

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

Příprava a vybrané reakce γ -apoallobetulinu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Lukáš Novák

Přírodovědná studia, Chemie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Mgr. Václav Ríchnr, CSc.

Plzeň, 2017

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

Plzeň, 30. června 2017

.....
vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc., za jeho odborné vedení při mé práci jak praktické, tak teoretické.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická

Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lukáš NOVÁK**

Osobní číslo: **P14B0035P**

Studijní program: **B1001 Přírodovědná studia**

Studijní obor: **Chemie se zaměřením na vzdělávání**

Název tématu: **Příprava a vybrané reakce γ -apoallobetulinu**

Zadávací katedra: **Katedra chemie**

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

1. Seznámit se s problematikou.
2. Seznámit se se zásadami práce v semimikro a mikroměřítku.
3. Připravit betulin izolací z extraktu březové kůry.
4. Připravit γ -apoallobetulin některou z popsaných metod.
5. Identifikovat připravený γ -apoallobetulin.
6. Pokusit se o provedení některých reakcí.

Rozsah grafických prací:

Rozsah kvalifikační práce: **40 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Mc Murry J.: *Organická chemie*. VŠCHT, Praha 2007.

Vašmucius V.: *Přehled reakcí triterpenoidních sloučenin*. Diplomová práce. FPE ZČU v Plzni, 1995.

Richtr V.: *Semimikrotechnika v organické chemii*. PF ZČU v Plzni, 1993.

Vybrané články časopisu *Collect. Czech. Chem. Commun.* (od roku 1959 do konce roku 2006).

Vybrané články časopisu *J. Chem. Educ.* (od roku 2000 dosud).

Vedoucí bakalářské práce: **Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.**


Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **15. června 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2017**


RNDr. Miroslav Randa, Ph.D.
děkan




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. června 2016

Obsah

Úvod	3
1 Teoretická část	4
1.1 Terpenoidy	4
1.1.1 Triterpenoidy	5
1.1.2 Betulin a jeho deriváty	6
1.1.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti	6
1.1.2.2 Biologická aktivita	7
1.1.2.3 Příprava γ -apoallobetulinu a jeho vybrané reakce	8
1.2 Separační metody	11
1.2.1 Extrakce	11
1.2.2 Destilace	12
1.2.3 Chromatografie	13
1.2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie	15
2 Experimentální část	18
2.1 Provedení tenkovrstvé chromatografie	18
2.1.1 Příprava litých desek pro analytické provedení TLC	18
2.1.2 Příprava litých desek pro preparativní provedení TLC	18
2.1.3 Provedení TLC a detekce	19
2.1.3.1 Analytické provedení	19
2.1.3.2 Preparativní provedení	19
2.2 Izolace betulinu z extraktu březové kůry	20
2.2.1 Zpracování chromatogramu separovaného extraktu březové kůry	21
2.2.2 Analýza frakcí TLC a měření bodu tání	22
2.2.3 Spojování frakcí a rekrystalizace	24
2.3 Reakce betulinu s hydrogensíranem draselným	26
2.3.1 Reakce v mikroměřítku na bodotávku	26
2.3.2 Reakce v semimikroměřítku	27
2.3.2.1 Příprava reakční směsi	28

2.3.2.2	Série reakcí	28
2.3.2.3	Zhodnocení průběhu experimentů	32
2.4	Separace γ -apoallobetulinu	34
2.4.1	Oddělení organické složky od anorganické	34
2.4.2	První preparativní TLC	35
2.4.2.1	Analýza látek získaných ze zóny $\gamma_{1/1}$	37
2.4.3	Druhá preparativní TLC	39
2.4.4	Třetí preparativní TLC	42
2.4.5	Výsledky separace γ -apoallobetulinu	44
	Závěr	45
	Seznam použité literatury	46
	Seznam obrázků	49
	Seznam tabulek	51
	Seznam schémat	52
	Seznam použitých zkratk	53
	Resumé	54

Úvod

Organická chemie se může chlubit svou nesmírnou rozmanitostí oproti jiným (ne však méně důležitým) odvětvím chemie a dovoluje zkoumat nejen strukturu, ale i chemickou podstatu přírodních látek, a vysvětluje sled chemických reakcí a samotný chemismus přeměn organických látek.

