

**Západočeská universita v Plzni**

Fakulta pedagogická

**Bakalářská práce**

**Ozonolýza derivátů kyseliny betulinové**

**Lukáš Vála**

**Plzeň 2015**

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
Fakulta pedagogická  
Akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Lukáš VÁLA  
Osobní číslo: P12B0347P  
Studijní program: B1001 Přírodovědná studia  
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání  
Název tématu: Ozonolýza derivátů kyseliny betulinové  
Žadávající katedra: Katedra chemie

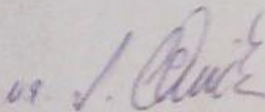
### Zásady pro vypracování:

1. Seznámit se s výskytem, vlastnostmi a možnostmi získávání kyseliny betulinové.
2. Seznámit se se základními operacemi semimikrotechniky včetně chromatografických metod.
3. Izolovat kyselinu betulinovou z platanové kůry.
4. Připravit jednoduché deriváty kyseliny betulinové a provést jejich identifikaci.
5. Seznámit se s konstrukcí ozonizátoru, případně optimalizovat podmínky jeho provozu.
6. Provést ozonolýzu vytypovaného derivátu kyseliny betulinové.

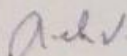
Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:

Vašmucius V.: Přehled reakcí triterpenoidních sloučenin. Diplomová práce, PF, Plzeň 1995.  
Collect. Czech. Chem. Commun. (posledních 20 ročníků)  
Kvíčala J.: Laboratorní technika organické chemie. VŠCHT, Praha 1998.  
Richtř V.: Semimikrotechnika v organické chemii. Pedagogická fakulta ZČU v Plzni, 1993.

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Mgr. Václav Richtř, CSc.  
Katedra chemie  
Datum zadání bakalářské práce: 4. prosince 2014  
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. června 2015

  
Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.  
děkanka



  
Doc. Mgr. Václav Richtř, CSc.  
vedoucí katedry

V Plzni dne 4. prosince 2014

Prohlašuji, že jsem práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

*Ve Starém Plzenci, 29.6.2015*

.....

### Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval Doc. Mgr. Václavu Richtrovi Csc. za jeho odborné vedení, trpělivost a ochotu, které mi poskytoval při práci v laboratoři a při psaní této práce.

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část .....	2
2.1 Kyselina betulínová.....	2
2.1.1 Výskyt.....	2
2.1.2 Vlastnosti kyseliny betulínové.....	2
2.1.3 Mechanismus působení kyseliny betulínové.....	3
2.1.4 Výzkum kyseliny betulínové .....	5
2.1.5 Účinky kyseliny betulínové .....	6
2.2 Vybrané reakce kyseliny betulínové .....	7
2.3 Použité laboratorní metody .....	8
2.3.1 Destilace.....	8
2.3.2 Extrakce .....	9
2.3.3 Chromatografie .....	11
2.3.3.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	11
2.4 Laboratorní ozonizátor .....	13
2.4.1 Zdroj vysokého napětí.....	13
2.4.2 Ozonizační trubice .....	13
2.4.3 Průtokoměry.....	14
2.4.4 Princip testování ozonizátoru.....	16
2.4.5 Princip ozonolýzy .....	17
3. Praktická část .....	19
3.1 Provedení analytické TLC a její detekce .....	19
3.2 Izolace kyseliny betulínové.....	19
3.2.1 Extrakce kyseliny betulínové.....	19
3.3 Acetylace kyseliny betulínové .....	22
3.4 Optimalizace ozonizátoru .....	23
3.4.1 Kalibrace padáčkového průtokoměru .....	23
3.4.2 Měření produkce ozonu .....	24

3.4.3 Nastavení optimální frekvence.....	27
3.4.4 Měření optimální střídy.....	27
3.5 Ozonizace acetylované kyseliny betulinové .....	30
4. Závěr .....	33
5 Seznam použité literatury : .....	34
6. Resumé.....	35

## 1. Úvod

Kyselina betulinová je velice zajímavá látka, která se v poslední době dostala do popředí zájmu mnoha studií zabývajících se léčbou viru HIV a protinádorových onemocnění. Jedná se o dostupnou přírodní látku odvozenou od lupanu. Spolu s ní je také studována široká škála jejích derivátů, pro svou vyšší stabilitu a další vlastnost. Vzhledem k faktu, že zájem o vlastnosti a využití kyseliny betulinové stále nepolevuje, bylo by dobré jí izolovat, získat v pokud možno nejčistší podobě a pokusit o získání jejích derivátů.

Protože řada derivátů organických sloučenin je dobře dostupná přeměnou karbonylových sloučenin, nabízí se kromě jiného využít přítomnost dvojně vazby isopropenylové skupiny. Tato skupina je součástí řady dalších triterpenů, např. betulinu, který po acetylaci poskytuje betulindiacetát. Tato sloučenina ozonolýzou poskytuje norketon. Nabízí se tedy možnost obdobných přeměn kyseliny betulinové. S těmito přeměnami souvisí i testování a následné využití ozonizátoru.

Jelikož pro jednotlivé přeměny postačí malé množství sloučenin, je součástí práce i semimikrotechnika.

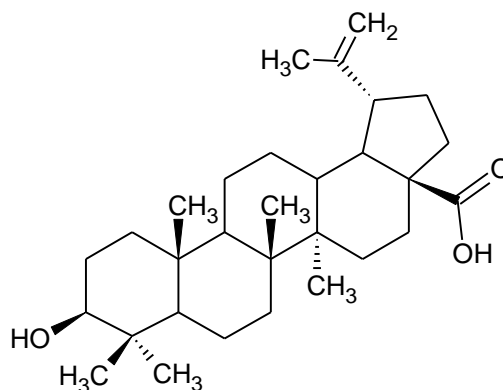


## 2. Teoretická část

### 2.1 Kyselina betulinová

#### 2.1.1 Výskyt

Kyselina betulinová (Obr.1) systematickým názvem kyselina 3 $\beta$ -hydroxolup-20(29)-en-28-ová je členem v přírodě čteně se vyskytujících pentacyklickýchtriterpenů. V přírodě ji můžeme nalézt například v kůře Břízy bělokoré ( *Betulapubesces* ), v rostlině Konitrodu lékařském ( *Gratiolaofficinalis* ), Jujubě čínské ( *Ziziphusmauritania* ), Černohlávku obecném ( *Prunellavulgaris* ), tropické masožravé rostliny *Triphyophyllumpeltatum* a *Ancistrocladusheyneanus*. Dále také v rostlinách *Tetraceraboiviniana*, *Jambul* ( *Syzygiumformosanum* ), v *Rozmarýnu* lékařském ( *Rosmarinusofficinalis* ), v *Platanu* javorolistém ( *Platanushispanica* ) nebo v rostlině *Koniklec* obecný ( *Pulsatillachinensis* ). Pro tuto práci byl zvolen jako zdroj kyseliny betulinové *Platan javorolistý*, z jehož kůry byl získán extrakt.<sup>1</sup>



Obr. 1 - kyselina betulinová

#### 2.1.2 Vlastnosti kyseliny betulinové

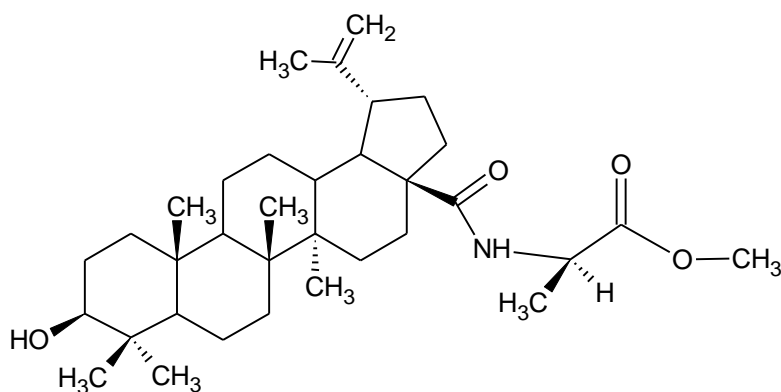
Kyselina betulinová je bílá krystalická látka s teplotou tání 295-298 °C. (2)

Vzhledem k mutacím viru HIV v reakci na většinu chemoterapeutik, existuje neustálá potřeba vyvíjet nové sloučeniny proti tomuto viru a to s ohledem na náklady a minimální toxicitu. Největší překážkou vývoje anti-HIV potenciálu kyseliny betulinové je její velmi špatná rozpustnost ve vodných roztocích a také v menší míře i některých běžných organických rozpouštědlech. Příklady jsou v tabulce 1.<sup>3,4</sup>

Tabulka 1 – **Rozpustnost kyseliny betulinové**(převzato z literatury 3)

rozpouštědlo	teplota	rozpustnost
voda	22°C	0,02µg/ml
ethanol	25°C	1% (w/V)
DMSO23	25°C	5% (w/V)

Z důvodů popsaných výše se zkoumají další deriváty kyseliny betulinové, které by mohly mít lepší rozpustnost. Zatím jsou zkoumány iontové deriváty kyseliny betulinové. Zajímavé postavení mezi deriváty má kyselinabetulinová spolu s aminokyselinami v poloze karboxylové kyseliny C-28. Bylo dokázáno, že tyto deriváty vykazují zlepšenou rozpustnost ve vodě a toxicitu proti lidskému melanomu (MEL-2) buněk linie 26. V uvedené literatuře nejprve připravují z glycynyl konjugát kyseliny betulinové(obr.2) pro následnou úpravu, protože tato forma ukázala nejvyšší rozpustnost ve vodě a cytotoxicitu pro rakovinné buňky mezi aminokyselinovými deriváty kyseliny betulinové.<sup>3,4</sup>



Obr. 2 – **glycynyl konjugát kyseliny betulinové**

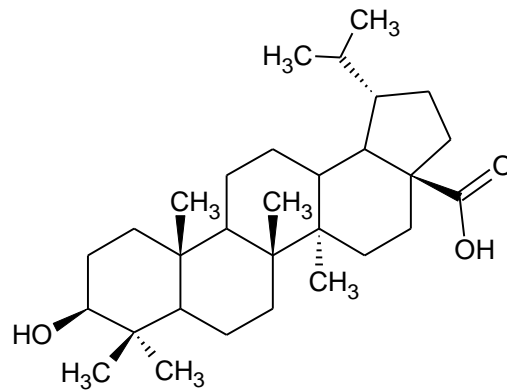
### 2.1.3 Mechanismus působení kyseliny betulinové

V posledních letech je mnoho studií zaměřeno na objasnění molekulárních mechanismů protinádorových účinků zprostředkovaných kyselinou betulinovou. Jedním z charakteristických rysů cytotoxicity kyseliny betulinové je schopnost vyvolat mitochondriální cestou apoptózu v rakovinových buňkách.<sup>3</sup>

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která na rozdíl od nekrózy vede k šetrnému odstranění zbytků buňky a nikoli k zánětu. Při apoptóze se významně uplatňují kaspázy (cysteinproteázy), mitochondrie a uvolňování cytochromu c (elektronový přenašeč buněčného dýchání přítomný v mitochondriích).<sup>3,5</sup>

