

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta pedagogická

Katedra chemie

Diplomová práce

**NETRADIČNÍ EXPERIMENTY Z ORGANICKÉ
CHEMIE V EXPERIMENTÁLNÍ PŘÍPRAVĚ
UČITELŮ CHEMIE**

Monika Šnaiberková

Učitelství pro střední školy, obor biologie - chemie

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Václav Ríchnr CSc.

Plzeň 2015

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika ŠNAIBERKOVÁ**
Osobní číslo: **P13N0109P**
Studijní program: **N7504 Učitelství pro střední školy**
Studijní obory: **Učitelství biologie pro střední školy
Učitelství chemie pro střední školy**
Název tématu: **Netradiční experimenty z organické chemie v experimentální
přípravě učitelů chemie**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Provést rešerši využití mikrovlnné trouby v chemii.
2. Seznámit se s experimenty bez zvláštních úprav trouby.
3. Vytypovat některý z popsaných experimentů a ověřit jeho provedení.
4. Ověřit možnost využití bodotávku pro organickou syntézu.
5. Navrhnout a zhodnotit další experimenty.

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

Šulcová R., Böhmová H.: Netradiční experimenty z organické a praktické chemie. UK Praha, 2007.

Časopisy:
Biologie-Chemie-Zeměpis
Přírodní vědy ve škole
Chemické listy
Journal of Chemical Education

Vedoucí diplomové práce: Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce: 15. března 2014
Termín odevzdání diplomové práce: 30. června 2015


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. září 2013

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

Ve Strašicích, 23. 6. 2015

.....

Poděkování

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

OBSAH

1. Úvod	1
2. Teoretická část.....	2
2.1 Mikrovlnná chemie	2
2.1.1 Mikrovlnné záření	2
2.1.2 Historie	2
2.1.3 Současné možnosti využití mikrovlnného záření	3
2.1.4 Mikrovlnná zařízení.....	3
2.1.5 Využití mikrovlnného záření v chemii	5
2.1.6 Mikrovlny ve výuce chemie	7
2.2 Stanovení teploty tání.....	8
2.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC).....	9
2.4 Chromatografie	11
2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	12
2.5 Triterpeny	13
3. Praktická část.....	15
3.1 Reakce anilinu a kyseliny octové	15
3.2 Hledání aktivního místa v mikrovlnné troubě.....	20
3.3 Reakce betulinu s měděným práškem	22
3.3.1 Reakce betulinu a měděného prášku na bodotávku.....	23
3.3.2 Zahřívání směsi betulinu a měděného prášku v mikrovlnné troubě.....	23
3.4 Reakce betulinu s KHSO_4	26
3.4.1 Zahřívání směsi betulinu a KHSO_4 na bodotávku.....	27
3.4.2 Zahřívání směsi betulinu a KHSO_4 v mikrovlnné troubě.....	31
3.4.3 Zahřívání směsi betulinu a KHSO_4 v lázni KHSO_4	32
3.4.3.1 Příprava vzorků K_5 a K_6	33
3.4.3.2 Příprava vzorků K_7 a K_8 pro preparativní TLC	34
3.4.3.3 Zpracování produktů tavení vzorků K_7 a K_8 pomocí preparativní TLC..	35
3.4.3.3.1 Preparativní TLC vzorku $\text{K}_{\gamma 1}$	40
3.4.3.3.2 Preparativní TLC vzorků K_{10} a K_{11}	43
3.4.3.3.3 Preparativní TLC vzorků K_{10} a K_{11} pomocí preparativní TLC	46
3.4.3.3.3.1 Preparativní TLC vzorku $\text{K}_{\gamma 2}$	50
3.5 Příprava chromatograficky čistého betulinu	53
3.5.1 Krystalizace vzorku BET_1	57
3.6 Zjišťování DSC křivek	59
3.6.1 Provedení diferenciální skenovací kalorimetrie	59
3.6.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie směsi betulinu a měděného prášku	59

3.6.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie směsi betulinu a KHSO_4	61
4. Didaktická část	62
4.1 Laboratorní cvičení č. 1	62
4.1.1 Příprava preparativní TLC desky	62
4.1.2 Zahřívání betulinu s KHSO_4 v tavenině KHSO_4	63
4.2. Laboratorní cvičení č. 2	64
4.2.1 Příprava balonku	64
4.2.2 Preparativní TLC	64
4.3 Laboratorní cvičení č. 3	65
4.3.1 Zpracování preparativní TLC desky	65
4.3.2 Zahřívání betulinu a KHSO_4 na bodotávku	65
4.4 Laboratorní cvičení č. 4	66
4.4.1 Zpracování preparativní TLC desky	66
4.5 Laboratorní cvičení č. 5	67
4.5.1 Zpracování získaných frakcí z preparativní TLC	67
4.5.2 Porovnání reakce na bodotávku a v tavenině KHSO_4	68
4.6 Shrnutí	68
5 Závěr	69
6. Seznam použité literatury	70
7. Resumé	72

1. Úvod

Rozvoj současné společnosti je silně ovlivňován řadou nových objevů ve vědě i technice. Tohoto vlivu nemůže být ušetřena ani výuka chemie jako přírodovědného oboru. Výuka chemie musí sledovat jak vývoj v oblasti teorie, tak nové možnosti v oblasti experimentu. Základním trendem je racionalizace prováděných experimentů, což kromě jiného představuje sledování více jevů současně, pokud možno šetrné působení na životní prostředí a možnost upevňování mezipředmětových vztahů. K takovým experimentům směřuje i tato diplomová práce, jejíž výsledky by mohly ovlivnit přípravu budoucích učitelů chemie, ale i chemický experiment na středních školách.

Tato diplomová práce je rozdělena na praktickou, teoretickou část a didaktickou část. V teoretické části jsou uvedena základní fakta k postupům užívaných při práci v laboratoři. Praktická část práce se zabývá především přípravou a izolací γ -apoallobetulinu. V didaktické části je rozpracován postup práce, který je možno zařadit do experimentální výuky budoucích učitelů chemie.

2. Teoretická část

2.1 Mikrovlnná chemie

Mikrovlnná chemie je poměrně mladou chemickou disciplínou, jejíž počátky sahají do 80. let 20. století. První publikované práce, které popisovaly využití mikrovln v organické syntéze, vyšly v roce 1986 v uznávaném časopise *Tetrahedron*¹. Hlavní rozvoj mikrovlnné chemie však nastal až v 90. letech a trvá do současnosti.

2.1.1 Mikrovlnné záření

Mikrovlny spadají do oblasti elektromagnetického spektra, jedná se o elektromagnetické záření s dlouhou vlnovou délkou o nízké energii. Vlnová délka mikrovlnného záření se pohybuje v rozmezí 1 mm až 1 m. Jedná se o záření, které v malých dávkách nevykazuje škodlivé účinky na živé organismy².

Mikrovlnné záření má, stejně jako jiné druhy záření, schopnost interagovat s různými materiály. Materiály v závislosti na typu interakcí s mikrovlnným zářením lze rozdělit do tří skupin. První možností je, že látka s mikrovlnami nereaguje a mikrovlny látkou volně procházejí, např. sklo, nepolární látky. Druhou možností je odraz mikrovln od dané látky. Tento jev se vyskytuje u kovových látek a je ho úspěšně využíváno k zabránění úniku mikrovln z mikrovlnných trub, jejichž hlavním konstrukčním materiálem jsou právě kovy. Poslední možností je absorpce mikrovln látkou. S mikrovlnným polem reagují pouze látky s polárními molekulami, např. voda, polární rozpouštědla. Při absorpci mikrovlnného záření dochází v souladu se zákonem o zachování energie k přeměně mikrovlnné energie na tepelnou. Při využití mikrovlnného záření dochází k rovnoměrnému ohřevu látky.

2.1.2 Historie

S teorií o existenci elektromagnetického záření přišel již v roce 1873 James Clerk Maxwell. K objevu mikrovln však došlo až ve 40. letech 20. století ve Velké Británii, kde sir John Randal a dr. H. A. H. Boo vynalezli zdroj mikrovlnného záření – magnetron³. Výraznější výzkum v mikrovlnné oblasti elektromagnetického spektra ve 40. letech souvisel s vývojem radarové techniky, která využívá právě mikrovln. Velký význam hrála radarová technika za 2. světové války při sledování nepřátelských letadel. Od používání mikrovln v souvislosti s vojenskými účely byl kupodivu již jen kousek

k vývoji zařízení, které by pro ohřev látek využívalo právě mikrovlnné záření. Při provádění experimentů s radary objevil náhodně zaměstnanec firmy Raytheon Corporatio Percy Lebaron Spencer, že mikrovlny dokáží rozehrát čokoládu, kterou měl při práci v kapse. V roce 1952 byl firmě vydán první patent na mikrovlnnou troubu a roku 1961 byla vyrobena první mikrovlnná trouba⁴.

První mikrovlnná trouba svou velikostí připomínala spíše skříň, než kuchyňský spotřebič tak, jak jej známe v současnosti. Výraznější komerční využití mikrovlnné trouby spadá až do 70. let 20. století. Od té doby toto odvětví zažilo velký rozmach. Během 80. let 20. století začaly probíhat také první pokusy v chemických laboratořích, které zkoumaly možnosti využití mikrovln v chemii.

2.1.3 Současné možnosti využití mikrovlnného záření

Když se řekne mikrovlny či mikrovlnné záření, každého okamžitě napadne mikrovlnná trouba a ohřívání potravin. Málokdo si uvědomí, že mikrovlny prostupují mnoha odvětvími lidské činnosti, a že člověka provázejí téměř na každém jeho kroku.

Velmi důležitou oblastí, která využívá mikrovlnné záření je již v historickém úvodu zmíněná radarová technika. Na principu mikrovln však nefungují pouze radary, ale také většina telekomunikačních systémů, od mobilních sítí, přes televizní a satelitní vysílání až po v současnosti téměř všudypřítomné Wi-Fi routery.

Mikrovlny také pronikly do odvětví, u nichž by to málokdo očekával. Akademie věd České Republiky prováděla výzkum využití mikrovln ve sklářství a nová metoda mikrovlnného tavení, která byla v rámci výzkumu objevena, byla přihlášena k patentové ochraně². V rámci výzkumu byla zkonstruována mikrovlnná tavicí pec, která efektivně fungovala.

Mikrovlny jsou úspěšně využívány k sušení rozličných materiálů – papíru, archiválií, knih, dřeva, keramických výrobků či farmaceutických produktů. Uplatnění našly také v průmyslu polymerů, předehřevu plastů a pryže před zpracováním. Mikrovlny lze také použít při sterilizaci půdy a osiv. Známé je též použití mikrovln k rozkladu polychlorovaných bifenylnů⁵.

2.1.4 Mikrovlnná zařízení

Jak již bylo řečeno v podkapitole zabývající se mikrovlnným zářením obecně, s mikrovlnným polem reagují pouze látky s polárními molekulami. Bez působení

mikrovlenného pole jsou polární molekuly různě orientovány v prostoru. Při vložení mikrovlenného pole se molekuly snaží orientovat ve směru vkládaného elektrického pole, tj. molekula se snaží dosáhnout energeticky nejvýhodnějšího stavu. V mikrovlenném zařízení osciluje pole velmi rychle, mění svůj směr $2,45 \times 10^9$ za sekundu. Molekuly polární látky se těmito změnám snaží přizpůsobit, tedy rychle měnit svou orientaci podle změny působení elektrického pole. Při vysoké rychlosti oscilace se však molekuly nedokáží zcela přizpůsobit změnám a dochází k jejich vibraci až rotaci ve směru elektrického pole. Výsledkem pohybu a tření molekul při změně vzájemné orientace dipólů ve vysokofrekvenčním poli je přeměna mikrovlenné energie na teplo^{2,5,6}.

Kuchyňské mikrovlenné trouby nejčastěji pracují v oblasti vlnové délky 12,2 cm, což odpovídá frekvenci 2450 MHz⁷. Tato frekvence je souhlasná s frekvencí kmitání dipólů molekul vody. Většina potravin obsahuje velké množství vody. A právě na tyto molekuly vody je působeno v mikrovlenné troubě při ohřevu potravin⁸.

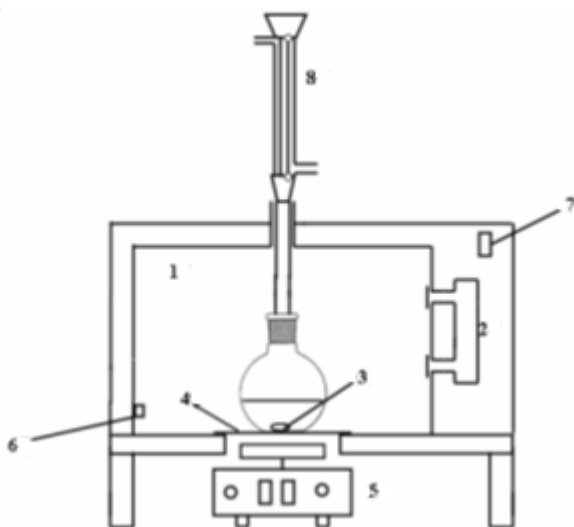
Hlavní funkční části mikrovlenné trouby tvoří vysokofrekvenční zdroj, magnetron, vlnovod, rozptylovač mikrovlenné a samotný varný prostor. Mikrovlenné jsou generovány magnetronem a poté se vedou vlnovodem do prostoru trouby. Tam se mikrovlenné rozptýlí, odráží se od stěn a vytvářejí mikrovlenné pole. Mikrovlenné se spotřebovávají pohlcením v absorpčních materiálech za vzniku tepla. Pokud se v mikrovlenném poli vyskytuje materiál s nízkou nebo žádnou absorpční schopností, mikrovlenné se nemají kde pohltit, dochází k jejich zpětnému odrazu do magnetronu, což snižuje jeho životnost, případně hrozí jeho zničení².

Intenzita mikrovlenného záření není ve všech místech varného prostoru stejná. Uvnitř mikrovlenné trouby se vytváří mikrovlenné pole. Uspořádání mikrovlenného pole závisí na mnoha faktorech a každý typ mikrovlenné trouby, či dokonce každá mikrovlenná trouba má své vlastní rozložení mikrovlenného pole. Z tohoto důvodu je pro rovnoměrné ohřívání potravin důležitý otočný talíř. Bez něj by se části potravin spálily a části zůstaly téměř studené.

Běžnou kuchyňskou mikrovlennou troubu lze využít také v laboratoři k provádění pokusů. Jednou z možností je využít mikrovlennou troubu v běžném provedení, ve kterém se prodává v obchodech. Využití mikrovlenné trouby bez zvláštních úprav má však svá omezení při provádění pokusů. Není možné průběžně sledovat teplotu reagující směsi. Nelze provádět pokusy vyžadující chlazení za pomoci chladiče. Během zahřívání není možné reakční směs míchat. Podmínky reakce lze korigovat pouze na základní úrovni, buď úpravou doby reakce prostřednictvím časovače mikrovlenné trouby, nebo

nastavením intenzity výkonu mikrovlnné trouby. U některých pokusů, zvláště na úrovni výuky ve školách, nehrají tato omezení zásadní roli. Ovšem ve výzkumu využívání mikrovln v chemii je třeba znát přesné podmínky průběhu reakce a běžná kuchyňská mikrovlnná trouba je nedostačující.

Druhou možností při provádění pokusů s mikrovlnným zářením je využití mikrovlnné trouby, u níž byly provedeny úpravy pro chemické pokusy, viz. obrázek 1. Tyto úpravy spočívají v možnosti připojení chladiče, magnetického míchadla a teploměru. Úpravy může provádět pouze odborná firma a následně je nutné zařízení odborně přezkoušet, zda nedochází k úniku záření⁵.



Obr. 1 **Upravená kuchyňská trouba pro chemické pokusy**, 1 kavita; 2 magnetron; 3 magnetické míchadlo; 4 hliníkové dno; 5 magnetická míchačka; 6 IČ teploměr; 7 vypínač; 8 vodní chladič (převzato z literatury²)

Především ve výzkumu se dnes používají speciální mikrovlnné reaktory. Jedná se o zařízení firem Milestone, CEM Corp, Prolabo a Plasmatronika. Výhodou u těchto zařízení je vyšší homogenita pole, možnost plynulé regulace výkonu, průběžná regulace a kontrola teploty, míchání a připojení chladiče⁵.

2.1.5 Využití mikrovlnného záření v chemii

Při použití mikrovlnného záření dochází k rovnoměrnému ohřevu v celém objemu látky, tedy látka se zahřívá zevnitř k povrchu. Při klasickém ohřevu (např. na topném hnízdě, na vařiči) dochází k ohřevu látky prostřednictvím kontaktu se zahřívanou nádobou, tedy ohřev postupuje z povrchu látky dovnitř. To může způsobit

např. lokální spálení vzorku, nerovnoměrné prohřátí reakční směsi, či další nežádoucí jevy, které můžou ovlivnit žádoucí průběh reakce a zreagování výchozích látek. Hlavní výhodou mikrovlnného ohřevu oproti klasickým metodám je výrazné urychlení ohřevu, které je důsledkem toho, že k zahřívání látky dochází zevnitř k povrchu. Mikrovlnný ohřev lze využít také pro rychlý ohřev materiálů s nízkou tepelnou vodivostí v celém jejich objemu. Tento teplotní jev se označuje pojmem objemový ohřev².

Ohledně mechanismu, který se jako hlavní podílí na urychlení průběhu chemických reakcí, při využití mikrovlnného záření, se vedou vědecké spory a dosud nebyl mechanismus působení mikrovlnného záření na reagující látky zcela objasněn⁶. Jedním ze zásadních faktorů je výše uvedený objemový ohřev, který urychluje fázi reakce, kdy je nutno směs zahřát, aby reagovala. Zároveň umožňuje vznik dalšího tepelného efektu specifického pro mikrovlnný ohřev tzv. superheating effect. Při rychlém ohřátí kapalin v mikrovlnném poli je konvekce k povrchu kapaliny nedostatečná a dochází k přehřátí kapaliny, což se projeví zvýšením teploty varu u polárních rozpouštědel o 10 – 30°C aniž by docházelo k přechodu z kapalně fáze do plynné^{5,6}. Kromě vlivu vlastních tepelných efektů na urychlení chemických reakcí se uvažuje také vliv mikrovlnného záření na vhodnou orientaci molekul tak, aby mohlo docházet k účinným srážkám. Netepelné vlivy mikrovlnného záření by také mohly ovlivňovat např. velikost aktivační entalpie. Vliv netepelných efektů nebyl vědecky prokázán a vedou se o něj spory.

Mikrovlnný ohřev tedy urychluje průběh reakcí, čímž dochází k úspoře energie a času. Mikrovlnný ohřev umožňuje zahřívání kapalin nad jejich bod varu za normálního tlaku, umožňuje zvýšení selektivity chemických reakcí a zvýšení výtěžku reakcí. Při využití mikrovlnného ohřevu odpadá nutnost stavět aparatury^{2,5}.

Skutečnost, že mikrovlnné záření reaguje pouze s polárními látkami, se podílí na zlepšení energetické efektivity reakcí. Při klasickém ohřevu se část tepla spotřebuje na ohřev nádoby, v níž se nachází reakční směs. Tím dochází ke zbytečným energetickým ztrátám. Oproti tomu mikrovlny procházejí stěnami nádob a působí pouze na reaktanty a rozpouštědlo.

Velké pozornosti se těší problematika tzv. solvent-free reactions, tedy reakcí bez použití rozpouštědel. Velký zájem o takovéto reakce v posledních letech souvisí s jejich nižší finanční náročností. Při využití mikrovlnného záření na ovlivnění dané reakce odpadá nutnost používat rozpouštědla, což šetří životní prostředí. Mikrovlnné záření

navíc značně urychluje průběh chemických reakcí, čímž snižuje energetické náklady na provedení reakce, tedy v konečném důsledku také šetří životní prostředí.