Tato práce se zabývá především dvěma organickými látkami, jež řadíme mezi terpenoidy, konkrétně triterpenoidy, a sice betulinem a z něj vznikajícím γ -apoallobetulinem. Betulin je přírodní látka známá již od konce 18. století, jejíž biologické účinky a účinky jejích derivátů na lidský organismus jsou známé a jsou stále předmětem zkoumání. Významnou látkou je nenasycená sloučenina γ -apoallobetulin, která umožňuje řadu reakcí. Její nevýhodou je, že dosud je získávána několikas-
tupňovými přeměnami betulinu. Má práce je směřována na způsob přípravy γ -apoallobetulinu jednostupňovou přeměnou betulinu zahříváním s hydrogensíranem draselným, který vytváří pro přeměnu významné kyselé prostředí.

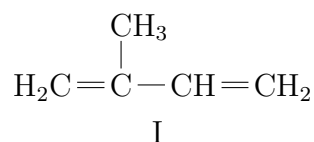
Stat' mé bakalářské práce je koncipována do hlavních dvou celků – na teoretickou a na experimentální část. V teoretické části stručně charakterizují terpenoidy a popisují využití γ -apoallobetulinu při dalších chemických reakcích. Také se částečně zabývám tenkovrstvou chromatografií. Experimentální část popisuje izolaci betulinu z extraktu březové kůry a získávání γ -apoallobetulinu.

Celá práce může sloužit jako návod při zpracovávání již zmíněných látek, ale také látek jim podobným a jejich derivátů. Určitě by se dalo uvažovat i o didaktickém uplatnění jak na vysoké, tak střední škole.

1 Teoretická část

1.1 Terpenoidy

Terpenoidy (obecně; pokud jsou terpenoidy pouze uhlovodíky, označujeme je terpeny) jsou přírodní látky po chemické stránce ze všech kategorií, proto neexistují jednotné fyzikální a chemické vlastnosti, jsou navíc strukturně velmi variabilní a je známo více než 22 000 rozmanitých terpenoidů^[1]; jedno však mají všechny terpenoidy společné, a sice chemický původ. Jejich příbuznosti nasvědčuje jednoduchá pětiuhlíkatá jednotka – isopren (2-methylbuta-1,3-dien) (I).



Složitější struktury terpenických látek, alifatických i cyklických, vznikají oligomerací isoprenových jednotek podle tzv. isoprenového pravidla v pořadí hlava–pata, přičemž hlavou isoprenu označujeme atom uhlíku C1 a patou atom uhlíku C4^[1]. Terpeny tedy můžeme klasifikovat (tabulka 1.1) podle počtu isoprenových jednotek.

Tab. 1.1: Klasifikace terpenů.

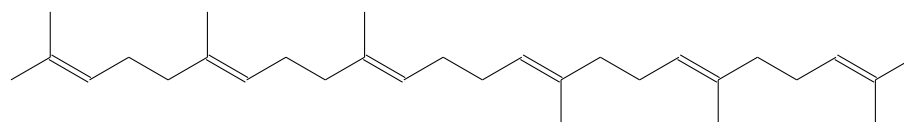
Počet atomů uhlíku	Počet isoprenových jednotek	Označení
10	2	monoterpeny
15	3	seskviterpeny
20	4	diterpeny
25	5	sesterterpeny
30	6	triterpeny
35	7	seskvarterpeny
40	8	tetraterpeny

Odvození terpenoidů od isoprenu je pouze formální. V přírodě během jejich biosyntézy můžeme jmenovat důležité prekursor, jejichž struktura je výhradně acyklická a které tvoří jejich základní stavební jednotku, a sice geraniol, od něhož