Cesta vedoucí k apoptóze může být zahájena na úrovni mitochondrií uvolněním apoptogenetických faktorů jako je cytochrom c a další z mitochondriálního prostoru do cytosolu. Mitochondriální (vnitřní) cesta vedoucí k apoptóze je spuštěna působením chemoterapeutických činidel nebo radioterapií v důsledku poškozené DNA nebo buněčné odpovědi na stres. Nejdůležitějším prvním krokem k aktivaci mitochondriální membrány. V průběhu tohoto procesu jsou jak vnější, tak i vnitřní mitochondriální membrány permeabilizovány, což v důsledku vede právě k uvolňování rozpustných proteinů z mitochondriálního meziprostoru do cytosolu. Existuje velký seznam faktorů, které příznivě i nepříznivě ovlivňují permeabilizaci. Kyselina betulinová je jedním z účinných cytotoxických látek, právě pro svou schopnost indukovat permeabilitu na membránách a to prostřednictvím hlášených přímých mitochondriálních poruch. Po přidání kyseliny betulinové do izolovaných mitochondrií v bezbuněčných systémech bylo prokázáno, že kyselina betulinová inhibuje celou řadu antiapoptických proteinů. Porucha mitochondriální funkce, vyvolaná kyselinou betulinovou, představuje ústřední koordinační událost, která vede k indukované apoptóze a fragmentaci DNA. Problémem přechodu cytochromu c, je štěpení kapsáz 3 a nikoli kapsáz 8. Kyselina betulinová je v tomto ohledu popisována jako zprostředkovatel přechodu cytochromu c, který aktivuje kapsázy 3 (které se účastní poslední fáze apoptózy) a také jako aktivuje kapsázu 8 při pozdější indukci. Dalšími studiemi bylo zjištěno, že tvorba kyslíkových radikálů, zde popsáných jako „generace reaktivních forem kyslíku (reaktive oxygen species – ROS)“ se také podílí na oné propustnosti mitochondriálních membrán. Naznačuje to tedy, že i ROS jsou zapojeny do kontrolované buněčné smrti.<sup>3</sup>

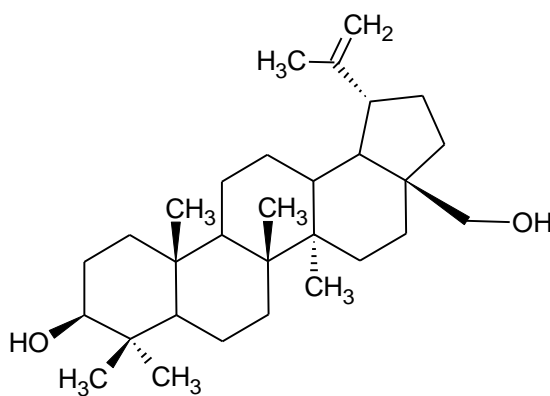
Další studie popisuje jiné tři mechanismy, podle nichž postupuje kyselina betulinová spolu se svými deriváty (dihydrobetulinová kyselina (obr.3), 3-alkylamido-3-deoxybetulinová kyselina a 3-O-(3',3'-dimethylsukcinyl) betulinová kyselina. První mechanismus zahrnuje inhibici a zranění viru HIV, což v konečném důsledku díky kapsáze 2 způsobuje odkládání tvorby virových jader a tím minimalizuje tvorbu infekce HIV. Druhý mechanismus je velice složitý, je dominantou hlavně dusíkatých derivátů kyseliny betulinové a je podrobně popsán v literatuře<sup>3</sup>. Třetí mechanismus anti-HIV aktivity pentacyklických triterpenů je založen na inhibiční aktivitě proti HIV-1 reverzní transkripci. Vzhledem k tomu je zapotřebí reverzní transkriptázy pro včasnou provirovou DNA syntézu a inhibice reverzní transkriptázy katalyzované polymerace DNA z virové RNA inhibující virovou replikaci. Reverzní transkriptázy mohou být specifické pro každý virus a jsou považovány za životaschopné chemoterapeutické cíle.<sup>4</sup>



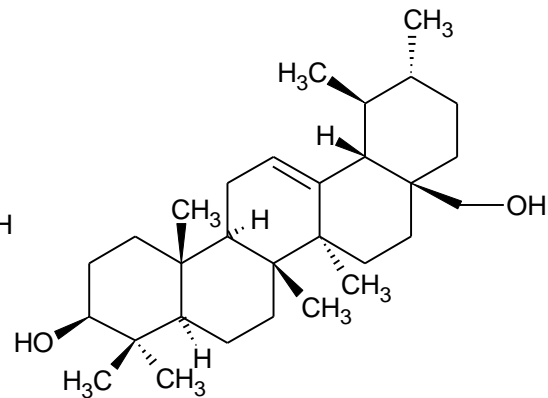
Obr.3 – kyselina dihydrobetulinová

#### 2.1.4 Výzkum kyseliny betulinové

První zmínka související s kyselinou betulinovou její zkoumanou cytotoxicitou nalezneme v publikaci z roku 1976 ( Trumbull a spol.)<sup>1</sup>, kde je popisována cytotoxikologická aktivita chloroformového extraktu z rostliny *Vanqueliniecorymbosa* vůči lymfocytární leukemické linii. V té době byla kyselina betulinová extrahována společně s dalšími triterpenoidy a to uvaolem (obr.4) a ursolovou kyselinou. Na počátku zkoumání protinádorové aktivity kyseliny betulinové se jednalo o její směsi extrahované společně s dalšími látkami například betulinem (obr.3).<sup>6</sup>



Obr.3 betulin



Obr.4 - uvaol

První zmínka o cytotoxicitě kyseliny betulinové jako takové se objevuje až na počátku 90. let minulého století v práci, ve které se mimo jiné zkoumala kyselina betulinová jako inhibitor tvorby nádoru kůže myši ve druhém stupni karcinogeneze. Roku 1995 byl popsán už i cytotoxický účinek kyseliny betulinové na

buněčné linie lidského melanomu a právě touto prací odstartoval širší zájem o kyselinu betulinovou a její deriváty.<sup>6</sup>

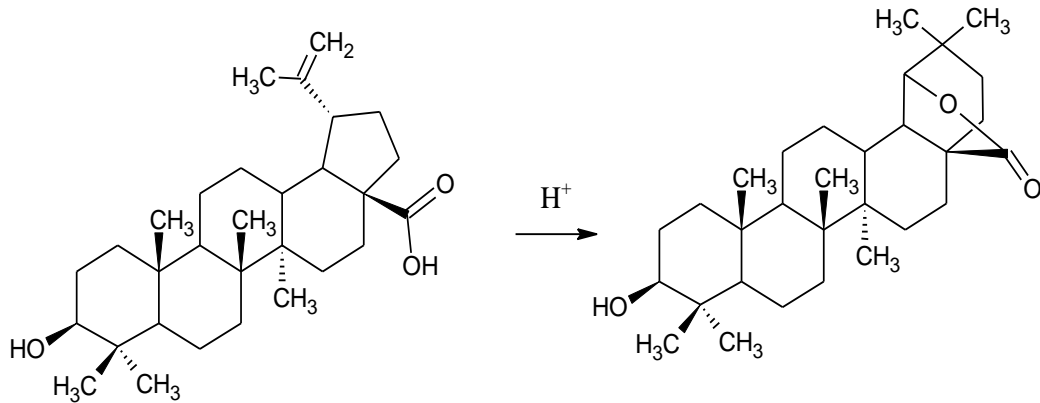
### 2.1.5 Účinky kyseliny betulinové

Účinky kyseliny betulinové, počínaje výše uvedenou prací, jsou zkoumány zpočátku v závislosti na její dávkování a zároveň ději DNA s indukcí apoptózy. V průběhu dalších prací vykazují testy pozitivní efekt také na linie neuroblastomu, ovariálního karcinomu, karcinomu děložního krčku nebo linie malobuněčného plicního karcinomu a dalších. Mimo jiné se také zkoumá účinek kyseliny betulinové na nenádorové lidské buňky. Výrazným kladem v tomto ohledu je fakt, že toxicita pro tyto buňky je výrazně nižší. Další deriváty kyseliny betulinové lze také připravit nikoliv chemickou cestou, ale i biotransformací za pomoci bakterií. Právě příprava touto cestou nám pomáhá porozumět metabolizaci kyseliny betulinové i jejich derivátů v organismu savců. Nejnovější studie poukazují na mechanismus aktivace apoptózy kyselinou betulinovou, který je umožněn uvolněním permeability membrány mitochondrií a následnými procesy. Pojednává se zde také o důležitosti tvorby kyslíkových radikálů v tvorbě apoptózy díky kyselině betulinové. Dalšími zajímavými skutečnostmi o vlastnostech kyseliny betulinové je například vyšší účinnost v prostředí s nižší pH < 6,8 nebo schopnost měnit koncentraci vápenatých iontů, která je nezanedbatelným signálem apoptózy.<sup>6</sup>

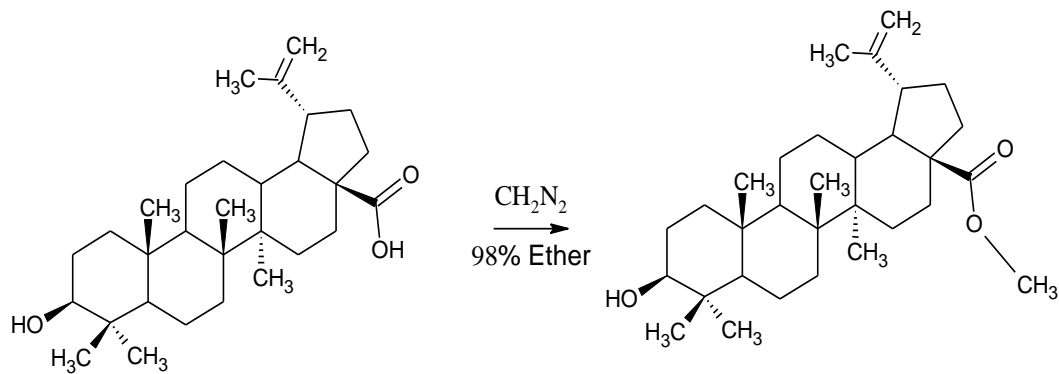
Kyselina betulinová byla testována i při různých modelech rezistence na léky, např.: primární dětskou akutní leukémií, která je odolná vůči standardním chemoterapeutickým činidlům. Dále se podílí společně s dalšími cytotoxickými podněty (chemoterapeutika, ionizující záření) na potlačování nádorového růstu. Tato skutečnost poukazuje na možnost používání kyseliny betulinové jako senzibilátoru pro zvýšení účinnosti protinádorové terapie. Také je kyselina betulinová pro své antikarcinoganní vlastnosti zařazena do skupiny látek, které by mohly být využity i v prevenci proti rakovině. Před deseti lety za tímto účelem bylo prokázáno, že kyselina betulinová je schopna inhibovat tvorbu nádorů u myši (karcinogeneze kůže). V současné době jsou data o účincích předešlé studie kys. betulinové vyhodnocována jako topické činidlo ve fázi I/II klinické studie pro léčbu dysplastických mateřských znamének s potenciálem se transformovat v melanom.<sup>3</sup>

## 2.2 Vybrané reakce kyseliny betulinové

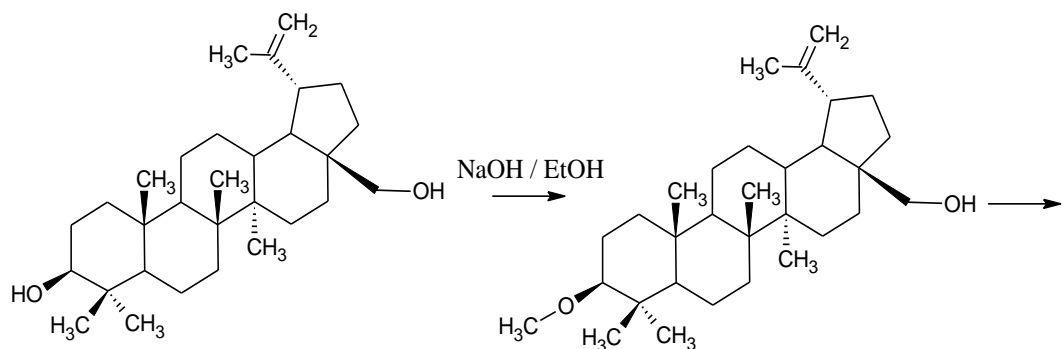
- Kyselina betulinová je v kyselém prostředí velmi nestálá a přesmykuje se na 28-oxoallobetulin<sup>6</sup>

