaktol A
TRACH	trachelogenin
TRAD	trachelosid
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky
UV/VIS	ultraviolet-visible spectroscopy – spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
VÚPP	Výzkumný ústav potravinářský Praha
WIK	wikstromol
YAT	yatein
YATD	yatein diol
YATD2	dihydro-dideutero yatein
46T	lignan 46T (z <i>Libocedrus yateensis</i>)

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Publikace

Smeds, A.I., **Češková, I.**, Eklund, C.P., Willför, S.M. Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. *Holzforschung*. 2012, 66, 553-567.

Váchalová, R., **Marešová, I.**, Kolář, L., Tříška, J., Váchal, J. Lignocellulosic biorefinery for waste-free manufacturing of lignans and sugars for production of ethanol and growing medium. *Wood Research*. 2014, 59 (3) – v tisku.

Marešová, I., Tříška, J., Moos, M., Pexová-Kalinová, J., Vrchotová, N. Distribution study of lignans in different varieties of buckwheat and millet. *Food Chemistry* – v přípravě.

Užitný vzor

Balík, J. Híc, P., Sural, I., Tománková, E., Houška, M., Strohalm, J., Tříška, J., Vrchotová, N., Moos, M., **Marešová, I.** Mošt, víno nebo nápoj na bázi vína se zvýšeným obsahem přírodních lignanů, (patentový zástupce Ing. Jaroslav Novotný), PUV 2014-29312, podáno 6. 3. 2014.

Patent

Balík, J. Híc, P., Sural, I., Tománková, E., Houška, M., Strohalm, J., Tříška, J., Vrchotová, N., Moos, M., **Marešová, I.** Mošt, víno nebo nápoj na bázi vína se zvýšeným obsahem přírodních lignanů a způsob jejich výroby, (patentový zástupce Ing. Jaroslav Novotný), PV 2014-134, podáno 6. 3. 2014.

Článek ve sborníku

Tříška, J., Moos, M., **Marešová, I.**, Vrchotová, N. Occurrence of Lignans in Environmental Waters. In: *CECE 2012 – 9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Institute of Analytical Chemistry AS CR, v.v.i, 2012, pp. 307-310. ISBN 978-80-904959-1-3.

Marešová, I., Tříška, J., Moos, M., Vrchotová, N., Jirotková, D. Identification and quantification of lignans in wine by-products: in marc and grape seeds using LC-MS. In: *Book of Abstracts HPLC2013 Amsterdam - 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*. Amsterdam: Netherlands, 2013, p. 872.

Marešová, I., Moos, M., Pexová-Kalinová, J., Vrchotová, N., Tříška, J. Lignans profile in whole grain and in bran of different millet varieties using LC-MS. In: *Workshop on Holistic Analytical Technologies for Biomedical Food and Plant Sciences*. Athens: Greece, Bioanalysis Network, Aristotle University of Thessaloniki, AGROCOS Project University of Athens, 2012.

Češková, I., Jílek, R., Vrchotová, N., Tříška, J. UPLC-MS method for analysis of lignans in Norway spruce knotwood extract. In: *International Nutrition & Diagnostics Conference*. Brno: Univerzita Pardubice, 2011, p. 100, ISBN 978-80-7395-378-2.

Češková, I., Jílek, R., Vrchotová, N., Tříška, J. Identification of lignans in Norway spruce knotwood extract using liquid chromatography-mass spectrometry. In: *Trends in natural Products Research: Abstracts of the Phytochemical Society of Europe*. Kolymvari: Phytochemical Society of Europe, 2011, pp. 118-119, ISBN 978-0-9565472-2-4.

Smeds, A.I., **Češková, I.**, Eklund, P.C., Willför, S.M. Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. In: *Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine*. Book of Abstracts and Abbreviated Papers, Russia, 2011.