Jak již bylo vysvětleno v předcházejících částech této práce, s mikrovlnným zářením interagují pouze polární molekuly. Mikrovlnné záření však lze využít i pro urychlení reakcí probíhajících v nepolárních rozpouštědlech. K nepolární kapalině se přidá malé množství polárního rozpouštědla, které reaguje na oscilující pole v mikrovlnném zařízení a dochází k jeho ohřevu. Polární rozpouštědlo následně předává teplo nepolární části směsi, která se velmi rychle ohřívá⁷.

Možnosti využití mikrovlnného záření z pohledu typu reakcí, které jsou mikrovlny schopny ovlivnit je široké. Působení mikrovlnného záření je úspěšně potvrzeno u mnoha kondenzačních reakcí, cykloadičních reakcí, oxidací, alkylací, heterocyklických reakcí atd. Výčet prozkoumaných reakcí, u kterých je k ovlivnění průběhu využíváno mikrovlnné záření, je uveden v literatuře⁷. Další podrobně popsané postupy a průběhy reakcí využívající mikrovln jsou v literatuře^{9,10,11,12}. Zdroje literatury^{1,3,13,14,15} se zabývají využitím mikrovlnného záření pro další řadu reakcí, jakými jsou např. intramolekulární cyklizační reakce, syntéza N-alkylbenzamidů, reakce karboxylových kyselin s aminy.

2.1.6 Mikrovlny ve výuce chemie

Na budoucí učitele chemie je cílena publikace Mikrovlny v laboratorních cvičeních z organické chemie od J. Šauliové a J. Ryndové⁵. V této publikaci jsou v úvodu popsána základní fakta o mikrovlnném záření, jeho vlivu na chemické reakce a také bezpečnost práce. Stěžejní část skript tvoří konkrétní pokusy, které je možno zařadit do budoucí přípravy učitelů.

Pokusům využívajícím mikrovlnné záření je také věnována část prostoru na Portálu PřF UK na podporu výuky chemie na ZŠ a SŠ, kde je možno stáhnout materiál věnující se mimo jiné pokusům prováděným za pomoci mikrovlnné trouby¹⁶. Jsou zde uvedeny návody na mnohé pokusy, které lze úspěšně aplikovat ve výuce na školách.

Demonstraci účinků mikrovlnného záření se věnuje diplomová práce J. Kohouta⁶. V této práci jsou popsány mnohé pokusy prováděné v mikrovlnné troubě včetně jejich fyzikálního vysvětlení. Mnohé z těchto pokusů jsou použitelné též ve výuce chemie ať už na středních školách, nebo v rámci přípravy budoucích učitelů.

Otázka využití mikrovlnného záření není záležitostí pouze českého prostředí. Časopis *Journal of Chemical Education* také často uvádí články týkající se využití mikrovlnného záření především ve vysokoškolské výuce studentů chemických a pedagogických oborů^{9,10,11,12}.

Přínosy využití mikrovlnné trouby ve výuce na středních i vysokých školách úzce souvisí s výhodami využití mikrovlnného záření, které jsou uvedeny výše v této práci. Hlavním pozitivem pro výuku je možnost provádění reakce bez použití agresivních či zdraví škodlivých rozpouštědel, se kterými žáci a studenti nesmějí při laboratorních cvičeních manipulovat. Další nespornou výhodou je urychlení průběhu reakce. Mnohé pokusy nejsou v rámci výuky na středních školách využitelné z důvodu nízké hodinové dotace laboratorních cvičení. Díky urychlení průběhu reakce je možno stihnout i více pokusů za jednu vyučovací hodinu. Zkrácení reakční doby také zvýší atraktivnost pokusu pro studenty, neboť tím odpadá nezajímavá doba, kdy je nutné reakční směs průběžně kontrolovat, aniž by byly patrné zajímavé změny. Výhodou je nenáročnost celé řady pokusů na vybavení. Není nutné stavět složité aparatury, což sníží časovou náročnost pokusu a zároveň jako vedlejší efekt zvýší zajímavost pokusů pro studenty, kteří neradi sestavují složité aparatury. Vyučující nesmí zapomenout před vlastním prováděním pokusů seznámit studenty se zásadami bezpečnosti práce s mikrovlnným zařízením (viz literatura^{5,6}) a také varovat před prováděním pokusů v domácím prostředí.

2.2 Stanovení teploty tání

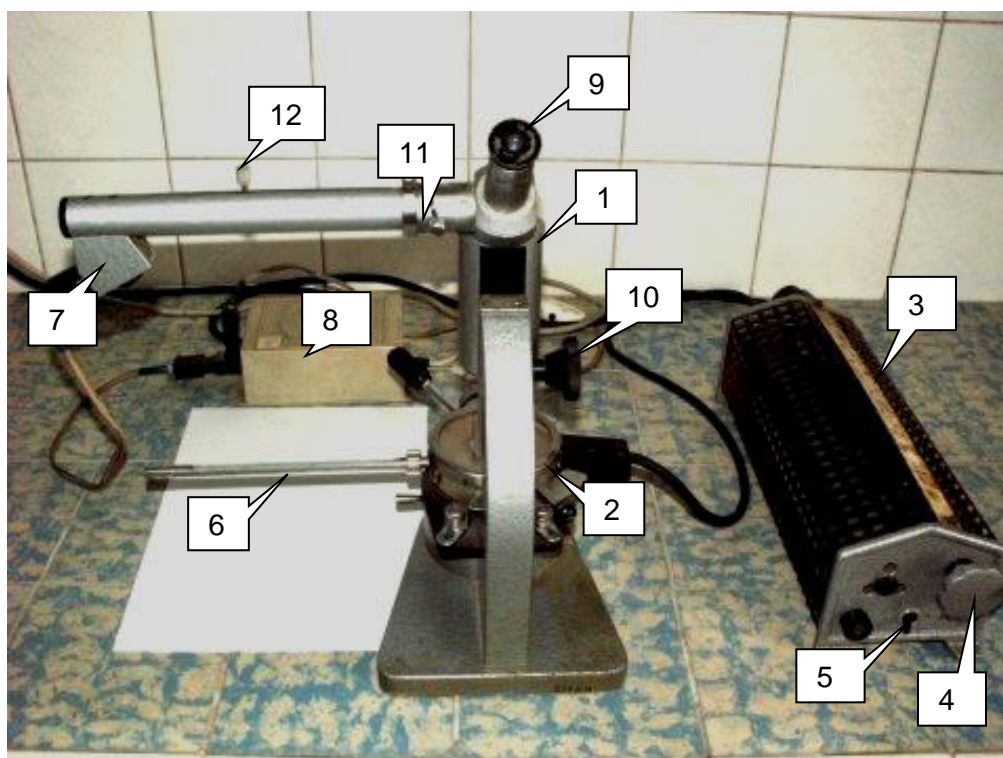
Bod tání je teplota, při níž jsou tuhá a kapalná fáze látky v rovnováze. Jako teplota tání se uvádí celý teplotní interval od zhroucení prvních krystalků do úplného roztavení vzorku¹⁷. Teplota tání je důležitou fyzikální charakteristikou každé látky, proto lze její stanovení využít jako jednu z charakteristik při identifikaci neznámé látky. Určení bodu tání je využíváno také pro zjištění čistoty látek, neboť čistá látka taje ve velmi úzkém teplotním rozsahu, případně obsažené příměsi zvětšují teplotní rozsah tání. Směsi látek navíc vykazují nižší bod tání než čistá látka.

Bod tání lze stanovovat několika postupy. Základní a nejstarší možností je umístění teploměru spojeného se zatavenou tenkou kapilárou, která obsahuje vzorek, do lázně dobře vodící teplo (kapalina, kovový blok)¹⁸. Při dosažení bodu tání začne pevná látka tát v kapalinu a na teploměru se odečte dosažená teplota. Kromě tohoto postupu

lze pro stanovení bodu tání využít přístroje určené ke stanovování bodu tání skleněné bodotávky či Thieleho bloky.

Pro práci v mikroměřítku se využívají bodotávky, které jsou v podstatě upravené mikroskopy s elektricky vyhřívaným stolcem, který je opatřen teploměrem. Ve spojení s tenkovrstvou chromatografií, případně jinými metodami, může dobře posloužit kromě již uvedených možností při navrhování reakčních podmínek nově zaváděných reakcí¹⁷.

Popis bodotávku viz. obrázek 2. Práce s bodotávkem je podrobně popsána v literatuře¹⁷. V kapitole 3.4.1 praktické části této práce je popsáno provádění pokusů s využitím bodotávku.



Obr. 2 **Bodotávek s mikroskopem**, 1 mikroskop; 2 elektricky vyhřívaný kovový blok; 3 reostat; 4 regulační klička reostatu; 5 vypínač vyhřívání kovového bloku; 6 teploměr; 7 osvětlení teploměru; 8 trafo k napájení osvětlovacích žárovek; 9 okulár; 10 zaostřovací šroub mikroskopu; 11 nastavení ostrosti zobrazení stupnice teploměru; 12 nastavení sledování části stupnice teploměru; (převzato z literatury¹⁷)

2.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

První zmínky o DSC spadají do roku 1962, větší rozvoj však metoda zaznamenala až v polovině 90. let. V současnosti se jedná o jednu z nejpoužívanějších metod termické analýzy. Pojem termická analýza označuje skupinu metod, které

analyzují změny složení a vlastností látek a jejich směsí působením definovaných teplotních změn, a jejichž výsledky jsou zaznamenávány společně s teplotou¹⁹.

Teplota dosažená v průběhu měření může vést k následujícím změnám vzorku, fázová přeměna (látka změní stávající strukturu na jinou, která je při dané teplotě stabilnější), sublimace, tání a tepelný rozklad¹⁹. Tyto změny vzorku se projeví na výsledné křivce. Pokud se měření pomocí DSC využívá ke sledování směsi látek, může docházet k jejich vzájemným reakcím, které se také projeví změnou na výsledné DSC křivce. Teplotní rozsah, ve kterém je DSC schopná měřit, se pohybuje od -150°C do $+1500^{\circ}\text{C}$ ²⁰.

Vlastnosti látek sledované pomocí DSC jsou entalpie a tepelný tok. Výsledky jsou zaznamenávány prostřednictvím speciálního programu, který je dodáván společně se zařízením. Výstupem metody je DSC křivka, tj. termická křivka závislosti teploty a dodávané energie. Na výsledné křivce jsou patrné exotermní a endotermní píky nebo zlomy, které jsou záznamem exotermních nebo endotermních změn proběhnuvších v měřeném vzorku při dosažení určitých teplot. Záznamy DSC křivek jsou uvedeny v kapitole 3.6 praktické části této práce.

Před vlastním měřením v diferenciálním skenovacím kalorimetru (obrázek 3) se množství zkoumané látky naváží do kovové pánvičky, která se uzavře víčkem. Množství potřebné pro analýzu pomocí DSC se pohybuje v rozmezí 3 až 10 mg²⁰. Navážka látky, upřesněná na šest desetinných míst, se před spuštěním měření zadává do počítačového programu, prostřednictvím kterého se zadávají parametry měření. Vlastní měření je automatizované a řízené počítačovým programem. Měření se nejčastěji provádí v inertní atmosféře dusíku.



Obr. 3 Diferenciální skenovací kalorimetr, DSC Q200 od firmy TA Instruments

Principem metody je porovnávání měřeného vzorku s referenčním vzorkem (prázdná pánvička), které jsou v kalorimetru pozvolna zahřívány v teplotním rozsahu, který je zadán před začátkem měření. Existují dvě možnosti uspořádání kalorimetru: a) DSC s kompenzací příkonu, kde jsou referenční a měřený vzorek umístěny do oddělených teplotních cel, b) DSC s tepelným tokem, kdy jsou obě pánvičky umístěny ve stejné teplotní cele každá na vlastním senzoru. Během vlastního měření jsou přístrojem neustále sledovány teploty referenčního i měřeného vzorku a navzájem porovnávány. Pokud zkoumaná látka reaguje jednou z výše uvedených možností na dosaženou teplotu, projeví se to změnou tepla v měřeném vzorku, tedy vzorek v závislosti na proběhnuvší endotermické nebo exotermické změně odebírá od tepelného zdroje přístroje menší nebo větší množství tepla. Oproti tomu v referenční pánvičce k žádným změnám nedochází. Přístroj zaregistruje změnu v množství dodávané energie nebo tepla mezi vzorky a zaznamená, že při dané teplotě došlo ke změně. Na DSC křivce se tato změna projeví jako energetický pík při dané teplotě.

Po získání záznamu následuje interpretace výsledků, pro kterou je zásadní znalost co největšího množství informací o sledované látce. Často se výsledky porovnávají s výstupy dalších metod jako např. IČ spektroskopie, hmotnostní spektrometrie.

Diferenciální skenovací kalorimetrií jsou studovány tepelné vlastnosti látek a materiálů. Metoda je využívána při výrobě polymerů, plastů, potravin, farmaceutik, skla, keramiky apod¹⁹.

2.4 Chromatografie

Za objevem chromatografie stojí ruský botanik a chemik M. S. Cvět, který v roce 1903 jako první provedl dělení rostlinných barviv na sloupci adsorbentu. Chromatografie je považována za jednu z nejdůležitějších separačních metod. Zásadní úlohu hrála jak historicky, tak také v současnosti má svou významnou úlohu ve zkoumání a identifikaci látek. Během více jak 100 let své existence prošla chromatografie velkým vývojem. Původní metody jednoduché na provedení a nenáročné na vybavení postupně nahradily moderní, počítačem ovládané přístroje.

Rozdělení složek směsi při chromatografii probíhá mezi stacionární (pevnou) a mobilní (pohyblivou) fází. Mobilní fáze protéká skrze stacionární a různou rychlostí

unáší složky dělené směsi právě stacionární fázi. Rychlost s jakou se látka pohybuje v systému obou fází, závisí na její rozdílné afinitě ke stacionární a mobilní fázi.

Stacionární fázi může být pevná látka nebo kapalina. Mobilní fázi může být kapalina nebo plyn. Uspořádání mobilní a stacionární fáze pak může být kapalina-kapalina, kapalina-plyn, pevná látka-plyn, pevná látka-kapalina. Volba konkrétní stacionární a mobilní fáze závisí na charakteru látek, které jsou prostřednictvím chromatografie zpracovávány.

Podstata dělicího procesu závisí na tom, o jaký typ chromatografie se jedná. Chromatografické dělení může probíhat na základě adsorpce, extrakce či rozpouštění, výměny iontů, efektu molekulového síta, specifické vazebné interakce mezi konkrétní stacionární fází a určitým druhem látek^{21,22}. Podstata dělicího procesu je jedním z mnohých kritérií, podle kterých se chromatografické metody mohou dělit. Dalším ze základních kritérií dělení je uspořádání stacionární fáze, pak mluvíme o chromatografii plošné nebo sloupcové. Významné je rozdělení chromatografických metod dle skupenství pohyblivé fáze na chromatografii kapalinovou a plynovou.

2.4.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

K chromatografickému dělení dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je rozprostřen a buď volně nasypán, nebo fixován na vhodné podložce²¹. Tenké vrstvy se připravují v laboratoři nebo je možno připravené desky zakoupit (např. DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄). Princip dělení látek je u tenkovrstvé chromatografie nejčastěji založen na rozdílné adsorpci dělených látek na povrch adsorbentu²³. Kromě adsorpčního principu se tenkovrstvá chromatografie provádí na základě rozdělování či výměny iontů.

Pokud se tenkovrstvá chromatografie využívá k identifikaci látek, sledování průběhu reakcí či ověřování čistoty látek, hovoříme o analytickém provedení TLC. Druhou možností provedení je preparativní TLC, která slouží k rozdělení směsi látek. Uspořádání preparativního a analytického provedení se liší. Při analytickém provedení se nanáší stopy sledovaných látek ve formě bodů na mikroskopická sklička s vrstvou sorbentu, či na chromatografické folie o obdobné velikosti. Pro preparativní účely se využívají chromatografické desky o rozměrech 20 x 20 cm, případně větší. Vrstva adsorbentu může být sypaná nebo litá. Výchozím bodem chromatografického dělení je tenký souvislý proužek koncentrovaného roztoku látek určených k dělení, který je

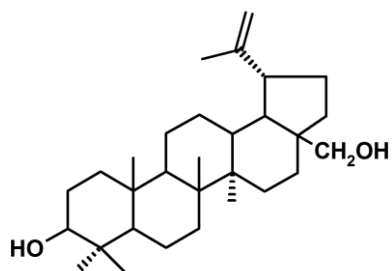
nanesen ve vzdálenosti asi 1 cm od spodního okraje desky. Cílem preparativní TLC je získání látek, proto se po proběhnutém dělení k detekci látek používají nedestruktivní metody. V případě využití metody, která způsobuje změny rozdělených látek, se tato metoda použije pouze na úzký pruh chromatografické desky. Takto znehodnocená část se před dalším zpracováním látek odstraní. Pokud TLC slouží pouze k identifikaci látek, lze na analytickou desku používat metody detekce, při nichž dochází k znehodnocení látky.

Výhody tenkovrstvé chromatografie v preparativním i analytickém provedení jsou minimální spotřeba látek, malá spotřeba rozpouštědel, jednoduchost provedení a minimální nároky na experimentální zařízení.

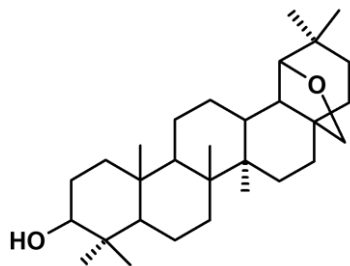
V této kapitole jsou uvedeny pouze základní charakteristiky chromatografie obecně a tenkovrstvé chromatografie, jako důležité metody uplatňující se v praktické části této práce. Podrobnější vzhled do chromatografických metod je zpracován v literatuře²³. Podrobné informace k chromatografickým metodám a jejich konkrétní užití lze najít v literatuře^{18,21,22,24}.

2.5 Triterpeny

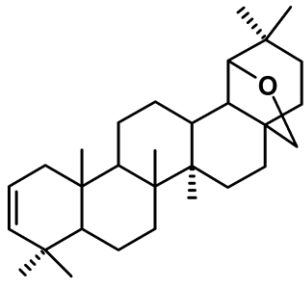
V praktické části této práce jsou využívány betulin, allobetulin a γ -apoallobetulin vzorce viz. obrázky 4, 5 a 6. Všechny tři organické látky patří do skupiny triterpenoidních látek. Charakteristika těchto látek a jejich vznik již byly zpracovány²³.



Obr. 4 Vzorec betulinu



Obr. 5 Vzorec allobetulinu



Obr. 6 Vzorec γ -apoallobetulinu

3. Praktická část

Při zpracování praktické části této práce byly využívány postupy analytické a preparativní tenkovrstvé chromatografie. Přesné návody přípravy, provedení a zpracování TLC jsou podrobně popsány již v literatuře²³, proto v této práci nejsou obsírněji uváděny. Analytické tenkovrstvé chromatografie byly prováděny na chromatografické folii DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄. Pro preparativní uspořádání TLC byl používán silikagel Merck Kieselgel 60 G.

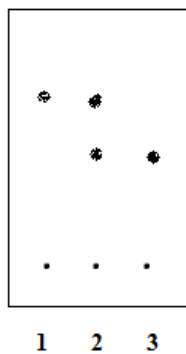
Při práci v laboratoři byla používána mikrovlnná trouba Gallet FMOM 420, výkon 700 W. Pro zkoumání aktivního místa v mikrovlnné troubě byl používán voskovaný papír pro registraci IČ spektra přístrojem UR-20. Bodotávek používaný v laboratoři je uveden na obrázku 2 v kapitole 2.2 teoretické části práce.