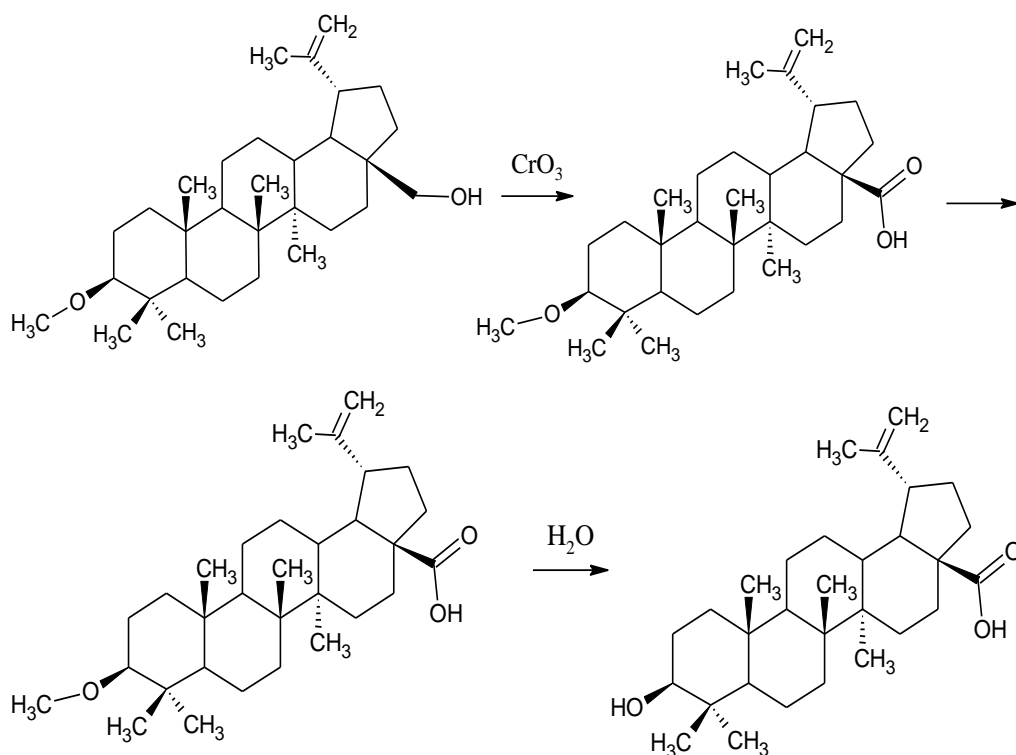


- Vytvoření chráněné skupiny COOH<sup>7</sup>

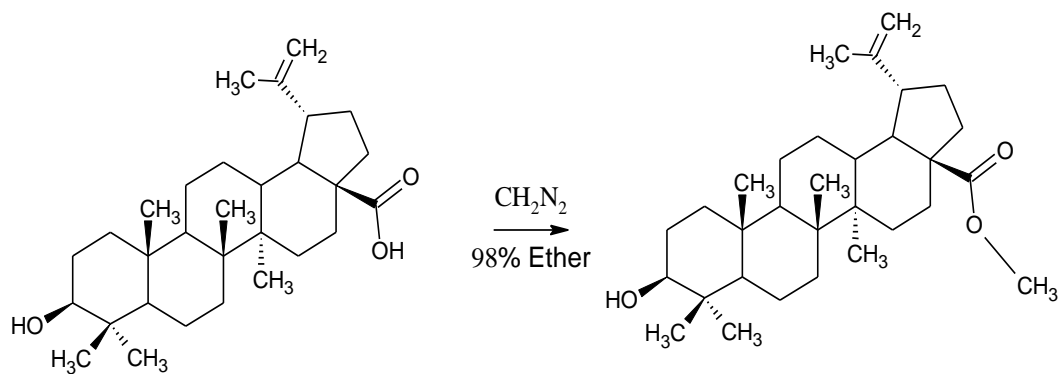


- Připravit kyselinu betulinovou lze i z betulinu pomocí oxidu chromového<sup>6</sup>





- Vytvoření chráněné skupiny  $\text{COOH}$ <sup>7</sup>



## 2.3 Použité laboratorní metody

Stejně jako je tomu při získávání a transformaci jiných přírodních sloučenin i při získávání a přeměnách kyseliny betulinové je třeba zvládat principy a metodiku základních laboratorních postupů jak je uvedeno dále.

### 2.3.1 Destilace

Destilace je proces, při kterém oddělujeme kapalnou nebo zkapalněnou směs zahřátím a následným převedením na páry, které se odvádějí na vhodné místo, kde opět

zkondenzují. Rozlišujeme několik druhů destilací, které se liší sestavou aparatury nebo použitím :

- Prostá destilace – k oddělení kapalinové části směsi od tuhé netěkavé příměsi nebo na oddělení tekutých složek o rozdílných teplotách varu s rozdílem mezi 150-200°C.
- Frakční destilace – pro oddělení dvou nebo více kapalných složek, které mají teploty varu blíže u sebe než v předchozím případě. Obvykle se jedná o kapaliny s rozdílem teplot varu  $> 10^{\circ}\text{C}$ .
- Destilace vodní parou – je příkladem azeotropní destilace, kde je azeotropní složkou voda

Destilace za sníženého tlaku a mnohé další destilace s různými parametry uvedené v literatuře.<sup>9</sup>

Dalšími příklady destilace, které jsou zařízeny na stejných principech, ale s jinou aparaturou. Tato aparatura bývá často přizpůsobována množství destilované kapaliny. V podstatě se jedná o shodné postupy přípravy aparatur, ale jednotlivé komponenty jsou nahrazovány alternativními zmenšeninami nebo jinými malými částmi. Změnu komponentů aparatury lze volit takto: Destilační baňku lze nahradit lékovkou, varný kamínek zatavenou kapilárou, pro odsátí přebytečného rozpouštědla použijeme skleněný balonek ( vyfouknutý ze zatavené skleněné trubičky ), na jehož konec můžeme přidat vatičku, aby se kapilára balonku nezanášela a neucpávala malými krystaly.<sup>10</sup>

### 2.3.2 Extrakce

Pevné i kapalně látky můžeme extrahovat dvěma způsoby: Kontinuální extrakcí (nepřerušovaně) nebo diskontinuální extrakcí (přerušovaně) a lze provádět jak za tepla, tak i za studena. Objevuje se zde i několik faktorů, které ovlivňují účinnost extrakce: Rychlost přechodu z pevné látky do kapaliny a rozpustnost látky v rozpouštědle. Je zde také několik zásad, které umožní, aby se s extraktem dále dobře pracovalo. Vlivem rozpouštědla se extrahovaná látka nesmí měnit a také je vhodné zvolit rozpouštědlo tak, aby bylo možné jej z extraktu odstranit. Některé druhy extrakcí:

- Macerace – extrahuje se pevná látka opětovným přidáváním rozpouštědla
- Digesce – stejný postup jako u macerace, ale prováděno za tepla

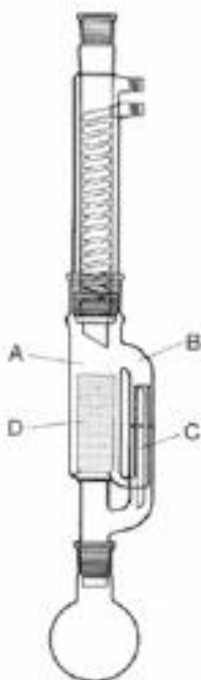


- Perforace – extrakce kapalin probíhající kontinuálně s jinými nemísitelnými rozpouštědly
- Perkolace – zvláštní způsob macerace, tuhá látka je rozpouštědlem extrahována protiproudě

Pro potřeby perkolace je zapotřebí docílit styku rozpouštědla s látkou a to v dlouhém časovém intervalu. Proto se nejčastěji používají tzv. kontinuální extraktory. Jedním z nejznámějších zástupců těchto perforátorů je Soxhleův extraktor (obr.5), který je navržen tak, aby páry rozpouštědla stoupaly boční trubicí do zpětného chladiče, kde zkondenzují a zkapou zpět do patrony. Přepadová trubička pak zajišťuje na principu spojených nádob průtok extraktu zpět do baňky a celý proces se opakuje<sup>9</sup>.

Při použití tohoto extraktoru je nutné vhodně zvolit zdroj tepla. Volbu uzpůsobíme používanému rozpouštědлу<sup>10</sup>.

Obr. 5 – Soxhleův extraktor ( použit lit. 9)



- A – Extraktor
- B – Trubice na vedení páry
- C – Přepadová trubice
- D – Extrakční patrona (filtrační papír nebo frit)

### 2.3.3 Chromatografie

Chromatografie patří k významným separačním technikám nejen v chemických laboratořích. Samotný vznik chromatografie je zásluha ruského botanika Michaila S. Cvěta, který již v roce 1901 zkoumal absorpci barviv. O dva roky později vzniká samostatná chromatografie jako vědní obor. Název chromatografie se skládá ze dvou řeckých slov : chroma – barva a grafó – píši. Přestože z názvu vyplývá, že se chromatografie používá hlavně k identifikacibarevných látek, opak je pravdou.<sup>11</sup>

Využívání chromatografických metod je založeno na dvou fázích : mobilní (pohyblivé), kde je fáze tvořena plynem nebo kapalinou (odtud plynová a kapalinová chromatografie), a stacionární (nepohyblivou), kterou tvoří kapalná nebo pevná látka.<sup>12</sup>

Na dělení chromatografických metod se podílejí mnohá kritéria. Jedním z nich je již zmíněné skupenství mobilní fáze, dalším například uspořádání stacionární fáze (plošná a sloupcová chromatografie) nebo podstata procesu při dělení a to na rozdělovací, adsorpční, iontově výměnnou nebo gelovou. Některé z dalších rozdělení lze nalézt v literatuře<sup>9</sup>.

#### 2.3.3.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

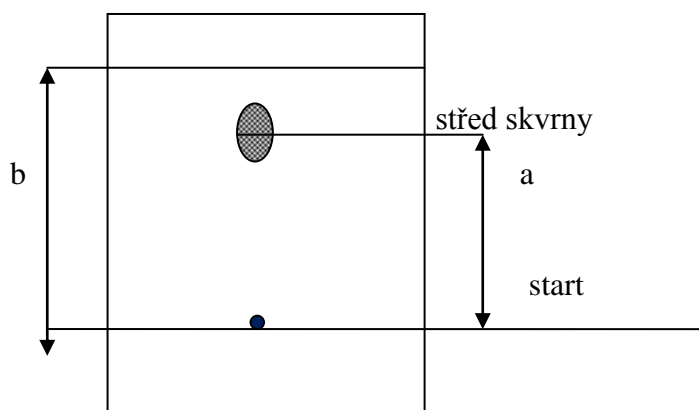
Podstatou tenkovrstvých chromatografií je rozdělování jednotlivých částí směsi a to závisle na jejich interakci se sorbentem, jenž je na pevné podložce nanesen v tenké vrstvě. Je důležité dobře zvolit polaritu rozpouštědla, vhodný sorbent a další parametry uvedené v literatuře<sup>11</sup>.