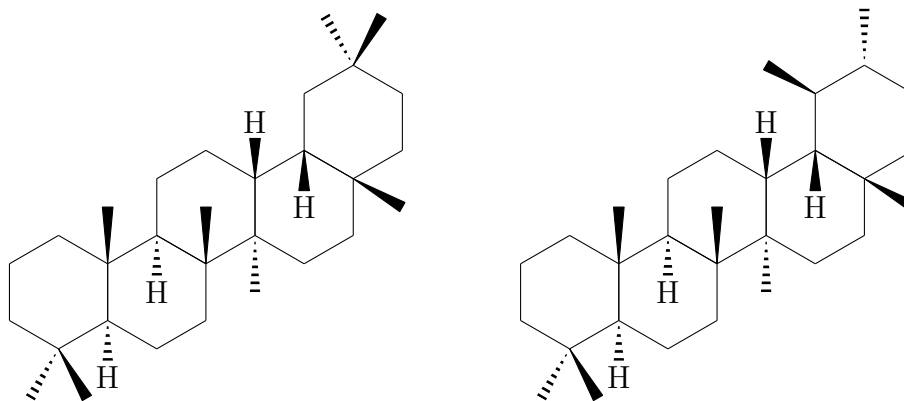
jsou odvozeny monoterpeny (C_{10}), farnesol, jenž je výchozím bodem pro seskviterpeny (C_{15}), a konečně skvalen (II), prekursor triterpenů (C_{30}).

1.1.1 Triterpenoidy

Základním stavebním kamenem triterpenoidů je třicetihlíkatý skvalen (II), jehož struktura je vhodná pro uzavírání do kruhů. Cyklizací skvalenu lze dosáhnout tří skeletů základních pentacyklických terpenů, a sice oleananu (III), ursanu (IV) a lupanu (V); je také prekursorem v biosyntéze lanosterolu, a tedy i steroidů^[1,2].

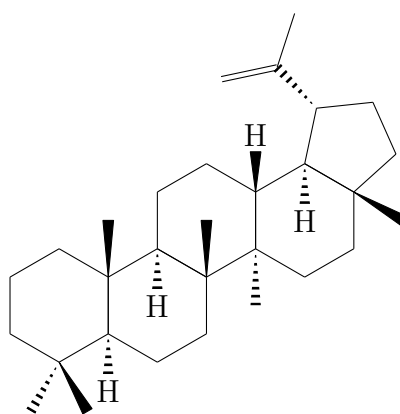


II



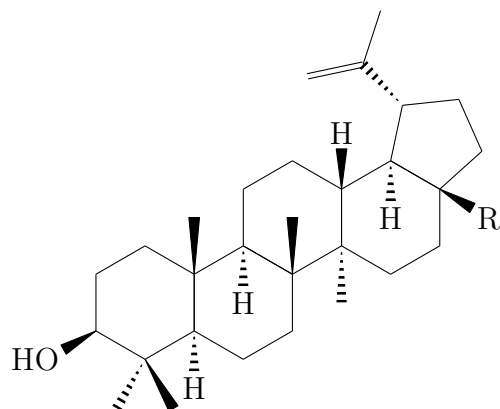
III

IV



V

Terpenoidy lupanového typu vznikají ze skvalenu s tzv. dammaranovým skeletem^[2]. Typickými zástupci těchto terpenoidů jsou lupeol (VI) a jeho 28-hydroxylovaná forma – betulín (VII).



	R
VI	CH ₃
VII	CH ₂ OH
VIII	COOH

1.1.2 Betulin a jeho deriváty

Betulin získal své pojmenování roku 1831; název odvodil Mason z latinského slova označující břízu (*betula*). Již v roce 1788 se Lowitzovi, který jako první pozoroval sublimaci betulinu při zahřívání březové kůry, povedla izolace této sloučeniny^[3,4].

U březové kůry můžeme rozlišit dvě vrstvy, které se liší svým vzhledem i složením, a sice na vnější a vnitřní. Vnější část je významně bohatá na extrakční látky – obsah dosahuje 40 % – především pak na betulin (obsah 10 % až 35 %)^[4], který dává kůře typickou bílou barvu.

1.1.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Betulin a jeho deriváty jsou pentacyklické triterpenoidy lupanového či oleananového skeletu. Po chemické stránce jsou to látky velmi různorodé, konkrétně však betulin (VII) je diol, kyselina betulinová (VIII) hydroxykarboxylová kyselina, allobetulin (IX) epoxyalkohol a dehydratovaná forma allobetulinu – γ -apoallobetulin (X) – epoxyalken.