3.1 Reakce anilinu a kyseliny octové

Podle bodu 3. zásad pro vypracování diplomové práce byla pro ověření již popsaného experimentu prováděného v mikrovlnné troubě bez zvláštních úprav zvolena reakce anilinu s kyselinou octovou. Reakce anilinu s kyselinou octovou je jednou ze zkoumaných reakcí v literatuře¹⁵. Konečným produktem této reakce je acetanilid.

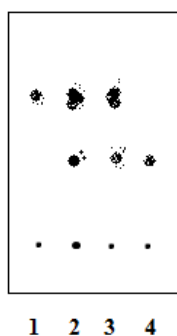
Do tavicího kelímku byl po kapkách navážen anilin a následně kyselina octová. Kelímek s reakční směsí, překrytý malým hodinovým sklíčkem, byl vložen do mikrovlnné trouby na střed otočného talíře. Byl nastaven výkon mikrovlnné trouby a čas. Poté byla mikrovlnná trouba zapnuta, po ukončení zahřívání byl kelímek přenesen na 5 minut do chladničky. Z reakční směsi byl odebrán vzorek pro analytickou TLC. Detekce chromatogramu byla prováděna pomocí UV lampy.

Pro první pokus byl dle vypracovaných experimentů zvolen poměr kyseliny octové a anilinu 120 mg : 90 mg. Kapalný anilin se obtížně vážil a podařilo se ho navážit 111 mg, podle tohoto množství bylo upraveno i množství kyseliny octové na 150 mg tak, aby zůstal zachován poměr reagujících látek. Směs byla zahřívána 5 minut při polovičním výkonu mikrovlnné trouby. Tímto postupem byl získán vzorek A₁. Byla provedena analytická TLC, při níž byl vzorek A₁ porovnán s anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že v reakční směsi zůstalo poměrně velké množství nezreagovaného anilinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 7.



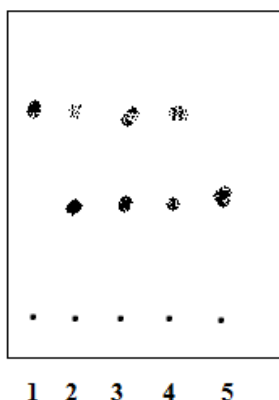
Obr. 7 **Analytická TLC**: 1. anilin, 2. A₁, 3. acetanilid

Dále byl připraven vzorek A₂, u kterého byl oproti vzorku A₁ zvýšen obsah kyseliny octové, poměr anilinu a kyseliny octové 90 mg : 140 mg. Konkrétně bylo naváženo 115,5 mg anilinu a 181,4 mg kyseliny octové. Mikrovlnná trouba byla nastavena na poloviční výkon a směs byla zahřívána 5 minut. Byla provedena analytická TLC, při níž byl vzorek A₂ porovnán se vzorkem A₁, anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že ani zvýšení obsahu kyseliny octové nevedlo k zreagování veškerého anilinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 8.



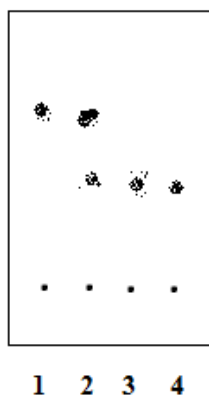
Obr. 8 **Analytická TLC**: 1. anilin, 2. A₁, 3. A₂, 4. acetanilid

Byl připraven vzorek A₃, u kterého byl zachován poměr anilinu a kyseliny octové jako u vzorku A₂, ale reakční doba byla prodloužena na 6 minut při polovičním výkonu mikrovlnné trouby. Konkrétně bylo naváženo 100,6 mg anilinu a 175 mg kyseliny octové. Byla provedena analytická TLC vzorku A₃ společně se vzorkem A₁, vzorkem A₂, anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že všechny tři vzorky obsahovaly nezreagovaný anilin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 9.



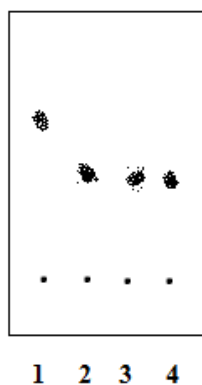
Obr. 9 Analytická TLC: 1. anilin, 2. A₁, 3. A₂, 4. A₃, 5. acetanilid

Byl připraven vzorek A₄. Poměr anilin a kyselina octová byl zvýšen na 90 mg : 160 mg. Konkrétně bylo naváženo 102,1 mg anilinu a 199 mg kyseliny octové. Mikrovlnná trouba byla zapnuta 7 minut na poloviční výkon. Byla provedena analytická TLC vzorku A₄ společně se vzorkem A₃, anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že u vzorku A₄ bylo dosaženo úplného zreagování anilinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 10.



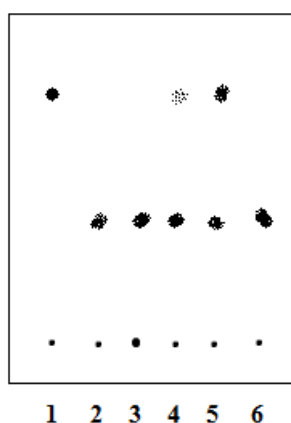
Obr. 10 Analytická TLC: 1. anilin, 2. A₃, 3. A₄, 4. acetanilid

Byl připraven vzorek A₅. Poměr anilin a kyselina octová byl zachován stejný jako u vzorku A₄, konkrétně bylo naváženo 92,8 mg anilinu a 182,2 mg kyseliny octové. Mikrovlnná trouba byla tentokrát nastavena na nejvyšší výkon a zapnuta na 3 minuty. Následně byla provedena analytická TLC vzorku A₅ společně se vzorkem A₄, anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že ani vzorek A₄ ani A₅ neobsahovaly nezreagovaný anilin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 11.



Obr. 11 **Analytická TLC**: 1. anilin, 2. A₄, 3. A₅, 4. acetanilid

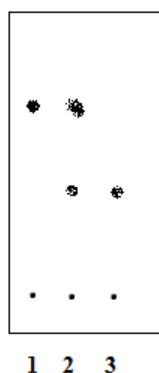
Pro kontrolu byly připraveny vzorky A₆ a A₇. Vzorek A₆ byl proveden za stejných podmínek jako vzorek A₄, konkrétně bylo naváženo 98 mg anilinu a 205,7 mg kyseliny octové. Vzorek A₇ byl proveden za stejných podmínek jako A₅, konkrétně bylo naváženo 90,3 mg anilinu a 172 mg kyseliny octové. Následně byla provedena analytická TLC, při které byly vzorky A₆ a A₇ porovnány se vzorky A₄ a A₅ a s anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Na výsledném chromatogramu byly ve vzorku A₆ znatelné nepatrné stopy nezreagovaného anilinu. Vzorek A₇ obsahoval nezreagovaný anilin ve větší míře než vzorek A₆. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 12.



Obr. 12 **Analytická TLC**: 1. anilin, 2. A₄, 3. A₅, 4. A₆, 5. A₇, 6. acetanilid

Byl připraven vzorek A₈. Pro tento vzorek byla navážena gramová množství reagujících látek, konkrétně 1,0158 g anilinu a 1,8054 g kyseliny octové. Mikrovlnná trouba byla nastavena na poloviční výkon. Předpokládaná doba reakce byla 7 minut, ale

po 1 minutě muselo být zahřívání ukončeno, protože se z reakční směsi začalo silně kouřit. Následně byla provedena analytická TLC vzorku A₈ společně s anilinem a acetanilidem. TLC byla provedena v ethylacetátu. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že ve vzorku A₈ zůstal nezreagovaný anilin. Výsledný chromatogram je zaznamenaný na obrázku 13. Gramová množství reagující směsi byla vyhodnocena jako nevhodná pro zahřívání v mikrovlnné troubě.



Obr. 13 Analytická TLC: 1. anilin, 2. A₈, 3. acetanilid

Podle vypracovaných postupů byl jako optimální vyhodnocen poměr reaktantů 2:1 (kyselina octová: anilin)¹⁵. Pokusy prováděné při zpracování této práce vykazovaly nejlepší výsledky při poměru kyseliny octové a anilinu v poměru 90 mg: 160 mg, tedy poměr 1,7: 1. Zemanová uvádí jako optimální dobu ohřevu 5 minut při středním výkonu mikrovlnné trouby¹⁵. Dle výsledků pokusů uvedených v této práci se jako nejvýhodnější jevila doba 7 minut při polovičním výkonu mikrovlnné trouby. Zemanová také uvádí, že při žádném z pokusů nebylo dosaženo úplného zreagování anilinu na acetanilid. Vzorky A₄ a A₅ však při analýze pomocí TLC nevykazovaly přítomnost nezreagovaného anilinu. Ale při opakování pokusů byl již ve vzorcích A₆ a A₇ ve stopách nezreagovaný anilin přítomný.

Výsledky pokusů prováděných podle již vypracovaného postupu nebyly zcela shodné s výsledky uvedenými dané literatuře. Možným důvodem neshody může být využívání jiné mikrovlnné trouby, díky čemuž nemohlo být dosaženo naprosto stejných podmínek, jako při původních pokusech. Postup zpracovaný v literatuře¹⁵ posloužil k nácviku práce s mikrovlnnou troubou v laboratorních podmínkách.

3.2 Hledání aktivního místa v mikrovlnné troubě

Během provádění pokusů s mikrovlnnou troubou bylo zjištěno, že intenzita mikrovlnného pole není ve všech místech mikrovlnné trouby stejná. Tomu odpovídají také informace uvedené v kapitole 2.1.4 této práce. Při použití otočného talíře se nedosáhlo ideálního působení mikrovln na vkládaný vzorek. Proto bylo přistoupeno ke hledání místa, do něhož se soustředí mikrovlny při vyjmutí otočného talíře.

Na keramickou dlaždici (rozměry 20 x 25 cm) byl přilepen voskovaný papír (registrační papír k spektrofotometru UR-20). Takto pokrytá dlaždice byla následně umístována v různé výšce do prostoru mikrovlnné trouby. V místech, kam směřovaly mikrovlny, docházelo k roztátí vosku, který byl na papíru nanesen.

Z mikrovlnné trouby byl vyňat otočný talíř a na dno mikrovlnné trouby byly rovnoměrně rozloženy tři petriho misky, které vymezily polohu keramické dlaždice do výše vyjmutého otočného talíře. Na ně byla položena keramická dlaždice potažená voskovaným papírem. Na dvě minuty byla mikrovlnná trouba zapnuta na plný výkon. Po vyjmutí keramické dlaždice z mikrovlnné trouby nebyla na voskovaném papíru zaznamenána žádná změna.

Následně byly petriho misky vyměněny za tři 50 ml kádinky, na které byla položena keramická dlaždice potažená voskovaným papírem. V tomto případě byl povrch dlaždice ve výšce 6 cm. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na dvě minuty na plný výkon. Po vyjmutí keramické dlaždice bylo na voskovaném papíru zaznamenáno několik skvrn, viz obrázek 14. Skvrny, které značily směřování mikrovln, byly lokalizovány na okrajích keramické dlaždice. Pro následné využití by toto umístění nebylo vhodné.



Obr. 14 Hledání aktivního místa, výška 6 cm

Místo malých kádinek byly do mikrovlnné trouby rozmístěny tři keramické kelímky. Vložená keramická dlaždice byla tentokrát umístěna ve výšce 3,8 cm. Mikrovlnná trouba byla nastavena na maximální výkon na dvě minuty. Po vyjmutí keramické dlaždice z mikrovlnné trouby bylo na voskovaném papíru patrně několik skvrn, viz obrázek 15. Nejvýraznější skvrna byla umístěna ve středu keramické dlaždice přímo nad místem, kde by se nacházel střed otočného talíře.



Obr. 15 Hledání aktivního místa, výška 3,8 cm

Po tomto pokusu byly keramické kelímky vyměněny za nižší. Vložená keramická dlaždice byla umístěna ve výšce 3 cm. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na plný výkon. Na vyjmuté keramické dlaždici bylo několik roztavených skvrn, viz obrázek 16.



Obr. 16 Hledání aktivního místa, výška 3 cm

Po vyhodnocení se jako nejvýhodnější jeví umístění keramické dlaždice do výšky 3,8 cm. Při tomto umístění byly mikrovlny soustředěny ve středu dlaždice přímo nad středem mikrovlnné trouby.

Při umístění ve výšce 3,8 cm byla keramická dlaždice ještě jednou umístěna do mikrovlnné trouby. Tentokrát keramická dlaždice přiléhala k zadní stěně mikrovlnné trouby, po obou stranách bylo ponecháno přibližně stejně velké volné místo. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na dvě minuty na plný výkon. Po otevření dvířek byla změřena vzdálenost nejvýraznější skvrny od stěn mikrovlnné trouby. Zjištěné hodnoty soustředění mikrovln byly 12 cm od pravé stěny mikrovlnné trouby, 14,5 cm od levé stěny a 17 cm od zadní stěny (viz obrázek 17). Po sejmutí voskovaného papíru byla na keramické dlaždici vyznačena vyměřená oblast a takto označená dlaždice byla používána při dalších pokusech.



Obr. 17 **Soustředění mikrovln**

Pro zkoumání byla vyzkoušena také menší keramická dlaždice (rozměry 10 x 10 cm), ale ta se ukázala jako nevýhodná. Při zapnutí mikrovlnné trouby docházelo ke žhavení jednoho z keramických kelímků, které byly použity k podložení keramické dlaždice. Tento efekt byl eliminován, když došlo k úplnému zakrytí dna mikrovlnné trouby. Zjištěný efekt žhavení keramického kelímku byl zřejmě způsoben silným soustředěním mikrovln do toho místa.

V literatuře^{6,16} jsou popsány obdobné postupy, které však pro zjišťování mikrovlnného pole využívají faxový papír.

3.3 Reakce betulinu s měděným práškem

Molekula betulinu (obrázek 4) obsahuje hydroxylové skupiny, u kterých se dá předpokládat dehydrogenace. Měděný prášek byl zvolen jako činidlo, jehož účinkem by mohlo být dosaženo přeměny alkoholové skupiny na ketoskupinu. Následně byly

provedeny reakce pro potvrzení nebo vyvrácení předpokládaného následku reakce betulinu a měděného prášku.

Bylo naváženo 200 mg betulinu a 200 mg měděného prášku, obě látky byly společně protřepány v lékovce tak, aby vznikla homogenní směs.

3.3.1 Reakce betulinu a měděného prášku na bodotávku

Z připravené směsi bylo odebráno malé množství na zjištění bodu tání směsi. Směs betulinu a měděného prášku byla dána mezi dvě krycí sklička a vložena na bodotávek. Teplota zahřívání byla zvolna zvyšována a během celé doby byly sledovány změny zahřívání směsi. Při teplotě 247°C došlo k roztátí betulinu (teplota tání samotného betulinu byla změřena 256°C, betulin ve směsi vykazoval nižší teplotu tání). Směs byla dále zahřívána až k teplotě 270°C. Při této teplotě byla směs udržována 10 minut. Tímto postupem byl získán vzorek B₁.

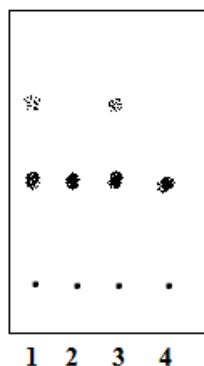
Po ukončení zahřívání byl vzorek B₁ porovnán prostřednictvím analytické TLC s výchozím betulinem, který byl použit k přípravě směsi. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Po detekci bylo zjištěno, že k reakci nedošlo.

3.3.2 Zahřívání směsi betulinu a měděného prášku v mikrovlnné troubě

Z připravené směsi betulinu a měděného prášku bylo do šamotové misky odváženo 20 mg. Šamotová miska byla umístěna do mikrovlnné trouby na střed otočného talíře. Mikrovlnná trouba byla nastavena na poloviční výkon a spuštěna na 30 sekund. Po této době nebyly na směsi patrné žádné změny, proto bylo pokračováno v zahřívání. Po minutových intervalech byla směs zahřívána celkem 4,5 minuty při polovičním výkonu mikrovlnné trouby, aniž by došlo k nějakým změnám. Mikrovlnná trouba tedy byla nastavena na plný výkon a směs byla opět po minutových intervalech zahřívána dalších 10 minut, aniž by došlo k patrným změnám.

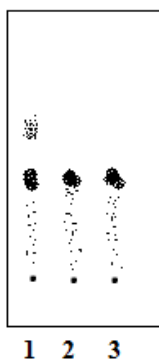
Směs byla ze šamotové misky vysypána na petriho misku, která byla umístěna na středu otočného talíře do větší výšky. Následně byla mikrovlnná trouba nastavena na poloviční výkon a zapnuta na 1 minutu, zahříváním byl získán vzorek B₂. Po vyjmutí petriho misky z mikrovlnné trouby bylo zjištěno, že část směsi zůstala bez viditelných změn (B_{2/1}) a část směsi reagovala (B_{2/2}, došlo k zčernání směsi). Reagující a nezreagovaná část byly opatrně odděleny a následně porovnány pomocí analytické TLC. Na chromatografickou folii byly střídavě naneseny vzorky B_{2/1} a B_{2/2}. TLC byla

provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že u vzorku B_{2/2} došlo ke vzniku pohyblivějších látek než je betulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 18.



Obr. 18 Analytická TLC: 1. B_{2/2}, 2. B_{2/1}, 3. B_{2/2}, 4. B_{2/1}

Vzorky B_{2/1} a B_{2/2} byly následně pomocí analytické TLC porovnány s výchozí nezahřívanou směsí. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek B_{2/1} zůstal stejný jako výchozí směs betulinu a měděného prášku. Oproti tomu ve vzorku B_{2/2} došlo při zahřívání ke zreagování části betulinu, na výsledném chromatogramu byly patrné stopy pohyblivějších látek než je betulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 19.



Obr. 19 Analytická TLC: 1. B_{2/2}, 2. B_{2/1}, 3. směs betulinu a měděného prášku

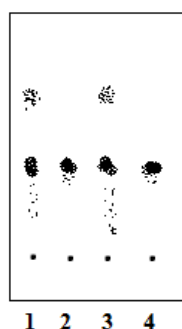
Vzhledem k pozorovanému jevu, kdy došlo k reakci pouze v části zahřívání směsi, bylo přistoupeno ke zkoumání mikrovlnného pole mikrovlnné trouby, postup je popsán v kapitole 3.2. Po nalezení ideálního místa se soustředěním mikrovln bylo pokračováno v pokusech se směsí betulinu a měděného prášku.

Do šamotové misky bylo naváženo 100 mg směsi betulinu a měděného prášku. Miska byla vložena do mikrovlnné trouby tak, aby polovina misky byla v místě soustředění mikrovln a druhá polovina v místech, kam mikrovlny nedopadají. Mikrovlnná trouba byla nastavena na plný výkon. Po 30 sekundách zahřívání nedošlo k žádným změnám reakční směsi, proto bylo pokračováno v zahřívání. Po dalších 30 sekundách začaly ze směsi vylétávat jiskry a mikrovlnná trouba byla vypnuta. Po vyjmutí z mikrovlnné trouby byla část směsi, která byla v místě soustředění mikrovln, zreagovaná (B_{3/1}), druhá polovina směsi byla beze změn (B_{3/2}), viz obrázek 20.



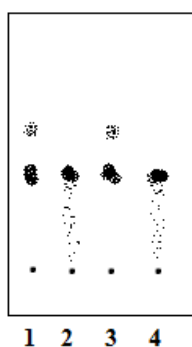
Obr. 20 Směs betulinu a měděného prášku po zahřívání v mikrovlnné troubě

Následně byla provedena analytická TLC, při níž byly navzájem porovnány vzorky B_{3/1} a B_{3/2}. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že u vzorku B_{3/1} došlo ke zreagování části betulinu na pohyblivější látku. Vzorek B_{3/2} tuto pohyblivější látku neobsahoval, na chromatogramu byla patrna pouze stopa betulinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 21.