Hlavním využitím tenkovrstvé chromatografie je sledování průběhu reakcí a také je testem čistoty látky. Rozlišujeme dvě formy stacionární fáze, které můžeme využít při TLC. První z nich je stacionární fáze připravena jako sorbent, který je volně sypaný (jeho vlastnosti vyžadují opatrnější manipulaci a menší náklon při vzlínání rozpouštědla) a druhým je stacionární fáze tvořená fixně za použití některého z pojiv (škrob,sádra). V současnosti se nejčastěji používají fixované tuhé vrstvy, které vynikají dobrou manipulací a dostatečně detekovatelnými výsledky. Další varianty fixovaných tenkých vrstev jsou např.: celulosové, silikagelové nebo vrstvy připravené z oxidu hlinitého. Jednou z dalších nevýhod sypaných vrstev je fakt, že v porovnání s fixovanými vrstvami, mají horší dělicí schopnost.<sup>11</sup>

Při vyhodnocování výsledků, které nám mají pomoci při výběru vhodného rozpouštědla (a nejen tehdy), je důležitý tzv. retardační faktor tvořený poměrem mezi vzdáleností skvrny od startu (a) a vzdáleností vyvzlínané vrstvy rozpouštědla od startu (b). Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která nabývá hodnot v intervalu  $< 0,1 >$ . Pokud je retardační faktor roven 0 je vhodné zvolit více polárnější mobilní fázi a naopak, protože zpravidla polárnější látky jsou zachycovány polárními skupinami nepohyblivé fáze a obráceně, při použití polárnějšího rozpouštědla pro pohyblivou část látky o dané polaritě urazí větší vzdálenost než-li v rozpouštědle s menší polaritou. Dalším důležitým faktorem je rozpustnost látky v pohyblivé fázi. Ta může ovlivňovat jak vzdálenost skvrny od startu, tak i tvar skvrny.<sup>11</sup>

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Vzorec pro výpočet retardačního faktoru<sup>11</sup>



Obr.6: Ukázka chromatogramu

Při chromatografii organických látek můžeme sledovat závislost adsorpce na polaritě rozpouštědla. Příkladem sestupné řady adsorptivity na polárním adsorbentu je tato řada :R-SO<sub>3</sub>H, R-COOH, R-CONH<sub>2</sub>, ROH, R-NH<sub>2</sub>, R-COOCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>-NH-R<sub>2</sub>, R-NO<sub>2</sub>, R-OCH<sub>3</sub>, R-Cl a R-H.<sup>11</sup> Mimo jiné se na adsorpční pevnosti podílí také vliv rozpouštědla, protože na povrch absorbentu se váží i jejich molekuly. Oba druhy molekul se kompetitivně snaží vázat na absorbent, pokud je však molekula rozpouštědla polárnější než chromatografovaná látka, dochází k jejímu vytěsňování z míst adsorpce. Podle míry polaritě jsou rozpouštědla seřazena do tzv. *eluotropické řady*, kde jsou seřazeny sestupně dle relativní permitivity : voda, methanol, ethanol, propan-1-ol,

aceton, ethyl-acetát, diethylether, chloroform, benzen, toluen, chlorid uhličitý, cyklohexan, hexan.<sup>11</sup>

Ne vždy však vlastnosti jednotlivých rozpouštědel vyhovují individuálním potřebám dané chromatografie. Proto se vytvářejí z rozpouštědel směsi látek, které většinou ve výše uvedené řadě spolu sousedí. K méně polárnímu rozpouštědlu přidáváme polárnější. Podíly polárního rozpouštědla pomalu zvyšujeme, nejprve v řádech procent až na konečných 50%ní směs. V některých případech eluotropických řad se můžeme setkat s jejich zkracováním nebo s výměnou některých látek jako je uvedeno v literatuře.<sup>11,12</sup>

## **2.4 Laboratorní ozonizátor**

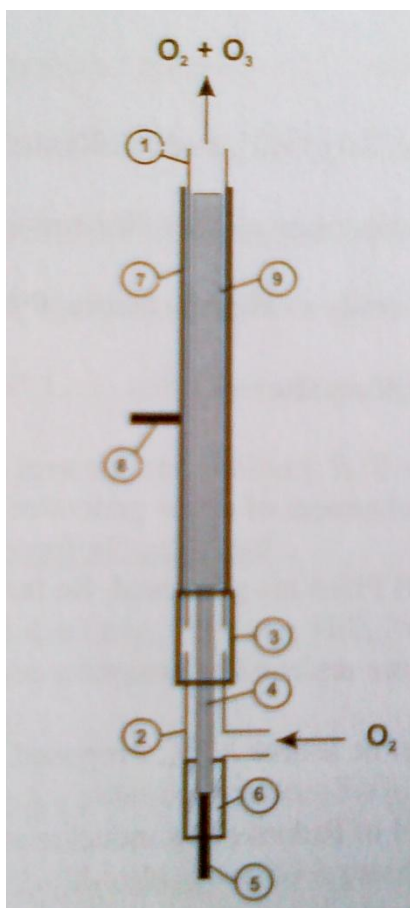
Pro analytické i syntetické účely je využíván ozon získávaný z různých zařízení (ozonizátorů) obvykle pracujících na principu tichého výboje v atmosféře kyslíku. Hlavními součástmi ozonizátorů jsou ozonizační trubice, zdroj vysokého napětí, vhodný průtokoměr a absorpční nádobka.

### **2.4.1 Zdroj vysokého napětí**

Při ozonizacích, které jsou vymezeny laboratorními podmínkami, je možno používat např. Ruhmkorffův induktor napájený autobaterií, případně baterií Ni-Fe článků nebo jiný zdroj vysokého napětí<sup>13,14</sup>.

### **2.4.2 Ozonizační trubice**

Ozonizační trubice je nejdůležitější částí ozonizátoru. Probíhá zde tzv. tichý výboj, který je výsledkem vysokého napětí mezi elektrodami, přičemž jedna elektroda představuje kovovou tyč procházející středem skleněného válce a druhá je na povrchu. V prostoru mezi elektrodami protéká kyslík. Pro potřeby této práce byly zvoleny tyto parametry ozonizační trubice: Samotná trubice představuje skleněnou trubku (Sial) s délkou 50 cm, vnitřním průřezem 4,3 mm, vnějším průměrem 6,3 mm. Další parametry jsou uvedeny na obrázku 6.<sup>14</sup>

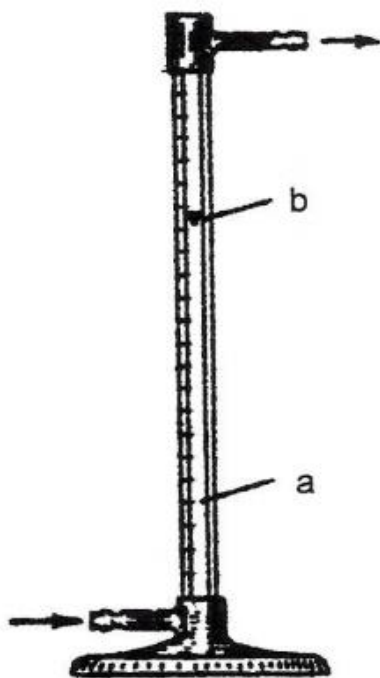


Obr. 6 – **Ozonizační trubice**<sup>14</sup> – **1**- skleněná trubice (Sial), **2** – T-trubice vnějšího průměru 6,5 mm, **3** – polyethylenová spojovací hadička, **4** – masivní spojovací lanko spojené vysokonapěťovým kabelem (**5**), zalitým epoxidovou pryskyřicí (**6**), **7** – několikavrstvý alobalový polep v délce 45 cm s vloženým vysokonapěťovým kabelem (**8**) a krytým izolační páskou, **9** – ocelová tyčovina (hlazenka) průměru 4 mm, délky 44 cm, vlastní vahou dosedající na přívod vysokého napětí.<sup>14</sup>

Pro tuto práci byly takto vytvořené tři trubice zapojeny do série.

### 2.4.3 Průtokoměry

Nezbytnou součástí pro testování ozonizátorů jsou průtokoměry, které měří objem plynu, který za daný okamžik protekl. Pro tuto práci byly k dispozici dva průtokoměry: padáčkový (rotametr), který byl předřadným průtokoměrem (je umístěn před ozonizační trubice) a bublinkový, který je zapojen za absorpční nádobku.<sup>12</sup>



Obr.7 – Padáčekový průtokoměr ( a – stupnice, b – rotametr (padáček) )

Padáčekový průtokoměr je tvořen skleněnou trubicí, do níž je vložen kovový padáček. Na skleněné trubicí je dále umístěna stupnice od 0 do 15 (obr.7). Uvedené jednotky jsou bez rozměrné, a aby měly vypovídající hodnoty, musí se nejdříve průtokoměr nekalibrovat.

Kalibrace probíhá za použití odměrného válce, který je otočený v nádobě s vodou. Plyn je poté přiváděn skrz vodní hladinu do vodou naplněného válce a vytlačuje z něj vodní sloupec. Tehdy lze zaznamenat, jaký objem plynu protéká za určitou časovou jednotku. Postupně se k číslům na rotametu přiřazuje daný průtok. S bublinkovým průtokoměrem (obr.8) se takováto kalibrace provádět nemusí. Průtokoměr je připojen za absorpční nádobku a je tvořen skleněnou trubicí, která je nekalibrovaná jako odměrný válec (v tomto případě 20 ml) a na spodním konci trubice je umístěna odnímatelná gumová nádržka malých rozměrů. Tato nádržka se naplní připraveným saponátem. Jakmile nasazenou nádržku stiskneme, hladina saponátu se dostane do toku plynu, který je přiváděn ze spodu trubice, vytvoří bublinu, která pak je unášena proudem plynu vzhůru stupnicí. Na začátku měření je vhodné smočít vnitřní stěny trubice saponátem, aby bubliny nepraskaly dříve, než se dostanou na konec trubice.

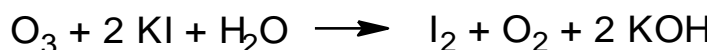


Obr.8 **Bublínkový průtokoměr**

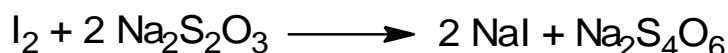
Je určitě nutné dodat, že bublinový průtokoměr není zcela vhodný na velké průtoky a to především vzhledem k tomu, že se zvyšujícím se průtokem, vzrůstá chyba měření času. Chyba měření vzniká hlavně při sledování bubliny při průchodu stupnicí a stopování času člověkem. Vysoké průtoky plynu soustavou narážejí i na další omezení, kterým je absorpční nádobka. Při vyšších průtocích zavádění plynu do nádobky způsobí únik kapaliny do hadiček za absorpční nádobkou.

#### **2.4.4 Princip testování ozonizátoru**

Výkon ozonizátoru je závislý na několika podstatných parametrech. Pro nalezení ideální konfigurace parametrů je zapotřebí testovat produkci ozonu. V tomto případě byl používán roztok jodidu draselného (KI), jehož určitý objem se nalil do absorpční nádobky. Poté se do nádobky zavede zozonizovaný kyslík. Tak se děje po přesně vymezený čas. Následně se vypne zdroj vysokého napětí, ale kyslík se nechává i nadále proudit. Děje se tak, aby všechen zozonizovaný kyslík přešel do roztoku jodidu a zreagoval takto:

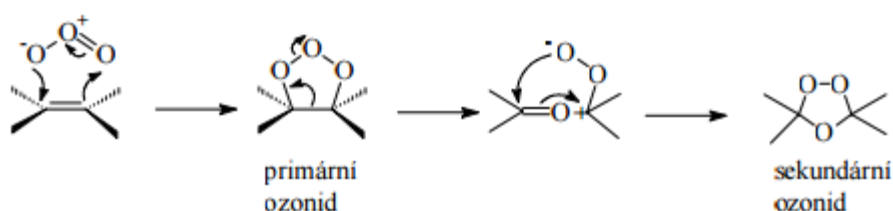


Roztok se kvantitativně převedl do titrační baňky a okyselil koncentrovanou kyselinou sírovou. Titrace se provádí thiosíranem sodným. Jako indikátor byl použit škrobový maz. Titrace probíhá dle reakce<sup>12</sup> :



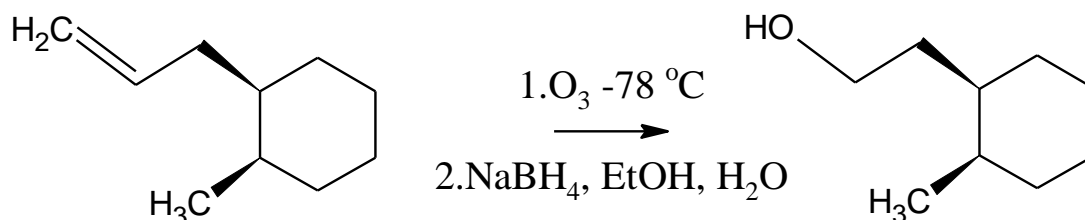
#### 2.4.5 Princip ozonolýzy

Ozonolýza je příkladem důležité chemoselektivní metody, která štěpí dvojně vazby. Reakce lze popsat jako 1-3 dipolárnícykloadici. Primární ozonid se rozpadne na dva komponenty, které dále reagují až na sekundární ozonid.



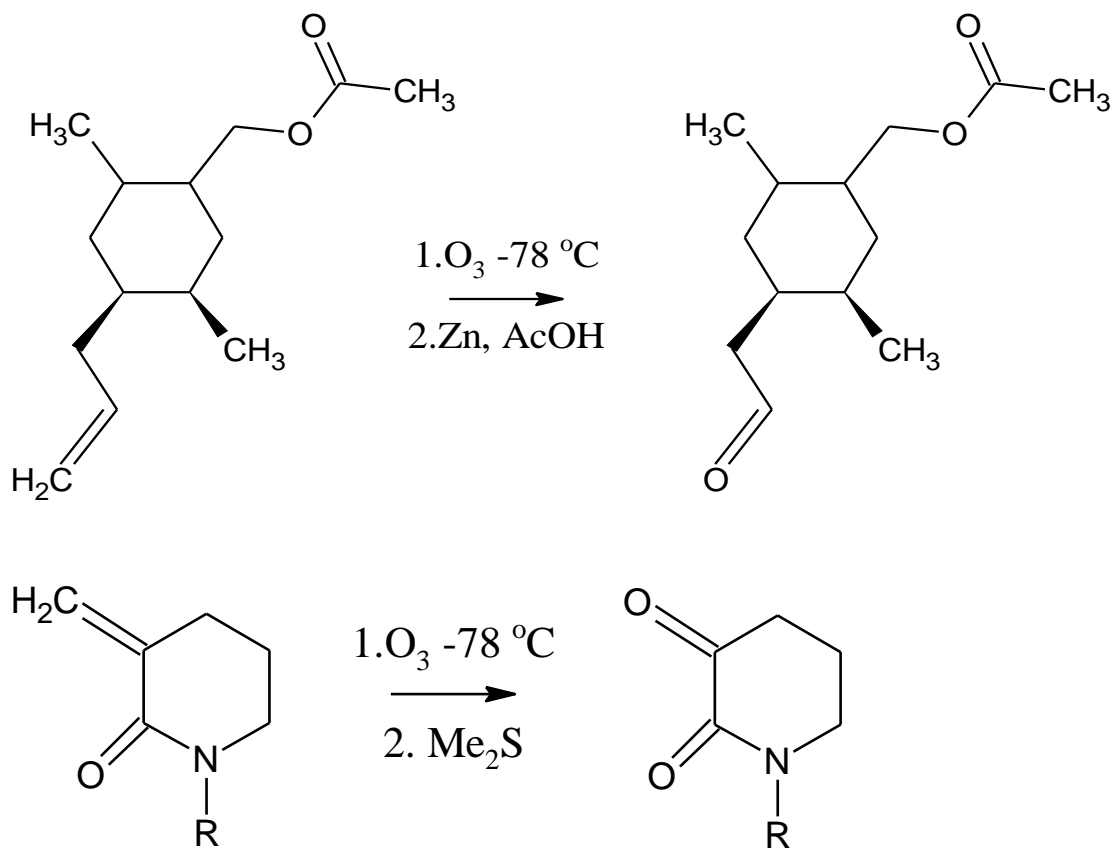
Obr.9 Princip ozonolýzy (převzato z literatury 15)

Reakce probíhá v rozpouštědlech jako jsou například: methanol, dichlormethan, ethylacetát<sup>14</sup> a za nízkých teplot. „Surový produkt má peroxidovou strukturu, je nestálý, výbušný a proto se ihned dále zpracovává štěpením redukčním nebo oxidačním.“<sup>14</sup> Pokud budeme produkt hydrolyzovat uvolní se vedle karboxylové sloučeniny i peroxid vodíku, jenž by mohl dále způsobovat vedlejší přeměny produktů. Pro redukci se používá zinek v kyselině octové, který je dnes nahrazován při redukci dimethylsulfidem nebo trialkyl fosfity. LiAlH<sub>4</sub> a NaBH<sub>4</sub> jakožto silná redukční činidla ozonid redukují na alkoholy. Pokud ozonid vystavíme méně oxidační reakci (např. přebytku peroxidu vodíku) povede reakce na tvorbu karboxylové skupiny.<sup>15</sup>



Obr.10: Ozonolýza s následnou silnou redukcí





Obr.11: Příklady ozonolýzy s různými reakčními podmínkami

### 3. Praktická část

V průběhu práce byly užity, není-li uvedeno jinak, chemikálie v čistotě p.a.. Pod pojmem voda se rozumí voda destilovaná. Při chromatografiích byl užit materiál TLC Silikagel 60 F<sub>254</sub>, dodávaný firmou MERCK. K přípravě ozonu byl použit ozonizátor zkonstruovaný na katedře chemie FPE ZČU v Plzni, popsáný v příspěvku<sup>14</sup>.

#### 3.1 Provedení analytické TLC a její detekce

Na provedení analytické TLC byla použita chromatografická fólie DC-AlufolienKieselgel 60 F<sub>254</sub>. Detekce byla prováděna postřikem 10%ní kyseliny sírové a vypálením na elektrickém vaříči.

Z výše uvedené fólie byl odstřížen velikostně vhodný obdélník. Poté na jeho konci byla kapilárou vyryta startovací čára a také startovací body, do kterých se kapilárou nanáší vzorky. K vzorkům látek, které se umístily ve vhodné vzdálenosti od sebe na sklíčko, se postupně přikapává chloroform. Následně se jednotlivě za pomoci kapilár nanese vzorky rozpuštěné ve chloroformu na startovací body a destička se umístí do chromatografické komory s ethyl-acetátem (fólie musí být v rozpouštědle ponořena tak, aby se startovací čára nacházela nad hladinou). Jakmile rozpouštědlo vyvzlíná pod okraj destičky, vyndáme ji z chromatografické komory za okraj, kde není rozpouštědlo a ihned ji postříkáme 10%ní kyselinou sírovou a poté chromatogram umístíme na elektrický vaříč. Je vhodné, když elektrický vaříč není předem zahřátý, protože nedochází k rychlému zčernání celého chromatogramu. Jakmile se na destičce objeví zuhelnatělé stopy organických látek, destičku sejmeme z vaříče.

#### 3.2 Izolace kyseliny betulinové

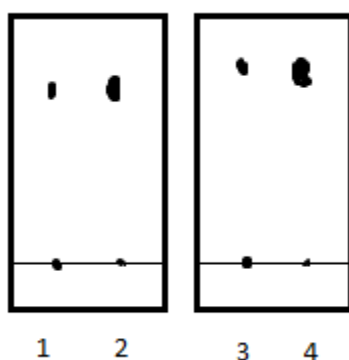
##### 3.2.1 Extrakce kyseliny betulinové

Kůra Platanu javorolistého ( *Platanus hispanica* ) nalezenou v bezprostřední blízkosti tohoto stromu byla nadrcena na malé kousky a ponechána dva týdny vhodně rozložena, aby se vysušila. Takto vysušená kůra byla napěchována do Soxhletova extraktoru o objemu 250 ml a dále byl připojen na 500 ml varnou baňku a tato souprava byla umístěna na topné hnízdo. Extrakce methanolem probíhala 24 hodin. Extrakt se zbarvil do tmavě zelené barvy a byl již částečně zakalen zkrystalizovanou kyselinou

betulinovou. K extrakci bylo použito 61,3 gramů kůry Platanu javorolistého. Extrakcí kůry bylo získáno 117,46 gramů methanolického extraktu kyseliny betulinové.

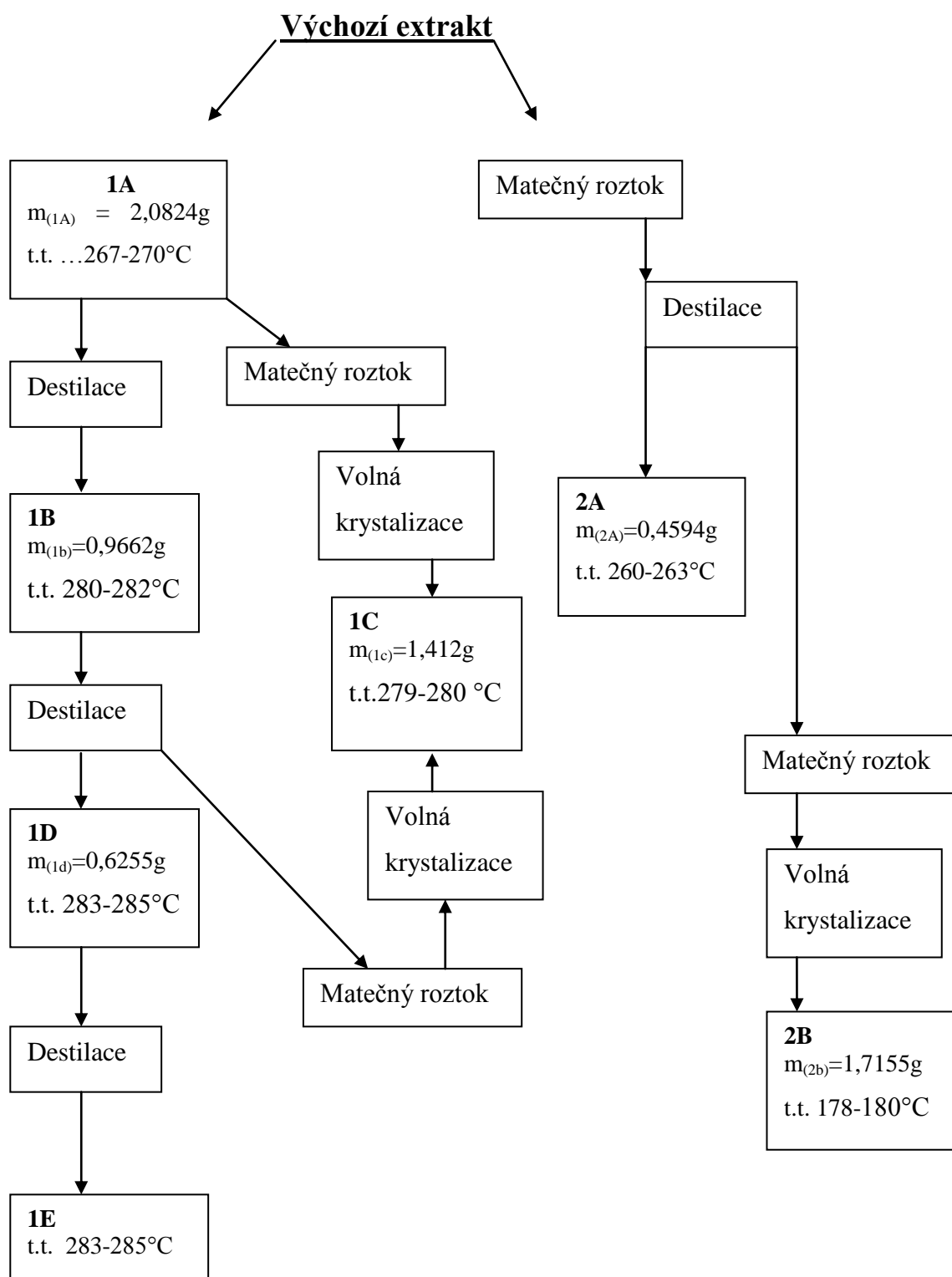
Následně bylo prováděno postupné čištění kyseliny betulinové pomocí rekrytalizace. Z prvotního extraktu bylo oddestilováno částečné množství methanolu a tento podíl krystalů byl zfiltrován (v grafu podíl označen jako 1A). Od zbylého matečného roztoku se dále oddestiloval další podíl methanolu a odfiltrovány další krystaly (2A). Poslední zbylý do hněda zbarvený matečný roztok byl ponechán krystalovat do sucha při teplotě 100 °C (2B). Podíl krystalů 1A byl poté dále čištěn rozpuštěním v methanolu a dalšími třemi krystalizacemi. Oba matečné roztoky z čištění byly poté spojeny a nechány volně krystalovat (1C). Další podíly 1B a 1D jsou produkty čistících krystalizací.