Obr. 21 Analytická TLC: 1. B_{3/1}, 2. B_{3/2}, 3. B_{3/1}, 4. B_{3/2}

Šamotová miska, na níž bylo naváženo 20 mg směsi betulinu a měděného prášku, byla vložena do mikrovlnné trouby do místa soustředění mikrovln. Mikrovlnná trouba byla nastavena na poloviční výkon. Směs byla po minutových intervalech zahřívána celkem 9 minut, tímto postupem byl získán vzorek B₄. Následně byla provedena analytická TLC, při níž byl vzorek B₄ porovnán se vzorkem B_{3/1}. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že u vzorku B₄ nedošlo k žádným změnám, na chromatogramu byla patrna pouze stopa betulinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 22.



Obr. 22 **Analytická TLC:** 1. B_{3/1}, 2. B₄, 3. B_{3/1}, 4. B₄

Do šamotové misky bylo naváženo 20 mg směsi betulinu a měděného prášku. Miska byla dána do mikrovlnné trouby, která byla nastavena na plný výkon. Časovač mikrovlnné trouby byl nastaven na 2 minuty, ale po půl minutě muselo být zahřívání ukončeno, protože ze směsi začaly létat jiskry.

Výsledky provedených pokusů ukázaly, že zahřívání betulinu s měděným práškem v mikrovlnné troubě nelze provádět. Při vyšším nastavení mikrovlnné trouby docházelo k tvorbě jisker a nemohlo být pokračováno v zahřívání. Při polovičním výkonu mikrovlnné trouby bylo zahřívání směsi časově příliš náročné s žádnými nebo nepatrnými výtěžky reakce. Reakce na bodotávku také neposkytovaly dobré výsledky.

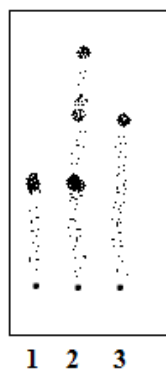
3.4 Reakce betulinu s KHSO₄

Pro přípravu allobetulinu z betulinu se používá dlouhodobá reakce s kyselinou mravenčí za varu a následná přeměna vzniklého allobetulinformiátu reakcí a alkoholickým roztokem hydroxidu sodného za varu. Protože základem přeměny je reakce lupenového skeletu v kyselém prostředí, byly prováděny experimenty, při

kterých byl zahříván betulin s hydrogensíranem draselným na teplotu tání. Pro úpravu pokusu byly využity dvě metody. V první byla k zahřátí vzorku využívána mikrovlnná trouba a ve druhé lázeň KHSO_4 . Prvotní pokusy byly prováděny na bodotávku kvůli zjištění chování směsi betulinu a KHSO_4 v závislosti na teplotních podmínkách působících během reakce těchto dvou látek.

3.4.1 Zahřívání směsi betulinu a KHSO_4 na bodotávku

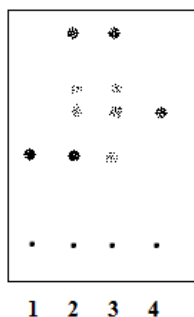
Nejprve byla připravena směs betulinu s KHSO_4 v poměru 1:1. Vzorek této směsi byl využit ke zpracování na bodotávku. Směs byla vložena mezi dvě krycí sklíčka. Poté byla směs zahřívána na bodotávku. Při 205°C začala směs tát, v rozmezí 230 až 240°C došlo k roztátí celého vzorku. Směs byla na bodotávku ponechána k vychladnutí – vzorek K_1 . Po sejmutí z bodotávku byla provedena analytická TLC vzorku K_1 . Vzorek K_1 byl porovnán s čistým betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K_1 obsahoval jak betulin tak allobetulin. Navíc se na chromatogramu objevily stopy dvou pohyblivějších látek než je betulin a allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 23.



Obr. 23 Analytická TLC: 1. betulin, 2. K_1 , 3. allobetulin

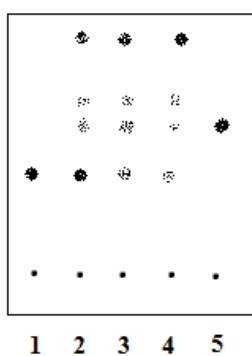
Směs betulinu a KHSO_4 byla zahřáta na bodotávku na 210°C . Betulin se rozpustil v roztátém KHSO_4 . Rozpuštěná směs byla následně 15 minut udržována v rozmezí 210°C až 215°C – vzorek K_2 . Po sejmutí z bodotávku a vychladnutí byla provedena analytická TLC vzorku K_2 . Vzorek K_2 byl porovnán s čistým betulinem, allobetulinem a vzorkem K_1 . TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K_2 obsahuje betulin a allobetulin. Také se ukázalo, že se při delším zahřívání podařilo výtěžnost mírně

posunout směrem k více pohyblivým látkám, než jak tomu bylo u vzorku K₁. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 24.



Obr. 24 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. K₁, 3. K₂, 4. allobetulin

Směs betulinu a KHSO₄ byla zahřáta na bodotávku na 210°C a tato teplota byla nadále udržována 25 minut – vzorek K₃. Po sejmutí z bodotávku a vychladnutí byla provedena analytická TLC. Vzorek K₃ byl porovnán s čistým betulinem, allobetulinem a vzorky K₁ a K₂. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K₃ obsahuje v malém míře betulin, stopy allobetulinu a další pohyblivější látky. V rámci srovnání se vzorky K₁ a K₂ bylo patrné, že všechny tři vzorky obsahují jak betulin a allobetulin, tak také další pohyblivější látky. Prodlužování reakční doby zahřívání betulinu s KHSO₄ vedlo v malé míře k posunu výtěžků směrem k pohyblivějším látkám než je betulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 25.

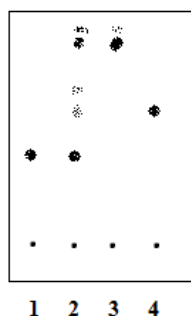


Obr. 25 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. K₁, 3. K₂, 4. K₃, 5. allobetulin

Ke směsi betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1 bylo přidáno stejné objemové množství KHSO₄. Takto připravená směs se zvýšeným obsahem KHSO₄ byla zahřáta na

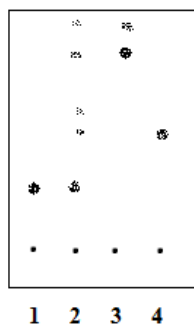
bodotávku na 240°C a poté byla směs ponechána na bodotávku do vychladnutí – vzorek K₄. Následně byly provedeny tři analytické TLC.

Nejprve byl vzorek K₄ porovnán s betulinem, allobetulinem a se vzorkem K₁, který byl proveden za stejných teplotních podmínek. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 26.



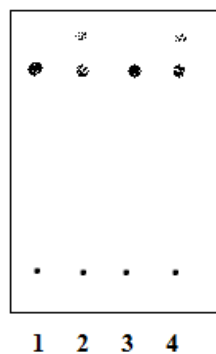
Obr. 26 Analytická TLC: 1. betulin, 2. K₁, 3. K₄, 4. allobetulin

Dále byl vzorek K₄ opět porovnán s betulinem, allobetulinem a vzorkem K₁, ale TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 27.



Obr. 27 Analytická TLC: 1. betulin, 2. K₁, 3. K₄, 4. allobetulin

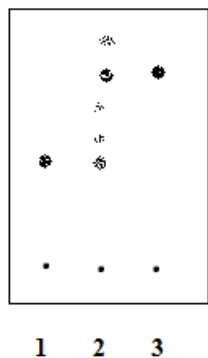
Vzorek K₄ byl v závislosti na výsledcích předchozích dvou analytických TLC porovnán ještě s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 28.



Obr. 28 **Analytická TLC:** 1. γ -apoallobetulin, 2. K_4 , 3. γ -apoallobetulin, 4. K_4

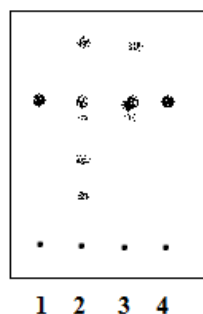
Z výsledných chromatogramů bylo patrné, že u vzorku K_4 došlo ke zreagování veškerého betulinu za vzniku γ -apoallobetulinu. Při porovnání vzorků K_1 a K_4 bylo zjištěno, že zvýšením podílu $KHSO_4$ ve výchozí směsi vedlo u vzorku K_4 k lepšímu zreagování betulinu na jeho produkty.

Byla provedena ještě kontrolní analytická TLC vzorku K_2 společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3. Z výsledného chromatogramu bylo určeno, že jedna z pohyblivějších látek ve vzorku K_2 byl γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 29.



Obr. 29 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. K_2 , 3. γ -apoallobetulin

Vzorky K_3 a K_4 byly společně porovnány s γ -apoallobetulinem. Analytická TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:1. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že oba vzorky obsahovaly γ -apoallobetulin. Ale vzorek K_4 obsahoval γ -apoallobetulin znečištěný pouze malým množstvím více pohyblivé látky, kdežto ve vzorku K_3 byly obsaženy v poměrně velkém podílu ještě betulin a allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 30.



Obr. 30 Analytická TLC: 1. γ -apoallobetulin, 2. K_3 , 3. K_4 , 4. γ -apoallobetulin

Směs se zvýšeným obsahem $KHSO_4$ poskytovala lepší výsledky než směs v poměru 1:1. Lepší výsledky byly také získány při dosažení dostatečně vysoké teploty a při dostatečně dlouhé době, při níž látky reagovaly.

3.4.2 Zahřívání směsi betulinu a $KHSO_4$ v mikrovlnné troubě

Podle výsledků získaných ze zahřívání směsi betulinu a $KHSO_4$ na bodotávku byly stanoveny podmínky pro provedení reakce v mikrovlnné troubě. Pro pokusy byla vybrána směs betulinu a $KHSO_4$ se zvýšeným obsahem $KHSO_4$, u níž docházelo k lepšímu zreagování obou látek, než při reakci směsi v poměru 1:1. Byla připravena směs obsahující 57,5 mg betulinu a 307,5 mg $KHSO_4$.

Do tavicího kelímku bylo odebráno 40 mg směsi se zvýšeným obsahem $KHSO_4$. Kelímek byl vložen do mikrovlnné trouby na místo s maximálním soustředěním mikrovln dle zkoumání provedených v kapitole 3.2 této práce. Mikrovlnná trouba byla nastavena na poloviční výkon a zapnuta na 3 minuty. Po uplynutí 1 minuty začala směs v kelímku jiskřit a mikrovlnná trouba musela být vypnuta. Po vyjmutí kelímku z mikrovlnné trouby bylo zjištěno, že došlo ke spálení vložené směsi.

Při dalším pokusu bylo do tavicího kelímku odebráno 62,3 mg směsi se zvýšeným obsahem $KHSO_4$. Tavicí kelímek byl umístěn do mikrovlnné trouby nastavené na nejnižší výkon. V několika krocích byla směs betulinu a $KHSO_4$ zahřívána celkově 9 minut bez zjevných změn směsi. Proto byl výkon mikrovlnné trouby zvýšen na M.LOW a dále opět v několika krocích pokračovalo zahřívání 5 minut. Ani po této době nedošlo ke kýženým změnám vzorku. Bylo dosaženo pouze mírného spálení zahřívání směsi, viz obrázek 31.



Obr. 31 Směs betulinu a KHSO_4 po zahřívání v mikrovlnné troubě

Na základně provedených pokusů bylo využití mikrovlnné trouby pro provádění reakce betulinu s KHSO_4 vyhodnoceno jako nevhodné. Mikrovlnnou troubu nelze v rámci tohoto pokusu použít.

3.4.3 Zahřívání směsi betulinu a KHSO_4 v lázni KHSO_4

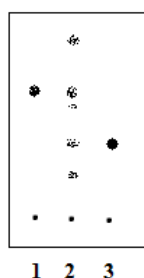
Po neúspěšných pokusech s mikrovlnnou troubou byla pro provádění následujících pokusů zvolena lázeň KHSO_4 zahřívána nad elektrickým vaříčem. Byla sestavena aparatura podle obrázku 32. Větší zkumavka byla z části naplněna krystalickým KHSO_4 . Ten při zahřátí nad teplotu kolem 190°C začal tát a následně zahříval a udržoval teplotu ve zkumavce obsahující reakční směs betulinu a KHSO_4 . Do zkumavky se směsí betulinu a KHSO_4 byl vložen teploměr, pomocí něhož byla sledována teplota reakce. Teplota byla regulována prostřednictvím přidávání a ubírání teploty na elektrickém vaříči. Zkumavka se zreagovanou směsí betulinu a KHSO_4 musela být z lázně vyjmuta ihned po ukončení zahřívání. Při chladnutí KHSO_4 dochází k jeho tuhnutí a vzniká jednolitá pevná hmota.



Obr. 32 **Aparatura pro zahřívání v tavenině KHSO₄**, 1 zkumavka s KHSO₄; 2 elektrický vaříč; 3 držák na zkumavky; 4 stojan; 5 teploměr ve zkumavce se směsí betulinu a KHSO₄

3.4.3.1 Příprava vzorků K₅ a K₆

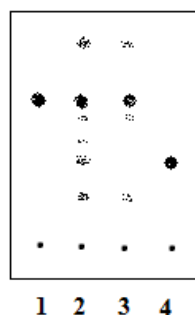
Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 110 mg a 110 mg. Tato směs byla dána do malé zkumavky a vložena do lázně z KHSO₄. Směs byla následně zahřívána, teplota nejprve vystoupala na 230°C a poté byla 25 minut udržována v rozmezí 190°C a 210°C. Tímto postupem byl získán vzorek K₅. Vzorek byl pomocí analytické TLC porovnán se vzorky γ -apoallobetulinu a allobetulinu. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:1. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že při reakci došlo k přeměně převážné části betulinu na allobetulin, γ -apoallobetulin a na další pohyblivější látku, než je γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 33. Přeměna betulinu na jeho deriváty nebyla úplná, proto bylo přistoupeno k dalšímu zkoumání se změnou reakčních podmínek.



Obr. 33 **Analytická TLC**: 1. γ -apoallobetulin, 2. K₅, 3. allobetulin

Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 100 mg a 100 mg. K ní bylo přidáno stejné objemové množství KHSO₄ jako byl objem směsi (směs se zvýšeným obsahem KHSO₄). Tato směs byla dána do malé zkumavky a vložena do lázně z KHSO₄. Směs byla ve zkumavce následně zahřívána. Teplota vystoupala na 240°C a poté byla 5 minut udržována na 230°C. Po ukončení zahřívání byla zkumavka se směsí vyjmuta z lázně KHSO₄. Tímto způsobem byl získán vzorek K₆. Vzorek K₆ byl porovnán pomocí analytické TLC se vzorkem K₅, allobetulinem a γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:1. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že u vzorku K₆ došlo k lepšímu zreagování výchozího

betulinu na γ -apoallobetulin, téměř beze stop allobetulinu. Oproti tomu ve vzorku K₅ byly jasně patrné stopy jak γ -apoallobetulinu tak allobetulinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 34.



Obr. 34 **Analytická TLC:** 1. γ -apoallobetulin, 2. K₅, 3. K₆, 4. allobetulin

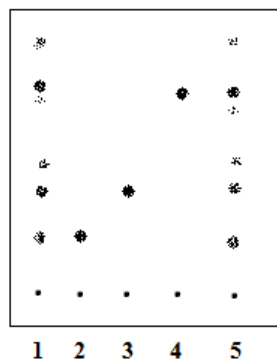
Lepší výsledky byly dosaženy u vzorku K₆, u nějž byla jako výchozí využita směs se zvýšeným obsahem KHSO₄.

3.4.3.2 Příprava vzorků K₇ a K₈ pro preparativní TLC

Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 100 mg a 100 mg. Tato směs byla dána do malé zkumavky, která byla vložena do lázně z KHSO₄. Směs reagovala za stejných teplotních podmínek, jaké byly nastaveny u vzorku K₅, tedy 190°C až 210°C po dobu 25 minut. K opakování pokusu bylo přistoupeno, aby byly známy výchozí podmínky – výchozí hmotnost reagujícího betulinu a výchozí množství reagujícího KHSO₄. Tyto údaje byly důležité pro další zpracování vzorku K₇.

Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 100,7 mg a 100,7 mg. K této směsi bylo přidáno stejné objemové množství KHSO₄ jako byl objem připravené směsi (směs se zvýšeným obsahem KHSO₄). Tato směs byla dána do malé zkumavky, v níž byla vložena do lázně z KHSO₄. Směs byla vyhřátá na 235°C a poté vyjmuta z lázně KHSO₄. tímto postupem byl získán vzorek K₈.

Ze vzorků K₇ a K₈ bylo odebráno malé množství na analytickou TLC. Vzorky byly porovnány s betulinem, allobetulinem a γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že při dosažení vyšší teploty a při zvýšení obsahu KHSO₄ v reakční směsi u vzorku K₈ bylo dosaženo výraznějšího zreagování na γ -apoallobetulin než na allobetulin. Také bylo patrné, že oba vzorky obsahují stejné látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázek 35.



Obr. 35 Analytická TLC: 1. K₇, 2. betulin, 3. allobetulin, 4. γ -apoallobetulin, 5. K₈

3.4.3.3 Zpracování produktů tavení vzorků K₇ a K₈ pomocí preparativní TLC

Vzorek K₇ ve formě taveniny, která vznikla zahříváním betulinu s KHSO₄, byl znovu roztaven a vylit a na keramickou dlaždici pokrytou alobalem. Tavenina rychle tuhla a bylo nutné zahřívání několikrát opakovat, než se podařilo vylít značnou část taveniny. Tavenina byla z alobalu přendána do třecí misky a rozetřena. Poté byl prášek nasypán zpět do původní zkumavky se zbývající taveninou. Do zkumavky byly přility asi 2 ml chloroformu, v němž se rozpustila organická část taveniny vzorku. V roztoku zůstala nerozpouštěná anorganická část vzorku, tedy KHSO₄. Na kapilární konec balonku byl natočen malý kousek vaty, ten sloužil jako filtr při následujícím nasávání roztoku do balonku. Balonek byl mírně nahřátý nad elektrickým vařičem a poté byl kapilární konec obalený vatou vložen do roztoku organických látek. Došlo k nasátí roztoku do balonku. Poté byla vata z balonku odstraněna a roztok byl z balonku vypuštěn do zvážené zkumavky. Původní zkumavka se zbylým KHSO₄ byla vypláchnuta dalším 1 ml chloroformu, který byl poté také nasát do balonku a vypuštěn do zvážené zkumavky. Chloroform byl ze zkumavky oddestilován a po vychladnutí byla zkumavka se vzorkem K₇ opět zvážena. Stejný postup byl zvolen pro taveninu vzorku K₈.

Při přenášení vzorků balonkem z původní zkumavky došlo k mírným ztrátám vzorku. Nepatrná část roztoku zůstala nasáknutá ve vatě, která byla na kapilárním konci balonku. Část organických látek zůstala v tavenině KHSO₄ a nepodařilo se ji rozpustit v chloroformu.

Tabulka 1 Hmotnost vzorků K₇ a K₈

	Hmotnost zkumavky	Hmotnost zkumavky se vzorkem	Hmotnost vzorku

Vzorek K ₇	5,3117 g	5,3947 g	0,0830 g
Vzorek K ₈	6,0417 g	6,1106 g	0,0689 g

Následně byl vzorek K₇ rozpuštěn přibližně v 1 ml chloroformu. Roztok byl nasátý do balonku, ze kterého byl nanesen na preparativní TLC desku. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3 třikrát za sebou. Jednotlivá vyvíjení byla mezi sebou oddělena dostatečnými intervaly, během nichž došlo k odpaření rozpouštědel z preparativní TLC desky. Pro každé vyvíjení byla připravena nová směs rozpouštědel, aby se zajistilo jejich stálé složení.