Podíl krystalů označen jako 1E byl připraven rozpuštěním části podílu 1D v lékovce a semimikroskopicky přečištěn tj. místo baňky byla použita lékovka, místo varného kamínku zatavená kapilára a na odsávání byl použit balonek (vyrobení ze skleněné trubičky) a vatička. Všechny hmotnosti jednotlivých podílů krystalů a jejich teploty tání jsou uvedeny na obrázku 13.

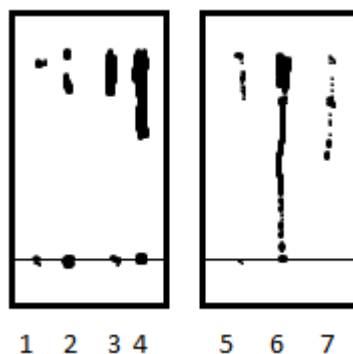


Obr.12 : **Chromatografie podílů** :  
1 – 1B– vyvíjeno v n-hexan ethylacetát 1:1  
2 – 1Ba – vyvíjeno v n-hexan ethylacetát 1:1  
3 – 1B – vyvíjeno v ethylacetátu  
4 – 1Ba – vyvíjeno v ethylacetátu

Všechny následující chromatogramy byly vyvíjeny v ethylacetátu.



Obr.13 -Postup při čištění kyseliny betulinové

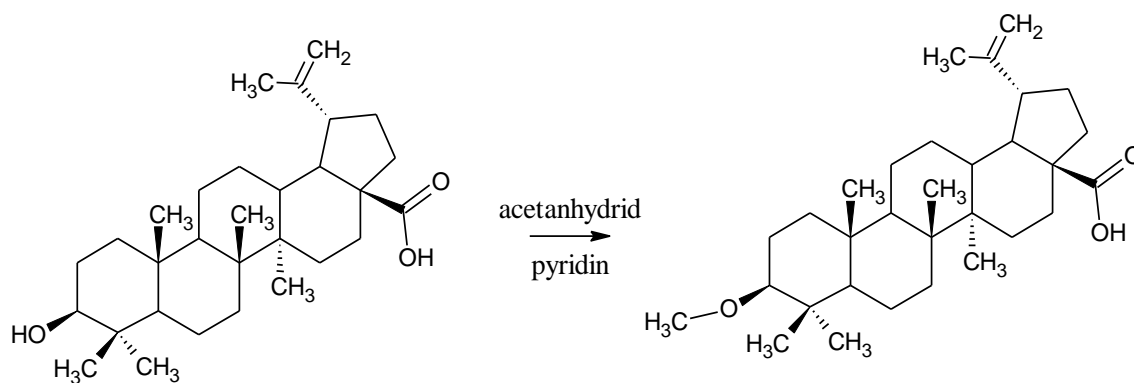


Obr.13: **Chromatografie podílů** :  
 1 – betulin  
 2 – 1A  
 3 – 2A  
 4 – 2B  
 5 – betulin  
 6 – 1C  
 7 – 1D

Při vyvíjení prvních chromatogramů se ukázalo, že kyselina betulínová není snadno rozpustná ve chloroformu. Proto bylo přikročeno k variantě, kdy se kyselina rozpustí v methanolu, a poté se k ní přidá chloroform a zahřeje se. Celá příprava byla prováděna v lékovce pouze na zkoušku, zda bude tato varianta lepší, než klasické rozpouštění pevného krystalu chloroformovou kapkou.

### 3.3 Acetylace kyseliny betulínové

340 mg kyseliny betulínové bylo rozpuštěno v 1 ml pyridinu (bezvodého) a poté k němu byly přidány 2 ml acetanhydridu. Směs byla ponechána 72 hodin při laboratorní teplotě. Po této době mělo být připraveným skleněným balonkem odsáto přebytečné rozpouštědlo, ale nepodařilo se to. Díky manipulaci s kapilárou balonku se roztoku začaly vylučovat další krystaly, proto byl ponechán po dobu dalšího dne ještě krystalovat. Následně byl roztok zfiltrován a ponechán v sušárně při 100 °C.



Obr.14: Reakční schéma acetylace kyseliny betulinové



Obr.15: Chromatogram 1 – podíl 1E  
2 – kyselina 3 - acetylbetulinová

Z chromatogramu na obrázku 15 vyplývá, že acetylace neproběhla v celém objemu. Tato chromatografie byla prováděna před následnou krystalizací roztoku. Na obrázku \_\_\_ v kapitole 3.5 je chromatogram, kde je k porovnání více zreagovaný roztok s ozonidem.

### 3.4 Optimalizace ozonizátoru

#### 3.4.1 Kalibrace padáčkového průtokoměru

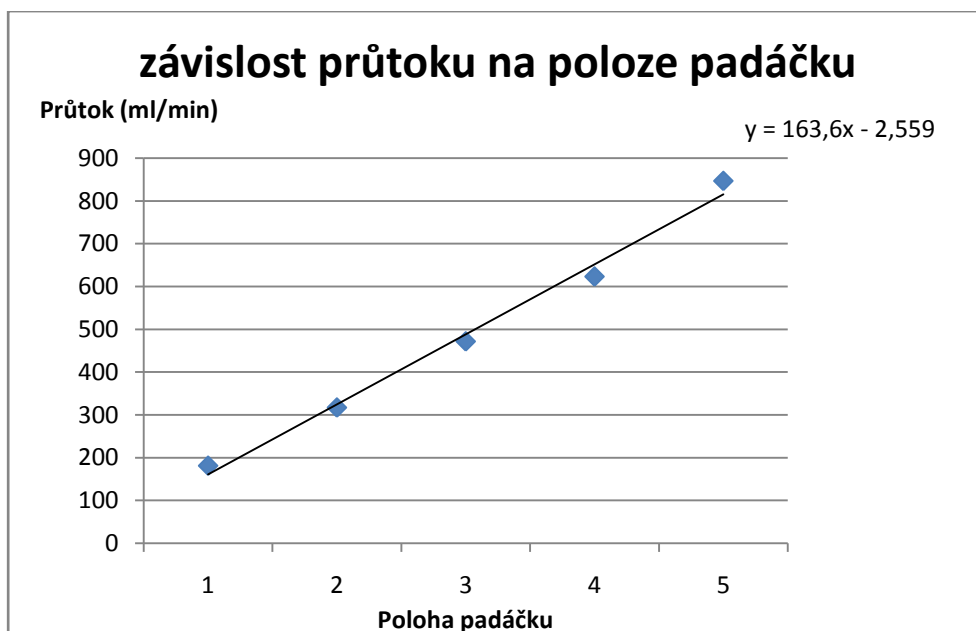
Vzhledem k problému s vyššími průtoky popsaném v teoretické části (kap.:2.3.4) je nutno nakalibrovat padáčkový průtokoměr. Testování probíhalo pro každou z číslic na stupnici právě čtyřikrát. Odměrný válec (500 ml) naplněný vodou se v nádobě (plastové vaničce) otočil dnem vzhůru. Do tohoto systému byl přiveden trubičkou kyslík, který vytlačuje vodu z válce a jelikož je jeho objem stanoven objemem válce je sledován pouze čas, za který vytlačí kyslík vodu až po nulovou rysku.

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2a závislost zanesena do grafu 1 . Vzhledem k potřebám této práce se kalibrace omezila na malé průtoky s maximem na číslici 5.

Tabulka 2: **Závislost průtoku na poloze rotametru**

Poloha rotametru	Průtok (ml/min)
1	181,75
2	317,66
3	472,20
4	623,69
5	847,15

Graf 1 : **Závislost průtoku na poloze padáčku**



### 3.4.2 Měření produkce ozonu

Princip měření ozonu je popsán v kapitole 2.4.4. Proto zbývá pouze doplnit dílčí údaje. Do absorpční nádoby bylo nalito 12 ml 2% roztoku jodidu draselného (KI), nastavení průtoku bylo zvoleno dle požadavků a společně se stopkami byl spuštěn zdroj. Samotná ozonizace trvala 5 minut. Vzhledem k tomu, že kolísal tlak v kyslíkové bombě, byl do soustavy připojen regulátor tlaku. Ten podstatně redukoval kolísání. Také díky němu bylo možné zvýšit průtok kyslíku po ozonizaci, aby rychleji „vyčistil“ ozonizátor od zbylého ozonu a zároveň se vrátit pomocí stupnice na regulátoru k původnímu průtoku. Při návratu k původnímu průtoku byl pro kontrolu vždy používán

bublínkový průtokoměr, na kterém byly hodnoty s menší odchylkou. Čištění ozonizátoru kyslíkem probíhalo dalších 5 minut. Během této doby přecházel stále ještě přítomný ozon do absorpční nádoby. Poté byl roztok kvantitativně převeden do titrační baňky a okyselil 1,2 ml koncentrovanou kyselinou sírovou. Titrováno roztokem thiosíranu sodného o koncentracích ( $c \sim 0,05$  mol/l) v tabulkách a grafech je vždy uvedena přesná koncentrace. Jako indikátor byl použit škrobový maz.

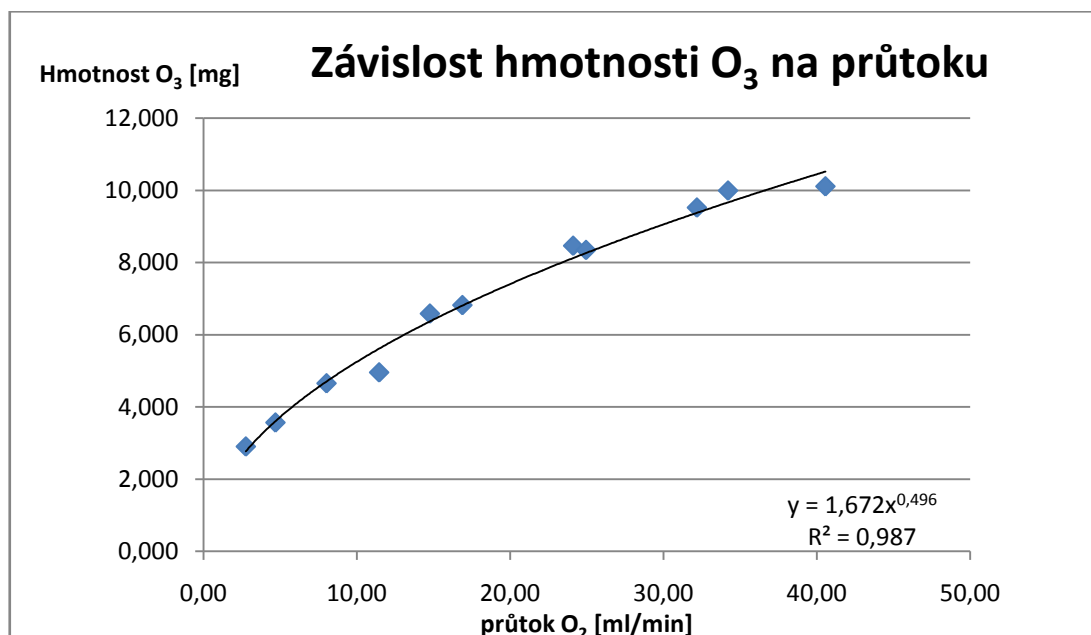
V následujících tabulkách a grafech jsou uvedeny pouze některé hodnoty a to z důvodu velké obsáhlosti výchozích tabulek.

**Tab. 3: Naměřené hodnoty při daných parametrech**

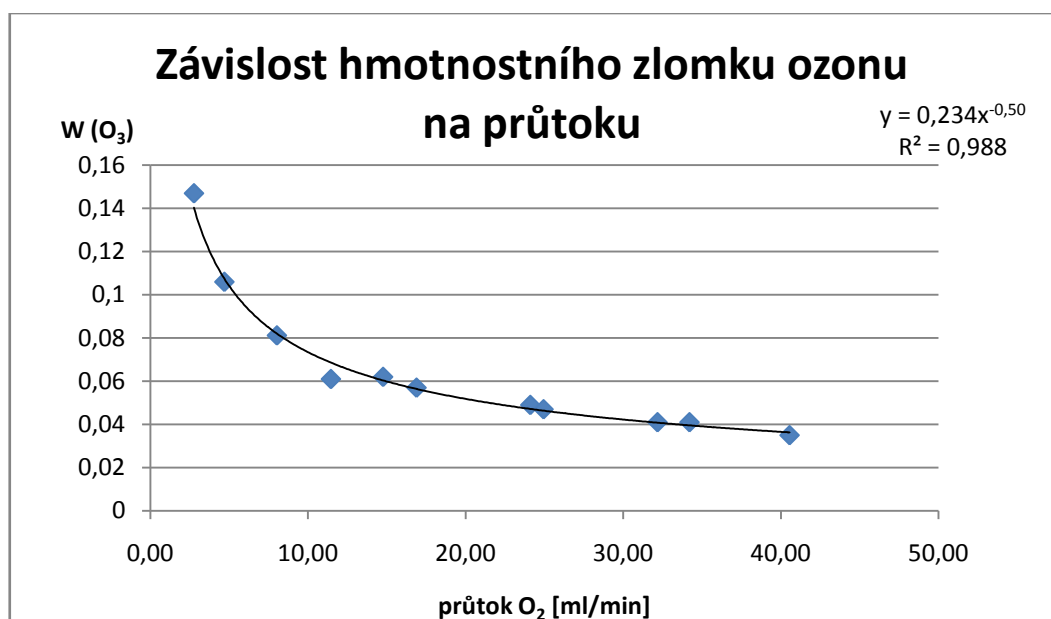
$f = 37,6$ Hz	$n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ mol	$V_{(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)}$ ml	hmotnost $\text{O}_2$	hmotnost $\text{O}_3$	W
průtok v ml/min	titr $c = 0,049$ mol/dm <sup>3</sup>				
2,76	0,1209	3,70	19,756	2,901	0,147
4,69	0,1486	1,95	33,545	3,565	0,106
7,19	0,2205	3,00	51,372	5,292	0,103
11,45	0,2065	7,80	81,839	4,955	0,061
14,76	0,2744	5,80	105,461	6,586	0,062
16,88	0,2842	8,50	120,582	6,821	0,057
24,10	0,3528	8,10	172,203	8,467	0,049
24,94	0,3479	8,20	178,161	8,350	0,047
32,17	0,3969	10,15	229,866	9,526	0,041
34,20	0,4165	13,13	244,343	9,996	0,041
40,55	0,4214	13,85	289,760	10,114	0,035



Graf 2 : Závislost hmotnosti ozonu na průtoku



Graf 3: Závislost hmotnostního zlomku ozonu na průtoku



Do grafů byly zvoleny závislosti měřené při malých průtocích, protože právě při podobných průtocích probíhá ozonizace acetátu kyseliny betulinové.

### 3.4.3 Nastavení optimální frekvence

Nastavení frekvence závisí na zdroji vysokého napětí. Druhy zdrojů jsou uvedeny v literatuře<sup>13</sup>. Pro oba se optimální frekvence liší. V oscilačním obvodu připojeném do systému, lze měnit kondenzátory a na základě toho, že se během měření nemění odpory, lze zkoumat závislost výtěžku ozonu na frekvenci.

Při tomto měření je důležité zachovávat konstantní průtok (20 ml/min) kyslíku soustavou. Proto se nezvyšuje průtok při čištění ozonizátoru a ponechává se stejný průtok, který je před každým měřením ještě dodatečně kontrolován na bublinkovém průtokoměru.

Pro každý kondenzátor se měření provádělo třikrát a výsledky jsou průměry těchto měření.

Tabulka 4: Označení kondenzátorů a vypočtená frekvence zdroje

<u>kondenzátory</u>	<u>frekvence (Hz)</u>
683	349,7
104	239,6
224	148,5
334	68,8
474	53,14
684	41,45
104+684	35,22

U poslední zkoumané frekvence uvedené v této tabulce bylo využito paralelního zapojení kondenzátorů. Pro které platí vztah :  $\frac{1}{C1} = \frac{1}{C2} + \frac{1}{C3}$ .

Dalším důležitým krokem bylo zjistit skutečnou frekvenci zdroje, protože vypočtené hodnoty se mohou s těmi skutečně naměřenými lišit v závislosti na přesných parametrech oscilačního obvodu a zdroje samotného.

### 3.4.4 Měření optimální střídy

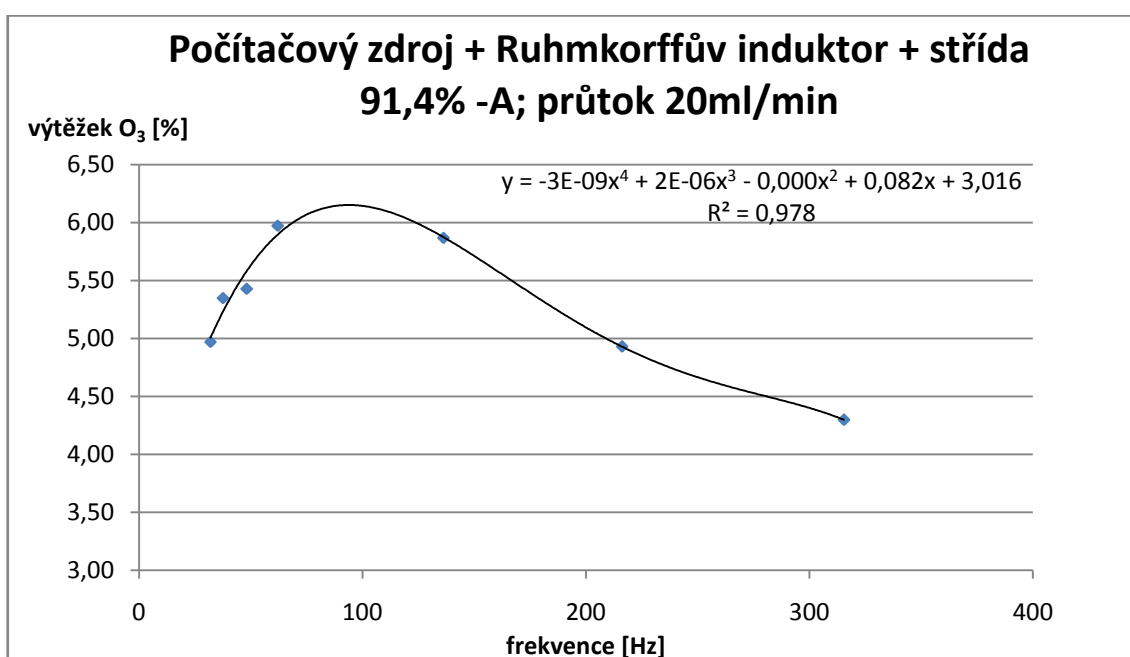
Dalším parametrem, kterým lze ovlivňovat produkci ozonu, je tzv. střída. Je to poměr mezi časy, kdy je cívka nebo Ruhmkorffův induktor pod napětím a kdy je odpojen.

Tento poměr lze také vyjádřit jako poměr odporů :  $\text{Střída} = \frac{R1}{R1+R2}$  (14).

Tabulka 5 : Označení kondenzátorů a skutečné frekvence

<u>kondenzátory</u>	<u>frekvence [Hz]</u>
683	315,5
104	216,2
224	136,3
334	62,1
474	48,2
684	37,6
104+684	32

Graf 4: Závislost výtěžku O<sub>3</sub> na frekvenci zdroje při zvolených parametrech<sup>14</sup>

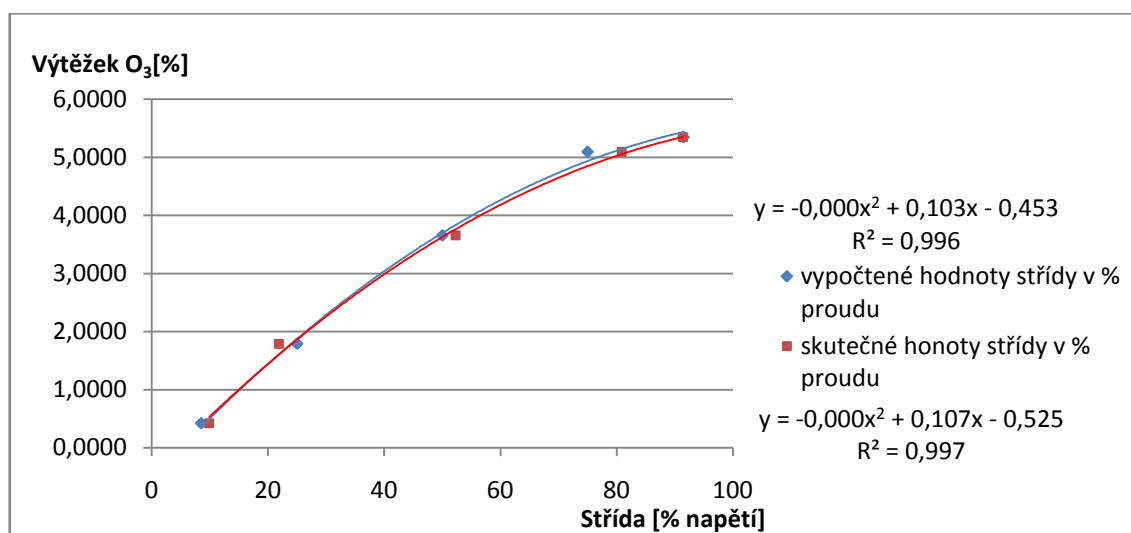


Měření závislosti výtěžku ozonu na střídě bylo provedeno na ozonizátorech, které jsou napájeny modifikovaným zdrojem<sup>14</sup> s Ruhmkorffovým induktorem a se stejným zdrojem s autocívkou. V tabulce 6 a grafu 5 jsou uvedeny hodnoty jak vypočtené střídě, jejíž odpor je dán hodnotou uvedenou výrobcem, tak i skutečné hodnoty střídě, které byly naměřeny. V tabulce 7 a grafu 6 jsou už uvedeny pouze hodnoty, které odpovídají pouze skutečným poměrům odporů. Průtoky, při kterých bylo měření prováděno, jsou uvedeny u grafů a tabulek.