Také vzorek K₈ byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a za pomoci balonku byl nanesen na preparativní TLC desku. TLC byla vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3 třikrát za sebou.

Po odpaření rozpouštědel použitých k vyvíjení byla u obou desek provedena detekce organických látek. Na levé i pravé straně byl na TLC desku přiložen elektricky žhavený odporový drát, díky kterému došlo k vypálení stop v místě přítomnosti organických látek. Podle vypálených stop byly TLC desky rozděleny každá na šest částí. Zóny nejdále od startu byly označeny K_{7/6} a K_{8/6}. Zóny s látkami zůstávajícími na startu byly označeny K_{7/1} a K_{8/1}. Silikagel z desek byl postupně, podle oddělených částí, ze skleněné desky sejmuto a pečlivě rozmělněn. Každá část byla nasypána do skleněné trubice, která byla na spodním konci utěsněna kouskem vaty. Silikagel byl do trubic přidáván po částech, po každém přidání podílu bylo trubicí několikrát poklepáno o podložku, aby došlo k utěsnění silikagelu.

Naplněné trubice byly upevněny pomocí držáků na zkumavky ke stojanům. Pod každou trubicí byla dána zvážená baňka s varným kamínkem. Poté bylo do každé trubice nalito 25 až 30 ml směsi rozpouštědel n-hexanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Rozpouštědla proteklá sloupcem silikagelu byla zachycena do zvážených baněk. Byly získány frakce K_{7/1} až K_{7/6} a frakce K_{8/1} až K_{8/6}. Baňky s roztoky frakcí vzorků K₇ a K₈ byly postupně zahřívány v topném hnízdě a byla z nich oddestilována směs rozpouštědel. Baňky byly ponechány dva dny na vzduchu, aby látky v nich zcela vyschly, a poté byly baňky opět zváženy.

Tabulka 2 Preparativní TLC vzorku K₇

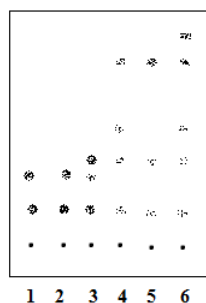
Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
K _{7/1}	45,2388 g	45,2547 g	0,0159 g
K _{7/2}	57,4278 g	57,4402 g	0,0124 g

K _{7/3}	59,8198 g	59,8286 g	0,0088 g
K _{7/4}	56,8149 g	55,8346 g	0,0197 g
K _{7/5}	56,0640 g	56,0673 g	0,0033 g
K _{7/6}	58,0916 g	58,0991 g	0,0075 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0676 g

Tabulka 3 Preparativní TLC vzorku K₈

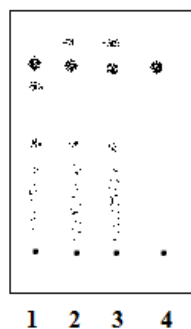
Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
K _{8/1}	42,3982 g	42,9621 g	0,0090 g
K _{8/2}	42,8686 g	43,2118 g	0,0101 g
K _{8/3}	57,6818 g	58,0639 g	0,0258 g
K _{8/4}	55,7771 g	55,9406 g	0,0075 g
K _{8/5}	57,7816 g	58,2875 g	0,0048 g
K _{8/6}	55,0265 g	55,2092 g	0,0042 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0614 g

Byla provedena analytická TLC získaných frakcí K_{7/1} až K_{7/6}. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorky K_{7/4}, K_{7/5} a K_{7/6} obsahovaly pohyblivější látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 36.



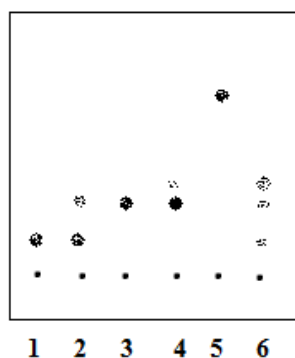
Obr. 36 Analytická TLC: 1. K_{7/1}, 2. K_{7/2}, 3. K_{7/3}, 4. K_{7/4}, 5. K_{7/5}, 6. K_{7/6}

Byla provedena analytická TLC frakcí K_{7/4}, K_{7/5} a K_{7/6}, při níž byly frakce porovnány s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že všechny tři frakce obsahovaly γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 37.



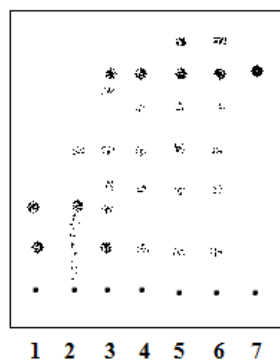
Obr. 37 **Analytická TLC:** 1. K_{7/4}, 2. K_{7/5}, 3. K_{7/6}, 4. γ -apoallobetulin

Byla provedena analytická TLC frakcí K_{7/1}, K_{7/2} a K_{7/3}, při níž byly frakce porovnány s betulinem, allobetulinem a γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že ani jedna z frakcí neobsahovala γ -apoallobetulin. Frakce K_{7/1} obsahovala betulin a frakce K_{7/2} a K_{7/3} obsahovaly jak betulin tak allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 38.



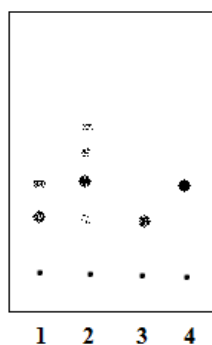
Obr. 38 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. K_{7/1}, 3. allobetulin, 4. K_{7/2}, 5. γ -apoallobetulin, 6. K_{7/3}

Byla provedena analytická TLC frakcí K_{8/1} až K_{8/6} společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce K_{8/3} až K_{8/6} obsahovaly γ -apoallobetulin. Frakce K_{8/5} a K_{8/6} obsahovaly ještě další pohyblivější látku, než je γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 39.



Obr. 39 **Analytická TLC:** 1. $K_{8/1}$, 2. $K_{8/2}$, 3. $K_{8/3}$, 4. $K_{8/4}$, 5. $K_{8/5}$, 6. $K_{8/6}$, 7. γ -apoallobetulin

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{8/1}$ a $K_{8/2}$, při níž byly frakce porovnány s betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že obě frakce obsahovaly jak betulin tak allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 40.



Obr. 40 **Analytická TLC:** 1. $K_{8/1}$, 2. $K_{8/2}$, 3. betulin, 4. allobetulin

Podle výsledků analytických TLC bylo přistoupeno ke spojení všech frakcí, které obsahovaly γ -apoallobetulin. Frakce $K_{7/4}$ až $K_{7/6}$ a frakce $K_{8/3}$ až $K_{8/6}$ byly rozpuštěny v chloroformu a slity do společné předem zvážené baňky. Jejich spojením vznikl vzorek $K_{\gamma 1}$. Z baňky byl oddestilován chloroform a baňka byla po vychladnutí a vyschnutí znovu zvážena. Zbývající frakce $K_{7/1}$ až $K_{7/3}$ a $K_{8/1}$ a $K_{8/2}$ byly stejným postupem také spojeny a vznikl vzorek $K_{bet, alo}$.

Tabulka 4 **Hmotnost vzorků $K_{\gamma 1}$ a $K_{bet, alo}$**

Vzorek	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost vzorku
$K_{\gamma 1}$	57,8970 g	57,9616 g	0,0728 g

K _{bet,alo}	57,4369 g	57,4935 g	0,0566 g
----------------------	-----------	-----------	----------

K zahřívání v tavenině KHSO₄ bylo celkem z obou vzorků K₇ a K₈ vzato 200,7 mg organických látek. Na preparativní TLC desky bylo nanášeno dohromady 151,9 mg organických látek. Z provedené preparativní TLC bylo získáno 129 mg organických látek, z toho bylo 72,8 mg ve frakcích obsahujících γ -apoallobetulin. Výtěžek postupu vzhledem k získaným frakcím s γ -apoallobetulinem byl 37,3%.

3.4.3.3.1 Preparativní TLC vzorku K γ_1

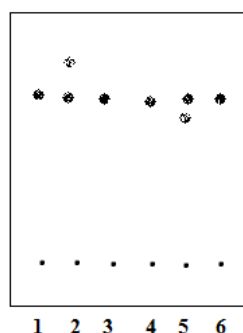
Vzorek K γ_1 byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a nasát do balonku. Pomocí balonku byl vzorek nanášen na preparativní TLC desku. TLC byla vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Po vyschnutí rozpouštědel byla provedena detekce organických látek pomocí elektricky žhaveného odporového drátu. Poté byla deska rozdělena na devět částí. Oblast s předpokládaným výskytem γ -apoallobetulinu byla záměrně rozdělena na několik menších částí. Záměrem bylo získat vzorek čistého γ -apoallobetulinu. Zóna nejbližší startu byla označena K $\gamma_{1/9}$ a zóna nejbližší čelu rozpouštědel byla označena K $\gamma_{1/1}$.

Každá část silikagelu byla sejmuta z desky, rozmělněna a po částech nasypána do skleněné trubice, která byla na spodním konci utěsněna kouskem vaty. Trubice byly následně pomocí držáků na zkumavky upevněny se stojanům. Pod každou trubicí byla umístěna předem zvážená baňka s varným kamínkem. Silikagel v trubicích byl promyt směsí n-hexanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Rozpouštědla zachycená ve zvážených baňkách byla následně oddestilována a byly tak získány frakce K $\gamma_{1/1}$ až K $\gamma_{1/9}$.

Tabulka 5 Preparativní TLC vzorku K γ_1

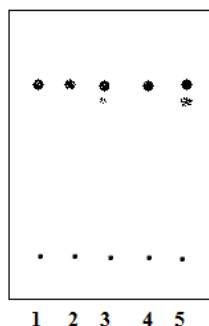
Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
K $\gamma_{1/1}$	58,1498 g	58,1567 g	0,0068 g
K $\gamma_{1/2}$	60,2278 g	60,2326 g	0,0048 g
K $\gamma_{1/3}$	57,6681 g	57,6768 g	0,0087 g
K $\gamma_{1/4}$	56,1357 g	56,1487 g	0,0131 g
K $\gamma_{1/5}$	55,2786 g	55,2858 g	0,0072 g
K $\gamma_{1/6}$	55,7222 g	55,7296 g	0,0074 g
K $\gamma_{1/7}$	56,2043 g	56,2102 g	0,0059 g
K $\gamma_{1/8}$	42,6504 g	42,6555 g	0,0051 g
K $\gamma_{1/9}$	43,3404 g	43,3457 g	0,0053 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0644 g

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma_{1/1}}$ až $K_{\gamma_{1/4}}$ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{\gamma_{1/1}}$ obsahovala pohyblivější látku než je γ -apoallobetulin. Frakce $K_{\gamma_{1/2}}$ a $K_{\gamma_{1/3}}$ obsahovaly hledaný γ -apoallobetulin, frakce $K_{\gamma_{1/2}}$ obsahovala čistý γ -apoallobetulin. Frakce $K_{\gamma_{1/4}}$ také obsahovala γ -apoallobetulin, ale v této frakci byly obsaženy i méně pohyblivé látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 41.



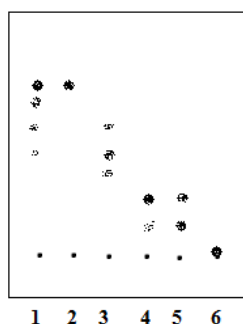
Obr. 41 Analytická TLC: 1. γ -apoallobetulin 2. $K_{\gamma_{1/1}}$, 3. $K_{\gamma_{1/2}}$, 4. $K_{\gamma_{1/3}}$, 5. $K_{\gamma_{1/4}}$, 6. γ -apoallobetulin

Pro kontrolu byla provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma_{1/2}}$, $K_{\gamma_{1/3}}$, $K_{\gamma_{1/4}}$ s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{\gamma_{1/2}}$ obsahuje pouze čistý γ -apoallobetulin. Frakce $K_{\gamma_{1/3}}$ již byla nepatrně znečištěna další látkou. Frakce $K_{\gamma_{1/4}}$ obsahovala kromě γ -apoallobetulinu další látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 42.



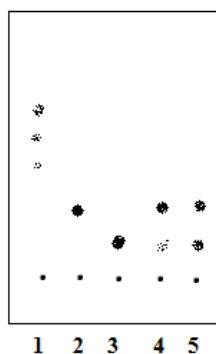
Obr. 42 Analytická TLC: 1. $K_{\gamma_{1/2}}$, 2. γ -apoallobetulin, 3. $K_{\gamma_{1/3}}$, 4. γ -apoallobetulin, 5. $K_{\gamma_{1/4}}$

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma 1/5}$ až $K_{\gamma 1/9}$ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že pouze frakce $K_{\gamma 1/5}$ obsahovala stopy γ -apoallobetulinu. Zbývající frakce $K_{\gamma 1/6}$ až $K_{\gamma 1/9}$ hledaný γ -apoallobetulin neobsahovaly. Frakce $K_{\gamma 1/9}$ obsahovala pouze látky, které zůstaly na startu během provedené preparativní TLC vzorku $K_{\gamma 1}$. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 43.



Obr. 43 **Analytická TLC:** 1. $K_{\gamma 1/5}$, 2. γ -apoallobetulin, 3. $K_{\gamma 1/6}$, 4. $K_{\gamma 1/7}$, 5. $K_{\gamma 1/8}$, 6. $K_{\gamma 1/9}$

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma 1/6}$ až $K_{\gamma 1/8}$ společně s betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{\gamma 1/7}$ obsahovala především allobetulin a z malé části také betulin. Frakce $K_{\gamma 1/8}$ obsahovala nezreagovaný betulin a allobetulin. Podle provedených TLC obsahovala frakce $K_{\gamma 1/6}$ látky méně pohyblivé než je γ -apoallobetulin a zároveň pohyblivější než je allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 44.



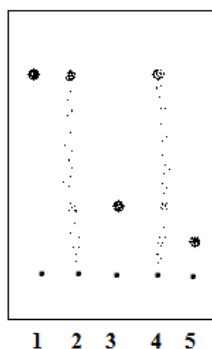
Obr. 44 **Analytická TLC:** 1. $K_{\gamma 1/6}$, 2. allobetulin, 3. betulin 4. $K_{\gamma 1/7}$, 5. $K_{\gamma 1/8}$

Na preparativní TLC desku bylo naneseno 72,8 mg organických látek. Z desky se podařilo získat 64,4 mg organických látek. Frakce $K_{\gamma_{1/2}}$ obsahovala pouze čistý γ -apoallobetulin, tedy bylo získáno 4,8 mg čistého γ -apoallobetulinu. Účinnost dělení vzhledem k čistému γ -apoallobetulinu byla 6,6%.

3.4.3.4 Preparativní TLC vzorků K_{10} a K_{11}

Na bodotávku bylo provedeno zahřívání směsi betulinu a $KHSO_4$ se zvýšeným obsahem $KHSO_4$. Tato směs byla zahřáta na $264^\circ C$ (teplota kolem bodu tání betulinu) a tato teplota byla udržována 10 minut. Tímto postupem byl získán vzorek K_9 . Po 10 minutách byl vzorek sundán z bodotávku a po jeho vychladnutí bylo přistoupeno k provedení analytických TLC zkoušek.

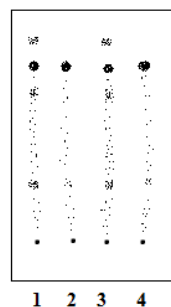
Byla provedena analytická TLC vzorku K_9 společně s γ -apoallobetulinem, allobetulinem a betulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K_9 obsahoval γ -apoallobetulin jen mírně znečištěný dalšími látkami. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázek 45.



Obr. 45 Analytická TLC: 1. γ -apoallobetulin, 2. $K_{9/1}$, 3. allobetulin, 4. $K_{9/1}$, 5. betulin

Byla provedena analytická TLC vzorku K_9 , při níž byl vzorek K_9 porovnán se vzorkem K_4 . Oba vzorky vycházely ze stejné směsi výchozích látek (směs betulinu a $KHSO_4$ se zvýšeným obsahem $KHSO_4$), ale byly u nich při reakci na bodotávku zvoleny jiné teplotní podmínky. Vzorek K_4 byl zahříván na teplotu $230^\circ C$ a následně pomalu chladl na bodotávku. Vzorek K_9 byl zahřátý na teplotu $264^\circ C$ a při této teplotě udržován 10 minut. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K_9 zreagoval lépe než vzorek K_4 . Vzorek K_9 neobsahoval velmi pohyblivou látku, která se nacházela až v čele

rozpouštědel jako tomu bylo u vzorku K₄. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázek 46.



Obr. 46 **Analytická TLC:** 1. K₄, 2. K₉, 3. K₄, 4. K₉

Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 100 mg a 100 mg. K ní bylo přidáno stejné objemové množství KHSO₄ (směs se zvýšeným obsahem KHSO₄). Tato směs byla nasypána do malé zkumavky, která byla vložena do 50 ml kádinky z poloviny naplněné KHSO₄. Byla sestavena aparatura podle obrázku 47. Směs ve zkumavce byla zahřáta na 260°C a při této teplotě byla udržována 10 minut. Teplotní podmínky byly zvoleny podle výsledků získaných ze vzorku K₉.

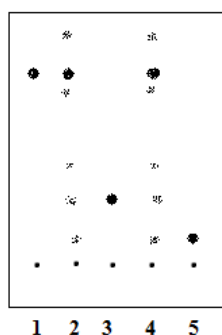


Obr. 47 **Aparatura pro zahřívání v tavenině KHSO₄**, 1 elektrický vařič; 2 kádinka s KHSO₄; 3 zkumavka se směsí betulinu a KHSO₄; 4 teploměr; 5 stojan; 6 držák na chladič

Ihned po ukončení zahřívání byla tavenina ze zkumavky vylita na alobal. Tavenina velice rychle tuhla, proto bylo nutné několikrát směs nahřát, než se podařilo ze zkumavky vylít podstatnou část taveniny. Vychladlá tavenina byla v třecí misce

rozetřena na prášek a vsypána do zkumavky se zbývající taveninou, kterou se nepodařilo ze zkumavky vylít. Tímto postupem byl získán vzorek K₁₀.

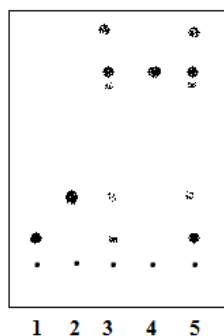
Byla provedena analytická TLC vzorku K₁₀. Z vzorku bylo odebráno nepatrné množství, které bylo rozpuštěno v chloroformu a naneseno na analytickou TLC folii. Vzorek byl pomocí TLC porovnán s γ -apoallobetulinem, allobetulinem a betulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že z převážné části obsahoval vzorek K₁₀ γ -apoallobetulin, ale ve vzorku byly také přítomny stopy nezreagovaného betulinu a stopy allobetulinu. Vzorek K₁₀ navíc obsahoval velice pohyblivou látku, která se držela v čele rozpouštědel. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 48.



Obr. 48 **Analytická TLC:** 1. γ -apoallobetulin, 2. K₁₀, 3. allobetulin, 4. K₁₀, 5. betulin

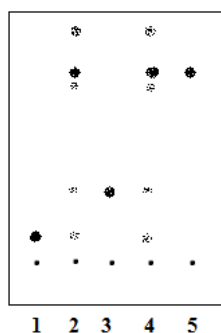
Byla připravena směs betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1, konkrétně 100 mg a 100 mg. K této směsi bylo přidáno stejné objemové množství KHSO₄ (směs se zvýšeným obsahem KHSO₄). Směs byla nasypána do malé zkumavky a vložena do 50 ml kádinky z poloviny naplněné KHSO₄. Poté byla sestavena aparatura podle obrázku 46. Směs byla ve zkumavce zahřívána na 260°C a při této teplotě byla udržována 20 minut. Po ukončení zahřívání byla tavenina vylita na alobal. Tavenina byla několikrát znovu zahřívána, než se podařilo vylít převážnou část na alobal. Vychladlá tavenina byla ve třetí misce rozetřena na prášek, který byl vysypán do zkumavky se zbylou taveninou. Tímto postupem byl připraven vzorek K₁₁.