Tabulka 6: Zdroj<sup>14</sup> s Ruhmkorffovým induktorem s natavenou frekvencí 37,6 Hz

Vypočtené hodnoty střídý		Skutečné hodnoty střídý	
proud v %	W při průtoku 20ml / min	proud v %	W při průtoku 20ml / min
8,5	0,4193	9,9	0,4193
25	1,7879	21,9	1,7879
50	3,6538	52,3	3,6538
75	5,0953	80,9	5,0953
91,5	5,3472	91,4	5,3472

Graf 5 : Závislost výtěžku ozonu na střídě



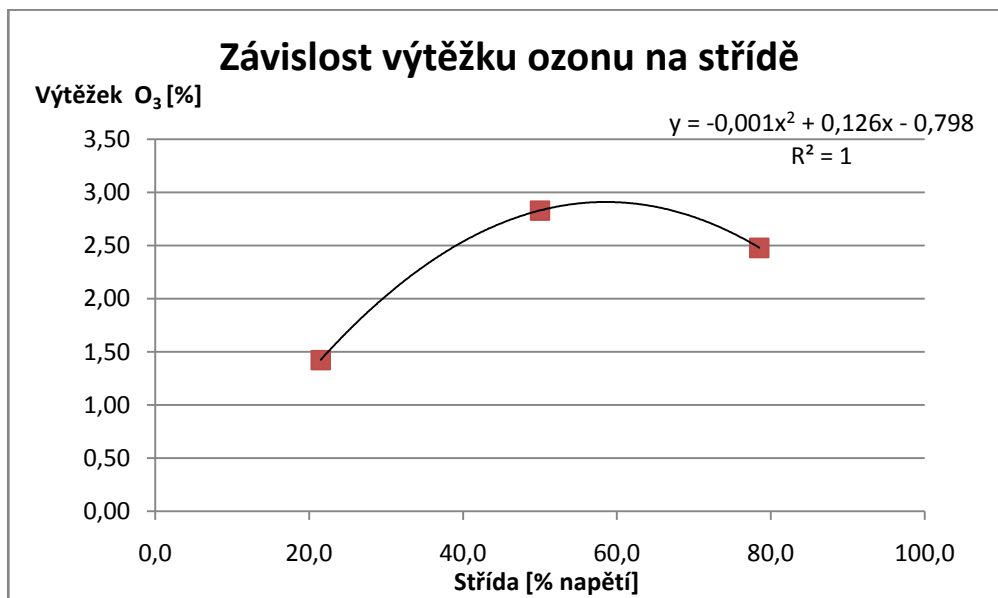
Následující data jsou naměřena při průtoku 48 ml/min a frekvenci také 37,6 Hz.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty pro zdroj<sup>14</sup> s autocívkou

proud v %	hmotnost o <sub>2</sub>	hmotnost o <sub>3</sub>	V= na2s2o3	n=na2s2o3	W
21,5	347,971	4,955	4,1	0,2065	0,0142
50	343,510	8,521	7,05	0,3550	0,0248
78,5	344,061	9,730	8,05	0,4054	0,0283

Během těchto experimentů se střídou bylo zjištěno, že cívka se při střídách vyšších než 21,5 % zahřívá. Na základě tohoto faktu lze pro dlouhodobější používání, které je při ozonizaci organických sloučenin potřeba, doporučit právě tuto střidu.

Graf 6: Závislost výtěžku ozonu na střídě

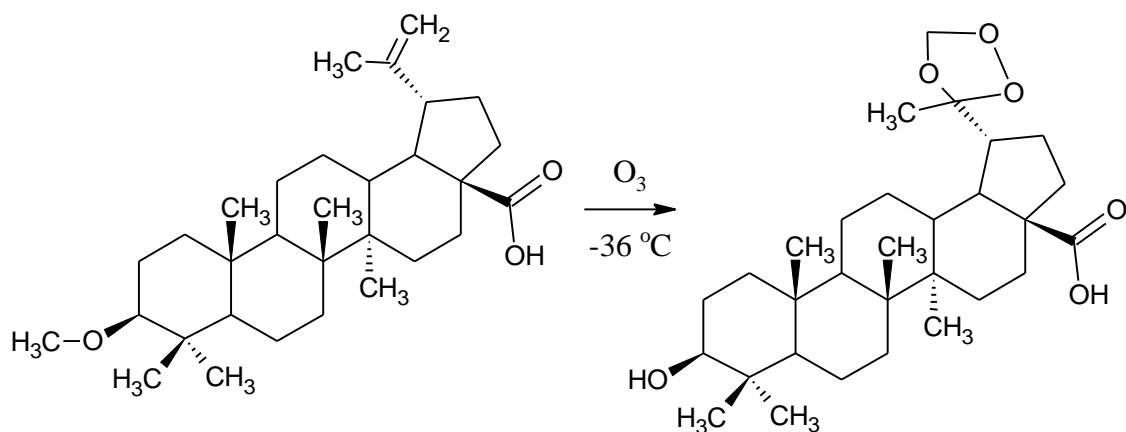


### 3.5 Ozonizace acetylované kyseliny betulinové

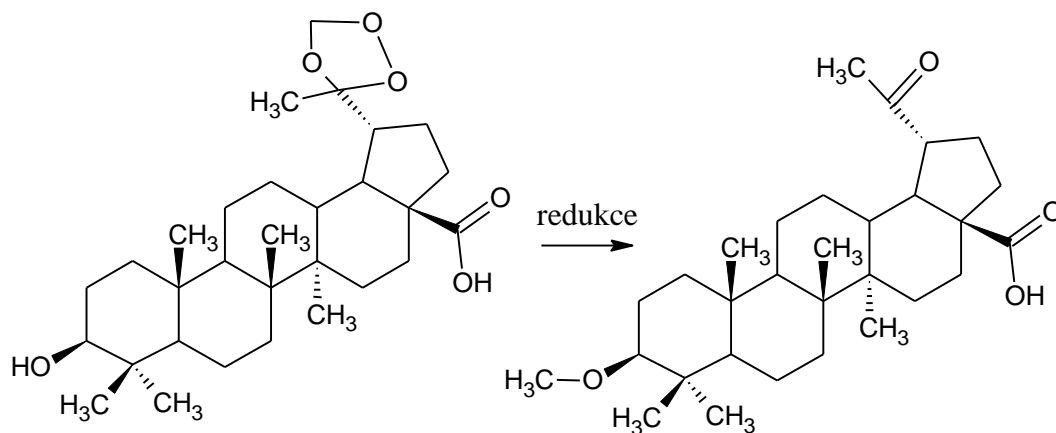
Ve směsi, která je tvořena 1,8 ml chloroformu a 4,2 ml ethylacetátu, rozpustíme 100 mg acetylované kyseliny betulinové (obr.16). Roztok přelijeme do absorpční nádoby a tu vložíme do ethanolové lázně. Lázeň je chlazená chladicí spirálou na teplotu -36 °C. Po dobu ozonizace zůstávala teplota v intervalu +/- 2 °C. Do roztoku byl veden ozonizovaný kyslík po dobu tří a půl hodiny s průtokem 40 ml/minutu (to odpovídá produkci 10,11 mg ozonu). Ozonizátor byl nastaven takto: sada tří ozonizačních trubic (popsaných kap.: 2.4), Ruhmkorffův induktor, frekvence 62,1 Hz a střídou 91,5% proudu. Vzorek byl v průběhu ozonizace odebírán ze směsi a nanášen na silikagel. Chromatogram byl vyvíjen v čistém ethylacetátu a ve směsi ethylacetátu s n-hexanem v poměru 1:1. Po úvaze byl dále používán ethylacetát, jelikož směs ethylacetátu s n-hexanem byla málo polární pro potřeby chromatografie. Vyvinutý chromatogram byl postříkán 10%-ní kyselinou sírovou a vypálen na elektrickém vařiči. Takto se postup opakoval každou půl hodinu. Stopa původní směsi postupně slábla a

kousek nad startem se začala objevovat nové skvrna. Po ukončení ozonolýzy stále zůstávaly na chromatogramu dvě skvrny (obr.18). Bylo by proto vhodné příští ozonolýzu provádět delší dobu.

Bohužel vzorek zůstal i nadále jako směs (látky na obr.18), následující izolace by mohla být námětem pro další práci.



Obr.16: Reakce 3- acetylbetulinové kyseliny s ozonem, produktem je ozonid



Obr.17: Redukce ozonidu 3- acetylbetulinové kyseliny na norketon



1 2

Obr.18: **Chromatogram výsledné směsi** 1 – kyselina 3- acetylbetulinová  
2 – směs ozonidu a kys. 3-acetylbetulinové

## 4. Závěr

V práci jsou shrnuty základní informace o kyselině betulinové z oblasti výskytu a vlastností s důrazem na její vlastnosti fyziologické. Vzhledem k tomu, že se v literatuře uvádí nutnost její chemické modifikace, byly učiněny i první kroky v tomto směru. Základní úvaha směřuje k využití dvojné vazby isopropenylové skupiny přeměnou na skupinu karbonylovou podobně jak tomu bylo již dříve u betulindiacetátu. Protože tato přeměna je možná například ozonolýzou a katedra chemie FPE ZČU v Plzni disponuje několika variantami ozonizátoru, bylo přikročeno k výběru vhodného ozonizátoru a kvalitativnímu ověření možnosti ozonizace kyseliny betulinové.

V průběhu testování ozonizátorů byla realizována řada experimentů, které byly zapracovány do přehledného článku pro Chemické listy<sup>14</sup>. Vlastní ozonizace kyseliny betulinové naznačuje, že je využitelná pro další práci.



## 5 Seznam použité literatury :

1. [www.scholarsresearchlibrary.com/aasr-vol6-iss3/AASR-2014-6-3-47-58.pdf](http://www.scholarsresearchlibrary.com/aasr-vol6-iss3/AASR-2014-6-3-47-58.pdf)
2. [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b8936?lang=en&region=CZ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b8936?lang=en&region=CZ)
3. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658785/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658785/)
4. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438379/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438379/)
5. [www.lekarske.slovníky.cz/pojem/apoptoza](http://www.lekarske.slovníky.cz/pojem/apoptoza)
6. [www.klinikafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/01/04.pdf](http://www.klinikafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/01/04.pdf)
7. Klinot J., Vystrčil A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 27,337 (1962)
8. [www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21353/pdf](http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21353/pdf)
9. Čeladník M., Palát K., Sova J., Waisser K.: Chemická laboratorní technika, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1984
10. Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii, Pedagogická fakulta ZČU v Plzni, Plzeň 1993
11. Richtr V., Kraitr M. :: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce, Sborník katedry chemie ZČU, Plzeň 2004
12. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
13. Richtr V., Kraitr M. :: Příprava a využití ozonu ve školních podmínkách, Sborník katedry chemie ZČU, Plzeň 2006
14. Richtr V., Rieger D., Vála L., Štrofová J., Kraitr M.: Příprava ozonu pro školní i laboratorní využití, Chem. Listy, 2015 <sup>v tisku</sup>
15. McMurry J.: Organická chemie, VŠCHT, Praha 2007

## **6. Resumé**

This thesis is dividend into theorethical and practical part. In the theoretical part are described features and applications of betulinic acid and some laboratory methods like distillation, extraction and thin-layer chromatografy. In a same part is also described construction of ozoniser. In practical part is a description of simple transformation of betulinic acid, its ozonolysis and testing of ozoniser.