Byla provedena analytická TLC, při níž byl vzorek K₁₁ porovnán se vzorkem K₁₀, betulinem, allobetulinem a γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že oba vzorky K₁₀ i K₁₁ obsahovaly γ -apoallobetulin. Oba vzorky také obsahovaly velmi pohyblivou látku, která se držela v čele rozpouštědel. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 49.



Obr. 49 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. allobetulin, 3. K₁₀, 4. γ -apoallobetulin, 5. K₁₁

Byla provedena analytická TLC vzorku K₁₁, při níž byl porovnán betulinem, allobetulinem a γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K₁₁ obsahoval pouze stopy nezreagovaného betulinu a téměř žádný allobetulin. Převážná část vzorku byla tvořena γ -apoallobetulinem a velmi pohyblivou látkou, která se držela v čele rozpouštědel. Z chromatogramu bylo také patrné, že v těsné blízkosti stopy γ -apoallobetulinu se držela méně pohyblivá látka, než je γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 50.



Obr. 50 **Analytická TLC:** 1. betulin, 2. K₁₁, 3. allobetulin, 4. K₁₁, 5. γ -apoallobetulin

3.4.3.5 Zpracování produktů tavení vzorků K₁₀ a K₁₁ pomocí preparativní TLC

Do zkumavky obsahující taveninu vzorku K₁₀ byly přidány asi 2 ml chloroformu. Organická část vzorku se v přidaném chloroformu pozvolna rozpustila. Ve zkumavce byly jasně patrné dvě oddělené části, tekutý roztok organických látek v chloroformu a pevná anorganická část KHSO₄ usazeného na dně zkumavky. Roztok byl pomocí balonku přenesen do předem zvažované 25 ml baňky. Poté byly do zkumavky se zbytkem taveniny vzorku K₁₀ přidány další 2 ml chloroformu, v nichž se rozpustily

zbytky organických látek, které ještě v tavenině zůstaly. Roztok byl pomocí balonku přenesen k prvním podílu roztoku do zvážené baňky. Chloroform byl následně z baňky oddestilován. Po vychladnutí řádném vyschnutí byla baňka se vzorkem K₁₀ zvážena.

Stejný postup byl zvolen také pro taveninu vzorku K₁₁, který byl také přenesen do předem zvážené baňky.

Tabulka 6 **Hmotnost vzorků K₁₀ a K₁₁**

Vzorek	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost vzorku
K ₁₀	21,6875 g	21,7550 g	0,0675 g
K ₁₁	22,7465 g	22,8428 g	0,0963 g

Pozn: Během zpracování vzorku K₁₀ došlo k vylití části roztoku, tím došlo u vzorku K₁₀ k hmotnostním ztrátám.

Vzorek K₁₀ ani vzorek K₁₁ neobsahovaly čistý γ -apoallobetulin, proto bylo přistoupeno k jejich zpracování pomocí preparativní TLC.

Do zkumavky obsahující vzorek K₁₀ byl odpipetován 1 ml chloroformu, vzniklý roztok byl nasát do balonku. Pomocí balonku byl roztok nanesen na preparativní TLC desku. Poté bylo do zkumavky odpipetováno 0,5 ml chloroformu, také tento roztok byl pomocí balonku nanesen na preparativní TLC desku.

Stejný postup byl zvolen také pro taveninu vzorku K₁₁, který byl nanesen na vlastní preparativní TLC desku. Obě preparativní TLC desky byly následně vyvíjeny ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:1. Po vyschnutí rozpouštědel bylo přistoupeno k detekci organických látek roznesených na TLC deskách vypálením elektricky žhaveným odporovým drátem.

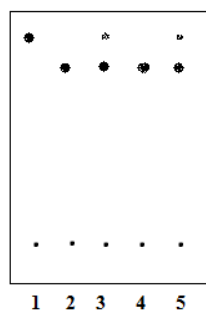
Po detekci bylo rozhodnuto spojit odpovídající si části z obou TLC desek. Silikagel z obou TLC desek byl sejmут a nasypán do skleněných trubic. Desky byly rozděleny na devět částí. Látky držící se v čele rozpouštědel byly označeny jako frakce K_{10-11/1}. Látky, které zůstaly na startu, byly označeny K_{10-11/9}. Organické látky byly ze silikagelu vymyty směsí n-hexanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Rozpouštědla byla zachycena do předem zvážených baněk.

Tabulka 7 **Preparativní TLC vzorku K₁₀₋₁₁**

Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost vzorku
K _{10-11/1}	44,9154 g	44,9340 g	0,0186 g
K _{10-11/2}	57,9224 g	57,9385 g	0,0161 g
K _{10-11/3}	57,6246 g	57,6550 g	0,0304 g

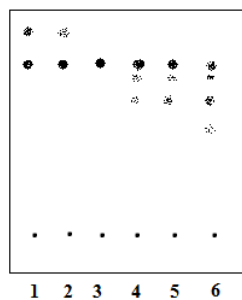
K _{10-11/4}	55,9936 g	56,0194 g	0,0258 g
K _{10-11/5}	55,1388 g	55,1600 g	0,0212 g
K _{10-11/6}	55,5711 g	55,5784 g	0,0073 g
K _{10-11/7}	56,0785 g	56,0867 g	0,0082 g
K _{10-11/8}	42,4463 g	42,4538 g	0,0075 g
K _{10-11/9}	42,9056 g	42,9118 g	0,0062 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,1413 g

Byla provedena analytická TLC frakcí K_{10-11/1}, K_{10-11/2}, K_{10-11/3} společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce K_{10-11/1} obsahovala pouze pohyblivější látky než je γ -apoallobetulin. Frakce K_{10-11/2} a K_{10-11/3} obsahovaly γ -apoallobetulin znečištěný pohyblivější látkou, která se držela v čele rozpouštědel. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 51.



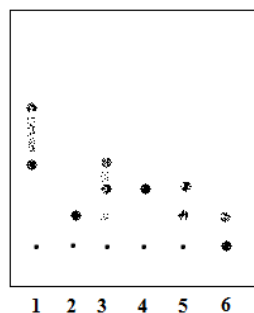
Obr. 51 **Analytická TLC:** 1. K_{10-11/1}, 2. γ -apoallobetulin, 3. K_{10-11/2}, 4. γ -apoallobetulin, 5. K_{10-11/3}

Byla provedena analytická TLC frakcí K_{10-11/2}, K_{10-11/3}, K_{10-11/4}, K_{10-11/5} a K_{10-11/6} společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce K_{10-11/4} a K_{10-11/5} obsahovaly γ -apoallobetulin, který byl nepatrně znečištěný méně pohyblivějšími látkami. Frakce K_{10-11/6} obsahovala kromě γ -apoallobetulinu již větší množství méně pohyblivých látek. Chromatogram potvrdil, že frakce K_{10-11/2} a K_{10-11/3} obsahovaly γ -apoallobetulin znečištěný pohyblivější látkou. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 52.



Obr. 52 **Analytická TLC:** 1. $K_{10-11/2}$, 2. $K_{10-11/3}$, 3. γ -apoallobetulin, 4. $K_{10-11/4}$, 5. $K_{10-11/5}$, 6. $K_{10-11/6}$

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{10-11/6}$, $K_{10-11/7}$, $K_{10-11/8}$ a $K_{10-11/9}$ společně s betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{10-11/7}$ obsahovala allobetulin a jednu pohyblivější látku a malé stopy betulinu. Frakce $K_{10-11/8}$ obsahovala allobetulin a část nezreagovaného betulinu. Frakce $K_{10-11/9}$ obsahovala nezreagovaný betulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 53.



Obr. 53 **Analytická TLC:** 1. $K_{10-11/6}$, 2. betulin, 3. $K_{10-11/7}$, 4. allobetulin, 5. $K_{10-11/8}$, 6. $K_{10-11/9}$

Podle výsledků analytických TLC zkoušek byly dohromady spojeny frakce $K_{10-11/6}$, $K_{10-11/7}$, $K_{10-11/8}$ a $K_{10-11/9}$. Frakce $K_{10-11/1}$ byla spojena se vzorkem $K\gamma_{1/1}$. Frakce $K_{10-11/2}$, $K_{10-11/3}$, $K_{10-11/4}$, $K_{10-11/5}$ byly spojeny dohromady do vzorku $K\gamma_2$.

K reakci s $KHSO_4$ bylo celkem odebráno 200 mg betulinu. Na preparativní TLC desky bylo celkem naneseno 163,8 mg organických látek. Zpracováním preparativních TLC desek bylo získáno 141,3 mg organických látek. Frakce obsahující hledaný γ -apoallobetulin vážily dohromady 93,5 mg. Výtěžnost vzhledem k frakcím obsahujícím γ -apoallobetulin byla 46,8%.

3.4.3.5.1 Preparativní TLC vzorku $K\gamma_2$

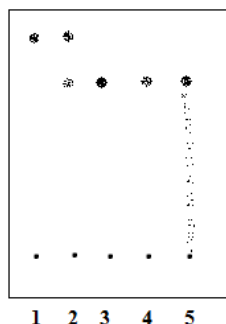
Vzorek $K\gamma_2$ byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu. Za pomoci balonku byl roztok nanesen na preparativní TLC desku. Do baňky bylo odpipetováno ještě 0,5 ml chloroformu, v němž se rozpustily zbytky vzorku $K\gamma_2$, které v baňce mohly zůstat. I tento podíl roztoku byl balonkem nanesen na desku. Preparativní TLC deska byla následně vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Po vyschnutí rozpouštědel byla na TLC detekována přítomnost organických látek za použití elektricky žhaveného odporového drátu. Dle stop, které zůstaly na desce vypálené, bylo rozhodnuto rozdělit desku na devět částí. Oblast, kam doputovalo čelo rozpouštědel, byla označena $K\gamma_{2/1}$. Oblast startu byla označena $K\gamma_{2/9}$. Silikagel byl po částech z desky sundán a rozmělněn. Následně byly jednotlivé podíly nasypány do skleněných trubic, pod které byly dány zvážené skleněné baňky. Silikagel v trubicích byl promyt směsí n-hexanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Proteklé roztoky byly zachyceny do zvážených baněk. Z nich byla rozpouštědla oddestilována a baňky byly opět zváženy. Tímto postupem byly získány frakce $K\gamma_{2/1}$ až $K\gamma_{2/9}$.

Tabulka 8 Preparativní TLC vzorku $K\gamma_2$

Frakce	Hmotnost baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
$K\gamma_{2/1}$	44,9606 g	44,9638 g	0,0032 g
$K\gamma_{2/2}$	57,9367 g	57,9388 g	0,0021 g
$K\gamma_{2/3}$	57,6836 g	57,6867 g	0,0031 g
$K\gamma_{2/4}$	55,9168 g	55,9244 g	0,0076 g
$K\gamma_{2/5}$	55,1719 g	55,2006 g	0,0287 g
$K\gamma_{2/6}$	55,5973 g	55,6177 g	0,0204 g
$K\gamma_{2/7}$	55,0387 g	55,0433 g	0,0046 g
$K\gamma_{2/8}$	42,5389 g	42,5490 g	0,0101 g
$K\gamma_{2/9}$	42,9473 g	42,9580 g	0,0107 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0905 g

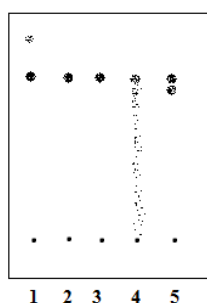
Byla provedena analytická TLC frakcí $K\gamma_{2/1}$, $K\gamma_{2/2}$, $K\gamma_{2/3}$ a $K\gamma_{2/4}$ spolu s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K\gamma_{2/1}$ a $K\gamma_{2/2}$ obsahovaly

velmi pohyblivou látku, která se držela v čele rozpouštědel. Frakce $K\gamma_{2/1}$ byla čistá, ale ve frakci $K\gamma_{2/2}$ již byla příměs γ -apoallobetulinu. Frakce $K\gamma_{2/3}$ obsahovala čistý γ -apoallobetulin. Z výsledného chromatogramu nebylo dostatečně patrné, jestli frakce $K\gamma_{2/4}$ obsahovala pouze γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 54.



Obr. 54 **Analytická TLC:** 1. $K\gamma_{2/1}$, 2. $K\gamma_{2/2}$, 3. γ -apoallobetulin, 4. $K\gamma_{2/3}$, 5. $K\gamma_{2/4}$

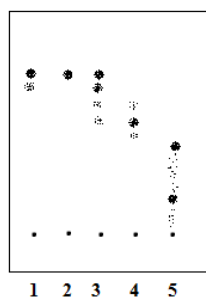
Byla provedena analytická TLC frakcí $K\gamma_{2/3}$, $K\gamma_{2/4}$, $K\gamma_{2/5}$ a $K\gamma_{2/6}$ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že jediné frakce $K\gamma_{2/4}$ obsahovala čistý γ -apoallobetulin. Oproti přechodí analytické TLC bylo u frakce $K\gamma_{2/3}$ zjištěno, že kromě γ -apoallobetulinu obsahovala ještě malé množství pohyblivější látky. Frakce $K\gamma_{2/5}$ byla nanášena v příliš velkém množství, proto nebylo z chromatogramu možno jasně určit, zda je ve frakci pouze γ -apoallobetulin. Frakce $K\gamma_{2/6}$ obsahovala kromě γ -apoallobetulinu méně pohyblivou látku, která se držela těsně pod stopou γ -apoallobetulinu. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 55.



Obr. 55 **Analytická TLC:** 1. $K\gamma_{2/3}$, 2. $K\gamma_{2/4}$, 3. γ -apoallobetulin, 4. $K\gamma_{2/5}$, 5. $K\gamma_{2/6}$

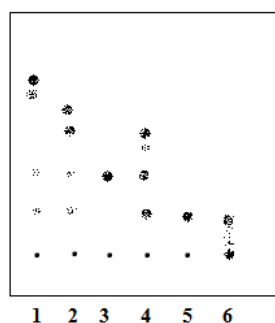
Byla provedena analytická TLC frakcí $K\gamma_{2/5}$, $K\gamma_{2/6}$, $K\gamma_{2/7}$ a $K\gamma_{2/8}$ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru

10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{\gamma 2/5}$ neobsahovala čistý γ -apoallobetulin, v těsné blízkosti γ -apoallobetulinu se držela méně pohyblivá látka. Frakce $K_{\gamma 2/6}$ obsahovala také γ -apoallobetulin a blízkou méně pohyblivou látku, navíc na chromatogramu byly patrné stopy dalších méně pohyblivých látek. Frakce $K_{\gamma 2/7}$ a $K_{\gamma 2/8}$ neobsahovaly γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 56.



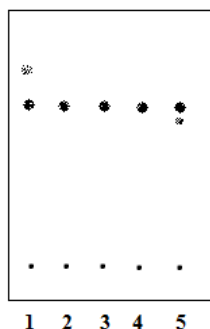
Obr. 56 **Analytická TLC:** 1. $K_{\gamma 2/5}$, 2. γ -apoallobetulin, 3. $K_{\gamma 2/6}$, 4. $K_{\gamma 2/7}$, 5. $K_{\gamma 2/8}$

Byla provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma 2/6}$, $K_{\gamma 2/7}$, $K_{\gamma 2/8}$ a $K_{\gamma 2/9}$ společně s betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že frakce $K_{\gamma 2/6}$, $K_{\gamma 2/7}$ a $K_{\gamma 2/8}$ obsahovaly jak betulinu tak allobetulin. Frakce $K_{\gamma 2/9}$ obsahovala betulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 57.



Obr. 57 **Analytická TLC:** 1. $K_{\gamma 2/6}$, 2. $K_{\gamma 2/7}$, 3. allobetulin, 4. $K_{\gamma 2/8}$, 5. betulin, 6. $K_{\gamma 2/9}$

Pro kontrolu byla ještě provedena analytická TLC frakcí $K_{\gamma 2/3}$, $K_{\gamma 2/4}$ a $K_{\gamma 2/5}$ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Výsledný chromatogram potvrdil, že pouze frakce $K_{\gamma 2/4}$ obsahovala čistý γ -apoallobetulin. Frakce $K_{\gamma 2/3}$ i $K_{\gamma 2/5}$ byly v nepatrném množství znečištěny jinými látkami. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 58.



Obr. 58 **Analytická TLC**: 1. $K_{\gamma 2/3}$, 2. γ -apoallobetulin, 3. $K_{\gamma 2/4}$, 4. γ -apoallobetulin, 5. $K_{\gamma 2/5}$

Na preparativní TLC desku bylo naneseno 93,5 mg organických látek. Z desky se podařilo získat 90,5 mg organických látek. Frakce $K_{\gamma 2/4}$ obsahovala pouze čistý γ -apoallobetulin, tedy bylo získáno 7,6 mg čistého γ -apoallobetulinu. Účinnost dělení vzhledem k čistému γ -apoallobetulinu byla 8,1%.

3.5 Příprava chromatograficky čistého betulinu

Byla provedena analytická TLC zkouška vzorku betulinu. Na chromatografickou folii byl nanesen vzorek betulinu v nadměrném množství. Poté byla TLC folie vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek betulinu není chromatograficky zcela čistý. Při nanesení velkého množství vzorku se na folii objevila ještě stopa pohyblivější látky, než je betulin. Protože vzorek betulinu nebyl chromatograficky zcela jednotný, bylo přistoupeno k jeho přečištění pomocí preparativní TLC.

Do malé baňky bylo naváženo 85,1 mg betulinu, který byl následně rozpouštěn v 1 ml chloroformu. Protože se veškerý betulin nepodařilo rozpustit, byl přidán další 1 ml chloroformu a roztok byl mírně zahříván. Teprve poté se betulin podařilo zcela rozpustit. Vzniklý roztok byl nasát do balonku a nanesen na preparativní TLC desku. TLC byla následně vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Po vyschnutí rozpouštědel byla TLC deska ve spodní třetině na pohled lesklá, horní dvě třetiny byly beze změny.

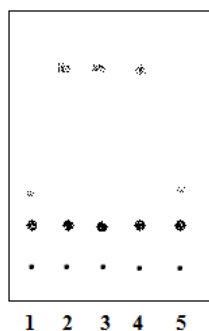
Na desce byla provedena detekce organických látek pomocí elektricky žhaveného odporového drátu. Po detekci byla na desce jasně patrna oblast, v níž se nacházela převážná část organických látek. Tato oblast svým umístěním odpovídala

části, na níž byly před detekcí znát optické změny oproti zbylé části TLC desky. TLC deska byla následně rozdělena na pět částí. Oblast, nad hlavním podílem organických látek, byla označena BET₅. Oblast, v níž byla roznesena hlavní část organických látek, byla rozdělena na tři části BET₄ až BET₂. Oblast startu byla označena BET₁. Silikagel byl následně po částech z desky sundán, rozmělněn a nasypán do skleněných trubic. Pod trubice byly dány předem zvážené baňky. Silikagel byl promyt ethanolem. Poté byl ethanol z baněk oddestilován, čímž byly získány vzorky BET₁ až BET₅.

Tabulka 9 Preparativní TLC betulinu

Vzorek	Hmotnost baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost vzorku
BET ₁	41,1991 g	41, 2363 g	0,0372 g
BET ₂	38,3819 g	38,3937 g	0,0118 g
BET ₃	57,8676 g	57,8841 g	0,0165 g
BET ₄	31,9747 g	31,9864 g	0,0117 g
BET ₅	33,7728 g	33, 7774 g	0,0046 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0818 g

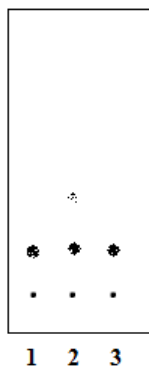
Byla provedena analytická TLC vzorků BET₂, BET₃, BET₄ společně s výchozím vzorkem betulinu. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že všechny tři vzorky získané preparativní TLC obsahovaly kromě betulinu také pohyblivější látku. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 59.



Obr. 59 Analytická TLC: 1. čistý betulin, 2. BET₂, 3. BET₃, 4. BET₄, 5. čistý betulin

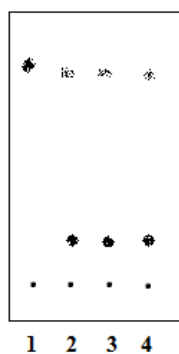
Byla provedena analytická TLC vzorku BET₁ společně s výchozím vzorkem betulinu. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2.

Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek BET₁ je chromatograficky zcela jednotný. Oproti původnímu vzorku betulinu se na TLC folii, již neobjevila stopa pohyblivější látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 60.



Obr. 60 **Analytická TLC:** 1. BET₁, 2. čistý betulin, 3. BET₁

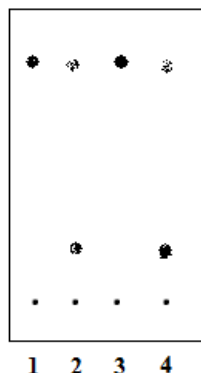
Byla provedena analytická TLC vzorků BET₂, BET₃, BET₄ společně s γ -apoallobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu nebylo dostatečně patrné, zda pohyblivější látka ve vzorcích odpovídala γ -apoallobetulinu. Chromatogram však prokázal, že všechny tři frakce obsahují stejné látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 61.



Obr. 61 **Analytická TLC:** 1. γ -apoallobetulin, 2. BET₂, 3. BET₃, 4. BET₄

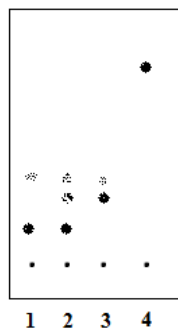
Byla provedena analytická TLC vzorku BET₄ společně s γ -apoallobetulinem, kdy byly vzorky střídavě naneseny vedle sebe. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že stopa další látky ve vzorku BET₄ odpovídá γ -apoallobetulinu. Stejně tomu bylo u vzorků BET₂ a BET₃, protože obsahovaly stejné látky jako vzorek BET₄. Během oddestilování ethanolu z baněk se vzorky BET₂, BET₃ a BET₄ zřejmě došlo k přehřátí vzorků a část

betulinu zreagovala na γ -apoallobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 62.



Obr. 62 **Analytická TLC**: 1. γ -apoallobetulin, 2. BET₄, 3. γ -apoallobetulin, 4. BET₄

Byla provedena analytická TLC vzorku BET₅ společně s γ -apoallobetulinem, betulinem a allobetulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorek K_{BET5} neobsahoval γ -apoallobetulin. Vzorek BET₅ obsahoval betulin i allobetulin. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 63.



Obr. 63 **Analytická TLC**: 1. betulin, 2. BET₅, 3. allobetulin, 4. γ -apoallobetulin

Vzorek BET₁, který tvořil pouze chromatograficky čistý betulin, byl vzat ke krystalizaci. Cílem postupu bylo získat co nejvíce koncentrovaný roztok betulinu, ze kterého by po ochlazení vypadávaly krystalky betulinu. Šlo tedy o získání krystalického betulinu.

Na preparativní TLC desku bylo naneseno 85,1 mg vzorku betulinu. Z TLC desky se podařilo získat 81,8 mg organických látek. Frakce BET₁ obsahovala chromatograficky čistý betulin, bylo tedy získáno 37,2 mg chromatograficky čistého betulinu. Výtěžnost dělení vzhledem k čistému betulinu byla 43,7%.

3.5.1 Krystalizace vzorku BET₁

Do baňky se vzorkem bylo nalito malé množství ethanolu, tak aby za horka vznikl nasycený roztok. Baňka se vzorkem byla vložena na topné hnízdo. Po zapnutí topného hnízda bylo baňkou pomalu otáčeno. Rozpuštění bylo pečlivě hlídáno tak, aby nedošlo k varu ethanolu. Po rozpuštění veškerého betulinu v ethanolu bylo zahřívání ukončeno. Baňka byla sejmuta z topného hnízda a schlazena pod tekoucí vodou. Roztok byl ponechán v klidu odstát, až z něj začaly vypadávat jemné krystalky betulinu. Když v roztoku začaly být jasně patrné krystaly, byl roztok ještě několik minut ponechán v klidu. Mezitím byl připraven skleněný balonek a do jeho kapilárního konce byl nácpan malý kousek vaty. Následně byl do balonku vysát matečný loup z baňky, v níž zůstaly jemné krystalky betulinu. Matečný loup byl přenesen do zvážené lékovky, v níž se z matečného louhu vyloučil další podíl krystalického betulinu (vzorek BET_{1/2}).

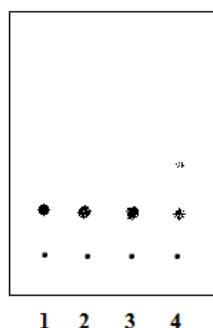
Do baňky s prvním podílem krystalů bylo ještě jednou přidáno malé množství ethanolu a byl opět připraven nasycený roztok betulinu za horka. Tentokrát po rozpuštění veškerého podílu betulinu byl roztok ponechán volně vychladnout, aniž by se baňka ochlazovala pod tekoucí vodou. Vyloučení krystalů z roztoku trvalo déle, než tomu bylo u první krystalizace, ale vzniklé krystaly byly hrubší (vzorek BET_{1/1}). Matečný loup z druhé krystalizace byl opět za pomoci balonku odsát a přenesen do další předem zvážené lékovky. Z tohoto matečného louhu byl získán třetí podíl krystalického betulinu (vzorek BET_{1/3}). Matečný loup, který zůstal v obou lékovkách, byl zahuštěn na elektrickém vařiči a zbývající roztok byl z obou lékovek nasát do balonku a přenesen do třetí lékovky. V ní se vyloučil ještě čtvrtý podíl krystalického betulinu a bylo tak zabráněno hmotnostním ztrátám (vzorek BET_{1/4}). Betulin vykrystalovaný v baňce po dvojitým překrystalování byl nejčistší. Mírně horší byly krystalky betulinu, které vykrystalovaly v prvních dvou lékovkách. Ve třetí lékovce zůstal nejméně kvalitní podíl krystalického betulinu.

Tabulka 10 **Krystalizace betulinu**

	Hmotnost lékovky	Hmotnost lékovky s betulinem	Hmotnost krystalického betulinu
BET _{1/1}	41,1991 g	41,2112 g	0,0121 g
BET _{1/2}	14,8245 g	14,8289 g	0,0044 g
BET _{1/3}	14,4678 g	14,4716 g	0,0040 g

BET _{1/4}	13,8808 g	13,8948 g	0,0140 g
Celková hmotnost získaného krystalického betulinu			0,0345 g

Byla provedena kontrolní analytická TLC překrystalovaných vzorků. Vzorky BET_{1/1}, BET_{1/2} a BET_{1/3} byly porovnány s původním vzorkem betulinu. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že vzorky BET_{1/1}, BET_{1/2} i BET_{1/3} byly chromatograficky jednotné. Nejucelenější stopu vykazoval vzorek BET_{1/1}, což odpovídá jeho největší čistotě. U stopy betulinu se opět v nepatrném množství objevila stopa pohyblivější látky. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 64.



Obr. 64 **Analytická TLC:** 1. BET_{1/1}, 2. BET_{1/2}, 3. BET_{1/3}, 4. čistý betulin

Ze získaných podílů betulinu byly odebrány vzorky pro zjištění bodu tání. Teploty tání změřené prostřednictvím bodotávku jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 **Teplota tání vzorků po krystalizaci**

Vzorek	Teplota tání
BET _{1/1}	258°C – 260°C
BET _{1/2}	261°C – 263°C
BET _{1/3}	258°C – 260°C

Zjištěné teploty tání jednotlivých vzorků po krystalizaci potvrzují údaje o čistotě, které byly zjištěny prostřednictvím analytické TLC. Všechny tři vzorky měly bod tání v rozsahu teploty tání čistého betulinu, která je kolem 260°C.

3.6 Zjišťování DSC křivek

Pro získání DSC křivek byl využíván přístroj DSC Q200 od firmy TA Instruments. Měření na diferenciálním skenovacím kalorimetru bylo prováděno u směsi betulinu a měděného prášku a u směsi betulinu a KHSO_4 .

3.6.1 Provedení diferenciální skenovací kalorimetrie

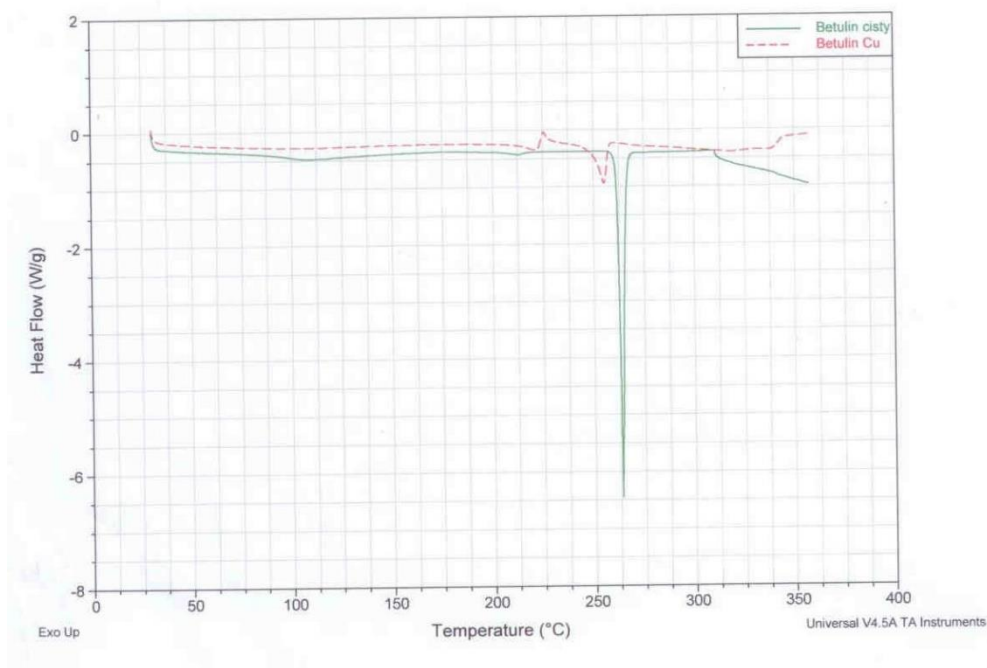
Do měřené pánvičky byl navážen vzorek sledované látky či směsi látek. Následně byla pánvička překryta víčkem, které bylo do pánvičky zalisováno pomocí malého mechanického lisu. S pánvičkou i víčkem se muselo pracovat pomocí pinzety. Pánvička uzavřená víčkem byla vložena do autosampleru přístroje, který po spuštění měření vložil měřenou a referenční pánvičku do teplotní cely kalorimetru. Před vlastním měřením byly v počítačovém programu nastaveny parametry měření – teplotní podmínky měření, hmotnost sledovaného vzorku a typ použitých pánviček.

3.6.2 Diferenciální skenovací kalorimetrie směsi betulinu a měděného prášku

Příprava vzorku pro měření byla provedena podle popisu v kapitole 3.6.1. Pro měření směsi betulinu a měděného prášku byly zvoleny hliníkové pánvičky. Teplotní rozsah měření byl 30°C až 360°C , teplota byla zvyšována o 10°C za 1 minutu. Hmotnost směsi betulinu a měděného prášku byla 0,003 563 g.

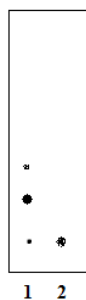
Stejně teplotní podmínky byly zvoleny i pro měření samotného betulinu. Hmotnost betulinu byla 0,004 312 g.

Z obou provedených měření byly získány DSC křivky, jejich proložení je na obrázku 65. Na křivce betulinu je jasně patrný exotermní pík kolem teploty 260°C . Tento pík odpovídá teplotě tání betulinu. Na křivce betulinu se další změna průběhu objevuje při teplotách vyšších než 310°C . Předpokládaný důvod tohoto exotermického jevu je degradace betulinu. Pro ověření tohoto předpokladu bylo provedeno zahřívání betulinu na bodotávku s následnou analytickou TLC.



Obr. 65 DSC křivka směsi betulinu a měděného prášku

Betulin byl na bodotávku zahříván až na teplotu 350°C. Během celého měření byl vzorek pozorně sledován. V teplotním rozmezí 256°C až 260°C došlo k roztátí betulinu. Po sejmutí z bodotávku byl zahříváný betulin porovnán s výchozím betulinem pomocí analytické TLC. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:3. Z výsledného chromatogramu bylo patrné, že došlo ke spálení betulinu, výsledný produkt byl zcela zčernalý. Výsledný chromatogram je zaznamenán na obrázku 66.



Obr. 66 Analytická TLC: 1. čistý betulin, 2. vzorek z bodotávku

Teplota tání směsi betulinu a měděného prášku byla určena 247°C (viz. kapitola 3.3.1). Této teplotě odpovídá exotermický pík při teplotě přibližně 248°C na DSC křivce směsi betulinu a měděného prášku.

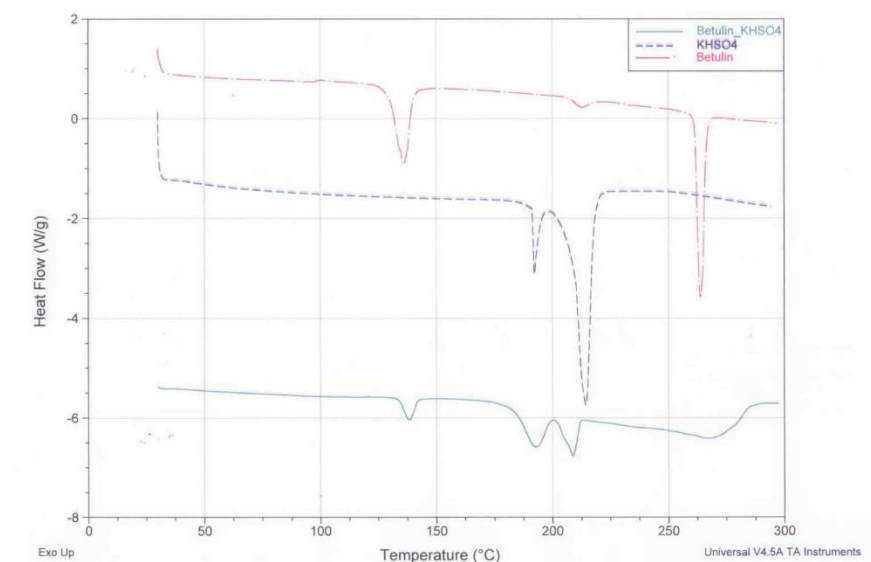
3.6.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie směsi betulinu a KHSO₄

Příprava vzorku pro měření byla provedena podle popisu v kapitole 3.6.1. Pro měření směsi betulinu a KHSO₄ byly zvoleny aloxované pánvičky. Teplotní rozsah měření byl od 30°C do 300°C, teplota byla zvyšována o 10°C za 1 minutu. Hmotnost směsi betulinu (BET_{1/1}) a KHSO₄ byla 0,002 115 g.

Stejně teplotní podmínky byly zvoleny i pro měření čistého betulinu (vzorek BET_{1/2}). Hmotnost betulinu byla 0,002 172 g.

Stejně teplotní podmínky byly zvoleny i pro měření čistého KHSO₄. Hmotnost KHSO₄ byla 0,002 391 g.

Ze všech tří provedených měření byly získány DSC křivky, jejich proložení je na obrázku 67.



Obr. 67 DSC křivka směsi betulinu a KHSO₄

Na křivce betulinu je výrazný exotermický pík při teplotě 262°C, tento pík odpovídá zjištěné teplotě tání vzorku BET_{1/2} (viz. kapitola 3.5.1). Na křivce samotného KHSO₄ se kolem teploty 190°C objevil exotermický pík, tento pík odpovídá teplotě tání KHSO₄. Na křivce směsi betulinu a KHSO₄ se nachází dva menší exotermické píky v rozmezí teplot 190°C až 210°C, tyto píky pravděpodobně odpovídají reakci betulinu s KHSO₄.

4. Didaktická část

Dosud detailně popisované experimenty je možno po řádném vyhodnocení využít k rozšíření experimentální výuky při přípravě budoucích učitelů chemie, případně v omezené míře i na střední škole v zájmové činnosti studentů díky tomu, že je lze rozkrokovat na jednotlivé problémy, které je možno realizovat jednotlivě jako doplňující pracovní návody k rozšíření experimentálních dovedností studentů, případně ve vzájemných vazbách k řešení jakéhosi projektu. Dříve popsany proces tavení betulinu s KHSO_4 a následné zpracování reakční směsi je možno využít v těchto laboratorních cvičeních.

4.1 Laboratorní cvičení č. 1

4.1.1 Příprava preparativní TLC desky

Pomůcky: skleněná deska o rozměrech 20 x 20 cm, Erlenmeyerova baňka, laboratorní váhy, odměrný válec, stříčka s destilovanou vodou

Chemikálie: silikagel Merck (Kieselgel 60 G)

Postup: skleněnou desku nejprve omyjte ethanolem a následně opláchněte destilovanou vodou. Do Erlenmeyerovy baňky navažte 25 g silikagelu. K tomuto množství silikagelu přilijte 55 ml destilované vody, kterou jste odměřili pomocí odměrného válce. Následně vodu se silikagelem promíchejte důkladným protřepáním v uzavřené baňce. Smícháním silikagelu s vodou vznikne nepřilíh hustá suspenze. Tuto suspenzi nalijte na navlhčenou skleněnou desku. Ideální je nalít suspenzi do středu skleněné desky a následně suspenzi hrdlem baňky opatrně rovnoměrně rozptýlit po celém povrchu desky až k jejím okrajům. Na závěr otočte levou ruku dlaní vzhůru a skleněnou desku si opatrně položte na bříška prstů. Druhou rukou zespodu lehce poklepávejte na skleněnou desku, tím docílíte rovnoměrné vrstvy silikagelu po celém povrchu desky. Jestli je suspenze nanesená v rovnoměrné vrstvě, si můžete ověřit, pokud se na desku podíváte vodorovně proti světlu.

Skleněnou desku s litou vrstvou silikagelu opatrně položte na rovnou podložku a nechte do příštích laboratorních cvičení vyschnout. Desku uložte na bezpečné místo tak, aby nedošlo k poškození nalité vrstvy silikagelu.

4.1.2 Zahřívání betulinu s KHSO_4 v tavenině KHSO_4

Pomůcky: stojan, elektrický vaříč, držák na chladič, malá zkumavka, kádinka (50 ml), křížová svorka, teploměr (teplotní rozsah alespoň do 300°C), třecí miska, lékovka, pipeta, alobal, laboratorní kleště

Chemikálie: KHSO_4 , betulin, chloroform

Postup: sestavte aparaturu podle obrázku 68. Kádinku upevněte ke stojanu pomocí držáku na chladič, mezi kádinkou a elektrickým vaříčem ponechte asi 0,5 cm volného místa.



Obr. 68 Aparatura zahřívání betulinu s KHSO_4 v tavenině KHSO_4 , 1 elektrický vaříč; 2 kádinka s KHSO_4 ; 3 zkumavka se směsí betulinu a KHSO_4 ; 4 teploměr; 5 stojan; 6 držák na chladič

Do malé zkumavky navažte 100 mg betulinu a 100 mg KHSO_4 . Poté k navážené směsi přidejte stejné objemové množství KHSO_4 . Následně připravenou směs ve zkumavce řádně protřepejte tak, aby vznikla homogenní směs. Zkumavku s připravenou směsí vložte do 50 ml kádinky, do níž jste předem dali KHSO_4 asi do výšky 1 cm. Do kádinky vedle zkumavky vložte teploměr a poté do kádinky přidejte další KHSO_4 tak, aby byly zkumavka i teploměr zakryty asi do výšky 1,5 cm. Až budete mít zkumavku i teploměr řádně upevněny, zapněte elektrický vaříč. Teplotu reakční směsi nechte vystoupat na 260°C s při této teplotě směs udržujte 20 minut. Po ukončení zahřívání uchopte zkumavku opatrně do laboratorních kleští a rychle taveninu vylijte na keramickou dlaždici pokrytou alobalem. Tavenina ve zkumavce velmi rychle tuhne, proto zkumavku opětovně zahřívejte, dokud se vám nepodaří vylít podstatnou část

taveniny ze zkumavky. Taveninu z alobalu sejměte a rozetřete ve třecí misce. Rozetřenou taveninu poté přesypte do čisté lékovky. Třecí misku vymyjte malým množstvím chloroformu. Chloroform z třecí misky vlijte do zkumavky se zbývající taveninou. Tavenina se v chloroformu rozpustí. Následně kapalinu přelijte do lékovky s rozetřenou taveninou. Zkumavku vymyjte dalším podílem chloroformu a opět přilijte do lékovky. Lékovku řádně uzavřete a ponechte na bezpečném místě do příštích laboratorních cvičení.

Poznámky: na stojan je vhodné upevnit ještě držák na zkumavky tak, aby o něj bylo možno zapřít teploměr. Po roztátí KHSO_4 v kádince by mohl teploměr ze zkumavky vypadnout a rozbít se.

Teplota se špatně udržuje prostřednictvím nastavení elektrického vařiče, či jeho vypínání a zapínání. Ideální je nechat elektrický vařič zapnutý na nejvyšší stupeň a opatrně ho podle kolísání teploty na teploměru odendávat pryč a opět vsunovat pod zahřívanou kádinku.

4.2. Laboratorní cvičení č. 2

4.2.1 Příprava balonku

S přípravou balonku byly studenti seznámeni při laboratorním cvičení Práce se sklem, které je součástí povinného předmětu Chemické laboratorní metody. Návod na zhotovení balonku lze také najít v literatuře např.²⁵.

Postup: pokud si se zhotovením balonku nevíte rady, požádejte o pomoc vyučujícího.

4.2.2 Preparativní TLC

Pomůcky: připravená TLC deska, balonek pipeta, elektrický vařič, lékovka

Chemikálie: zreagovaná směs betulinu a KHSO_4 , chloroform

Postup: vezměte si lékovku se zreagovanou směsí betulinu a KHSO_4 , kterou jste si připravili na předchozích laboratorních cvičeních. Pokud chloroform v lékovce od minule vyschnul, odpipetujte 1 ml chloroformu a přilijte ke směsi. Pracujte tak, abyste získali přibližně 1 ml roztoku. Zreagované organické látky se v chloroformu rozpustí, KHSO_4 zůstane nerozpuštěný. Otevřenou kapiláru připraveného balonku uzavřete malým smotkem vaty, která poslouží jako filtrační vrstva. Balonek zahřejte nad vařičem, a pak do něj nasajte nepatrný podíl roztoku ze zkumavky. Poté opět balonek

zahřejte nad vaříčem, čímž se chloroform vypaří a jeho páry z balonku vytlačí většinu vzduchu. Následně zahřátý balonek ponořte kapilárním koncem pod hladinu roztoku a vyčkejte, dokud nedojde k nasátí veškerého roztoku do balonku. Pomocí naplněného balonku naneste asi 2 cm od spodního okraje připravené preparativní TLC desky souvislý proužek roztoku (od levého i pravého okraje ponechte několik milimetrů volných, aby roztok nestékal na hranu desky). Na chromatografickou desku naneste rozhodující množství roztoku, pár kapek roztoku z balonku vykápněte do čisté lékovky a ponechte pro další práci. Po vypuštění celého obsahu balonku balonek ještě vypláchněte malým množstvím rozpouštědla a kapalinu naneste na vysušenou stopu dříve naneseného vzorku. Při nanášení vzorku postupujte tak, aby bylo po celé šířce lité vrstvy nanese rovnoměrné množství vzorku a zároveň byl vznikající proužek co nejužší. TLC desku s naneseným vzorkem ponechte do příštích laboratorních cvičení na bezpečném místě, aby nedošlo k poškození vrstvy silikagelu.

4.3 Laboratorní cvičení č. 3

4.3.1 Zpracování preparativní TLC desky

Pomůcky: skleněné akvárium, molitan zabalený v polyethylenu, Erlenmeyerova baňka, odměrný válec, skleněná deska, knihy

Chemikálie: n-hexan, ethylacetát

Postup: připravte si směs n-hexanu a ethylacetátu v poměru 5:1. Směs rozpouštědel vlijte do akvária tak, aby vytvořila asi 0,5 cm vysokou vrstvu. Preparativní TLC desku vložte do akvária se směsí rozpouštědel tak, aby se stopa nanesených látek nesmáčela a rozpouštědlo k ní muselo vzlínat. Akvárium uzavřete a utěsněte molitanem zabaleným v polyethylenu, na něj položte skleněnou desku a několik knih, aby molitan dobře přilnul k akváriu a dobře těsnil. Až čelo rozpouštědel dosáhne 1 cm pod horní okraj desky, vyjměte chromatografickou desku z akvária a nechte ji volně na vzduchu do příštích laboratorních cvičení.

4.3.2 Zahřívání betulinu a KHSO_4 na bodotávku

Pomůcky: bodotávek, pinzeta, krycí sklíčka, špachtle

Chemikálie: betulin, KHSO_4

Postup: do lékovky navažte 20 mg betulinu a 20 mg KHSO_4 . Poté k navážené směsi přidejte stejné objemové množství KHSO_4 . Následně připravenou směs v lékovce

řádně protřepejte, aby vznikla homogenní směs. Z připravené směsi odeberte malé množství na krycí sklíčko, které poté překryjte druhým krycím sklíčkem. Připravený vzorek vložte na bodotávek. Sklíčka překryjte rámečky s krycími skly. Zaostřete na krystaly vzorku a zapněte zahřívání bodotávku. Teplotu nechte vystoupat na 260°C a udržujte ji po dobu 20 minut. Poté nechte bodotávek vychladnout a sejměte zreagovaný vzorek, který uložte na bezpečné místo pro další práci.

4.4 Laboratorní cvičení č. 4

4.4.1 Zpracování preparativní TLC desky

Pomůcky: skleněné trubice, špachtle, stojany, držáky na zkumavky, křížové svorky, skleněné baňky (25 nebo 50 ml), varné kamínky, dlouhé pravítko, 2 velké křídové papíry, odměrný válec, nálevka, kádinka, skleněná tyčinka

Chemikálie: n-hexan, ethylacetát

Postup: za pomoci vyučujícího vypalte na preparativní TLC desce elektricky žhaveným odporovým drátem dva pruhy ve směru start-čelo. V místech, kde se nachází organické látky z rozdělené směsi, dojde ke zčernání silikagelu. Jednotlivé oblasti, ve kterých se objevily organické látky, na desce přehledně vyznačte a poté zuhelnatělé stopy z desky seškrábněte špachtlí. Následně přistupte k sejmutí silikagelu ze skleněné desky. Postupujte od oblasti, která je nejvíce vzdálena od místa, kam jste pomocí balonku nanášeli organické látky. Vždy postupně snímejte silikagel tak, jak jste si na desce vyznačili jednotlivé oblasti. Dlouhé pravítko zaryjte do vrstvy silikagelu v místě, kde jste si označili první oblast s výskytem organických látek. Opatrnými tahy ze strany na stranu vrstvu silikagelu z desky stáhněte na list papíru. Sejmutý silikagel pomocí pravítka rozetřete na jemný prášek.

U připravené skleněné trubice utěsněte její spodní konec smotkem vaty. Rozmělněný silikagel po částech vyspávejte do skleněné trubice. Vždy po přidání části silikagelu opatrně poklepejte dolním koncem trubice o dřevěnou desku, aby se silikagel sklepal. Trubicu po vsypání veškerého silikagelu upevněte ke stojanu. Pod trubicí umístěte předem zváženou skleněnou baňku. Stejně postupujte u zbývající části TLC desky. Následně si připravte směs n-hexanu a ethylacetátu v poměru 1:1. Směs rozpouštědel nalijte opatrně do skleněných trubic se silikagelem tak, aby byly trubice zcela plné. Do příštích laboratorních cvičení rozpouštědla protečou sloupcem silikagelu do baněk.

Poznámka: vatu do spodního konce skleněné trubice dobře dostanete pomocí dlouhé skleněné tyčinky.

4.5 Laboratorní cvičení č. 5

4.5.1 Zpracování získaných frakcí z preparativní TLC

Pomůcky: topné hnízdo (50 ml), chladič, stojan, držák na chladič, chromatografická komora, pinzeta, kahan, skleněná trubice, sirky, nůžky, chromatografická folie (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄), elektrický vaříč, pipety, skleněná baňka s uzávěrem, odměrný válec, rozprašovač

Chemikálie: n-hexan, ethylacetát, 10%ní H₂SO₄, vzorek čistého γ -apoallobetulinu

Postup: sestavte destilační aparaturu a následně oddestilujte rozpouštědla z baněk po promytí trubic. Nedestilujte do sucha, až zůstane v baňce malé množství roztoku, odpojte chladič a vyjměte baňku z topného hnízda. Během doby, kdy bude probíhat destilace, si ze skleněné trubice vytáhněte kapiláry.

Připravte směs n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2. Malé množství této směsi nalijte do chromatografické komory a uzavřete ji. Z chromatografické folie ostříhňte velikostně odpovídající kousek a pomocí kapilár na folii bodově naneste vzorky roztoků sledovaných látek. Body by od sebe měly být vzdáleny asi 0,5 cm a stejně tak od spodního konce folie. Po odpaření rozpouštědel postavte chromatografickou folii pomocí pinzety spodním koncem do rozpouštědel v chromatografické komoře (roztok by měl dosahovat několik milimetrů pod nanesené vzorky). Folii ponechte v chromatografické komoře, než rozpouštědla vystoupají pár milimetrů pod horní okraj folie. Poté pomocí pinzety vyjměte folii z chromatografické komory. Ihned po vyjmutí z komory postříkejte folii 10%ní H₂SO₄. Po postřiku položte folii na elektrický vaříč. Vaříč zapněte a ponechte na něm folii, než se na ní vypálí tmavé skvrny. Organické látky se na folii ukáží jako zuhelnatělé stopy. Pracujte tak, abyste při jedné chromatografii porovnávali maximálně 5 vzorků. Poté, co porovnáte jednotlivé vzorky získané preparativní TLC, porovnejte vzorky také s γ -apoallobetulinem. Na závěr vyhodnoťte, které vzorky z vámi dělené směsi obsahovaly γ -apoallobetulin. Baňky se vzorky nechte vyschnout, zvažte je a udělejte látkovou bilanci. Za výchozí hmotnost považujte 100 mg betulinu, který byl použit do reakční směsi.

4.5.2 Porovnání reakce na bodotávku a v tavenině KHSO₄

Pomůcky: chromatografická komora, pinzeta, nůžky, chromatografická folie (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄), elektrický vaříč, pipeta, rozprašovač

Chemikálie: směs n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2, 10%ní H₂SO₄, vzorek čistého γ -apoallobetulinu, chloroform

Postup: do chromatografické komory nalijte malé množství směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:2, kterou jste připravili v předchozím kroku, a komoru uzavřete. Z chromatografické folie odstříhněte velikostně odpovídající kousek. Vezměte si vzorek zreagované směsi betulinu s KHSO₄, který jste zahřivali v tavenině KHSO₄ (vzorek jste odebrali na laboratorních cvičeních č. 2). K tomuto vzorku přikápněte z pipety trochu chloroformu a pomocí skleněné kapiláry naneste vzorek na chromatografickou folii. Dále si vezměte sklíčka se zreagovanou směsí betulinu a KHSO₄ z bodotávku. Sklíčka od sebe oddělte a na jedno z nich kápněte kapku chloroformu. Ze sklíčka chloroform ihned nasajte do skleněné kapiláry a naneste bodově stopu na chromatografickou folii. K oběma naneseným vzorkům přidejte ještě stopu čistého γ -apoallobetulinu, chromatografickou folii vložte do chromatografické komory. Poté ji detekujte postříkem 10%ní H₂SO₄ a vypálením na elektrickém vaříči.

4.6 Shrnutí

Během laboratorních cvičení popsaných v didaktické části této práce si studenti procvičí manuální zručnost, prakticky se seznámí s preparativním i analytickým provedením TLC a prací s malými kvanty látek. Studenti se také seznámí s netradičními postupy, které lze v organické chemii použít, tedy zahřívání v tavenině KHSO₄ a reakce na bodotávku. Zároveň jim práce umožní porovnat různé možnosti provedení reakce týchž látek.

Postupy preparativní a analytické TLC vycházejí z návodů práce popsaných v literatuře²³.

5 Závěr

Na základě ověření některých experimentů popisovaných v literatuře bylo překročeno k navrhování a ověřování nových pokusů. Protože je na katedře chemie FPE ZČU v Plzni historicky studována problematika triterpenoidních sloučenin, byl jako výchozí sloučenina pro další přeměny zvolen betulín, jehož izolace je součástí laboratorních cvičení z organické chemie.

Po neúspěšných pokusech o jeho dehydrogenaci měděným práškem v mikrovlnné troubě, byly prováděny experimenty směřující k izomeraci kruhu E v kyselém prostředí. Jako kyselé prostředí byl zvolen hydrosíran draselný při teplotě tání. Ukázalo se, že tato cesta vede ke směsi allobetulinu a jeho dehydrogenačního produktu γ -apallobetulinu. Řadou experimentů, při kterých se měnily reakční podmínky, bylo dosaženo toho, že hlavním produktem reakce se stal právě γ -apallobetulin, který je výchozí látkou pro další reakce.

Touto přeměnou se otevřela cesta k některým experimentům využitelným ve výuce (viz. kapitola 4). Zde je třeba připomenout vazby na řadu teoretických i experimentálních problémů z oblasti organické chemie (chemie triterpenoidních sloučenin, izomerace, dehydrogenace) i základy laboratorní techniky (izolační postupy včetně chromatografických metod).

Využití bodotávku při vývoji postupu přeměny betulínu na γ -apallobetulin je významné pro pochopení a nácvik zcela nových laboratorních technik s využitím téměř nevážitelných množství látek. Výsledkem je velká úspora času a především materiálu, což se promítne jak do ekonomické tak ekologické oblasti.

6. Seznam použité literatury

1. Tenora L.: Aplikace mikrovlnného záření na intramolekulární cyklizační reakce, bakalářská práce Masarykova univerzita, Brno 2008
2. Hájek M., Mikrovlny v akci, Ústav chemických procesů, AV ČR, golem.fjfi.cvut.cz/wiki/Diagnostics/Basic/.../Mikrovlny%20v%20akci.pdf, staženo 27.4. 2015
3. Lišková M.: Syntézy za neklasických podmínek, diplomová práce Masarykova univerzita, Brno 2008
4. http://techmania.cz/edutorium/art_exponaty.php?xkat=fyzika&xser=456c656b74726f6d61676e657469636be920766c6e79h&key=522 , staženo 25. 4. 2015
5. Šauliová J., Ryndová J., Mikrovlny v laboratorních cvičeních z organické chemie, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, 2003, ISBN 80-7044-488-6
6. Kohout J., Téma „mikrovlny“ podpořené jednoduchými pokusy, diplomová práce, FPE ZČU v Plzni, Plzeň 2009
7. Lindström P., Thierny J., Wathey B., Westman J.: Microwave assisted organic sythesis-a review. In *Tetrahedron*, **2001**, 57, s. 9225 - 9283
8. <http://fyzweb.cz/clanky/index.php?id=44>, staženo 26.4.2015
9. Reilly M. K., King R. P., Wagner A. J., King S. M., Microwave-Assisted Esterification: A Discovery-Based Microscale Laboratory Experiment, *Journal fo Chemical Education* 2014, 91, 1706 -1709
10. Baar M. R., Gammerdinger W., Leap J., Morales E., Shikora J., Weber M. H., Pedagogical Comparson of Five Reactions Performed under Microwave Heating in Multi-Mode versus Mono-Mode Ovens: Diel-Alder Cycloaddition, Wittig Salt Formation, E2 Dehydrohalogenation To Forma n Alkyne, Williamson Ether Synthesis, and Fisher Esterification, *Journal of Chemical Education* 2014, 91, 1720-1724
11. Dziedzic R. M., Gillian-Daniel A. L., Petersen G., M., Martinez-Hernandez K. J., Microwave Synthesis of Zinc Hydroxy Sulfate Nanoplates and Zinc Oxide Nanorods in the Classroom, *Journal of Chemical Education* 2014, 91, 1710-1714
12. Tian J., Yan L., Sang A., Yuan H., Zheng B., Xiao D., Microwave-Assisted Synthesis of Red-Light Emitting Au Nanoclusters with the Use of Egg White, *Journal of Chemical Education* 2014, 91, 1715-1719

13. Rýček L., Vliv struktury a stereochemie aromatického skeletu ortho-allyoxyaromatických karbaldehydů na intramolekulární mikrovlnami iniciované cykloadice, bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2009
14. Barešová A., Mikrovlny a organické reakce (syntéza vybraných organických sloučenin v přítomnosti mikrovln), diplomová práce, Univerzita Hradec Králové Pedagogická fakulta, Hradec Králové 2011
15. Zemanová K., Organická syntéza a zelená chemie, bakalářská práce, Univerzita Hradec Králové Pedagogická fakulta, Hradec Králové 2013
16. http://www.studiumchemie.cz/materialy_info.php?id=85, staženo 26.4. 2015
17. Richtr V., Rajglová J., Využití bodotávku s mikroskopem v experimentální výuce katedry chemie FPE ZČU v Plzni, Sborník prací společné vědecko-výzkumné činnosti studentů a učitelů katedry chemie, ZČU v Plzni Fakulta pedagogická, Plzeň 2005, ISBN 80-7020-153-3
18. Galuszka P., Luhová L.: Laboratorní technika pro biochemiky, Přírodovědecká fakulta Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2003
19. agch.upol.cz/userfiles/file/pdf/Termicka_analyza.pdf, staženo dne 27.4. 2015
20. www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_890-895.pdf, staženo 26.4.2015
21. Gasparič J., Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
22. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
23. Šnaiberková M., 23-hydroxybetulin a jeho jednoduché reakce, bakalářská práce, FPE ZČU v Plzni, Plzeň 2012
24. Richtr V., Kraitr M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie, Sborník katedry chemie ZČU, Plzeň 2004
25. Svobodová M., Optimalizace oxidačních reakcí allobetulinu a jeho derivátů, bakalářská práce, FPE ZČU v Plzni, Plzeň 2013

7. Resumé

This diploma thesis is divided into a theoretical, practical and didactic part. In the theoretical part there are described main characteristics of microwave chemistry, its importance and use of microwave radiation in education. Next description method is differential scanning calorimetry. In the practical part there are described laboratory procedures – microwave heating, method of differential scanning calorimetry and warming on melting point apparatus. The main part creates procedures of preparation and isolation γ -apoallobetulin. In the didactic part is proposed procedure of laboratory exercises of the preparation and isolation γ -apoallobetulin.