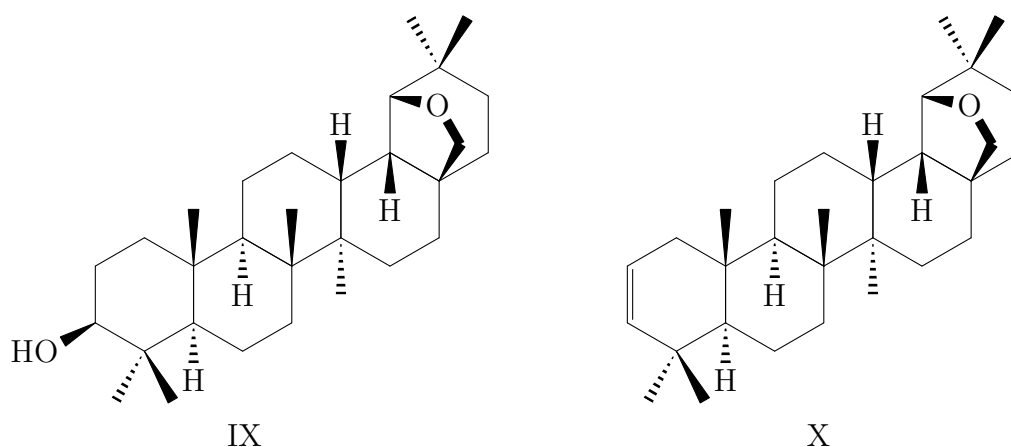
U výše zmíněných zástupců jsou uvedené molární hmotnosti a body tání v tabulce 1.2. Deriváty betulinu jsou krystalické látky, dobře rozpustné v organických rozpouštědlech (např. ethanol, methanol, butanol, chloroform, ethyl-acetát, hexan), přičemž krystalizace z roztoků různých rozpouštědel ovlivňuje i bod tání¹. Dalšími

¹Různé zdroje uvádí odlišné body tání. Nejvíce patrné je to u allobetulinu, jehož bod tání je podle lit.^[10] 275 – 277 °C, zatímco podle lit.^[12] 256 – 262 °C.

vlivy na bod tání může být i polymorfie té které látky; u orthorhombického betulinu byla stanovena teplota tání na 245 °C[cit. 5].

Tab. 1.2: Molární hmotnosti a body tání vybraných zástupců betulinu a jeho derivátů.

	betulin	allobetulin	γ -apoallobetulin
Molární hmotnost ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	442,728[cit. 6]	442,728[cit. 7]	424,713[cit. 8] ²
Bod tání (°C)	256 – 257[cit. 9]	275 – 277[cit. 10]	242 – 243[cit. 11]



1.1.2.2 Biologická aktivita

Biologické účinky lupanových derivátů jsou lidem známy již od 19. století. Přírodovědci té doby si všimli antiseptických vlastností betulinu, který se pak začal používat k sterilizaci ran, a dokonce se mu přisuzovaly vlastnosti antirachitické (což bylo publikováno v roce 1926)^[4].

V současné době se na betulin a jeho deriváty (především pak kyselinu betulinovou (VIII) a její deriváty) pohlíží jako na významné výchozí látky při výrobě účinných léčiv inhibujících replikaci HIV-1. Tyto deriváty mají také inhibující účinky na HSV-1 a třeba allobetulin (IX) má mírné inhibující účinky na vir chřipky typu B^[4]. Kyselina betulinová a její deriváty mají také prokazatelný protirakovinný účinek *in vitro*, neboť selektivně inhibuje angiogenesi indukovanou růstovým faktorem^[13].

²Odkazovaná molární hmotnost je přiřazena strukturnímu izomeru α -apoallobetulinu, tudíž odpovídá i γ -apoallobetulinu.

1.1.2.3 Příprava γ -apoallobetulinu a jeho vybrané reakce

Příprava γ -apoallobetulinu (X) může probíhat několika způsoby. Jedním z nich je tříkroková přeměna betulinu (VII). V prvním kroku se betulin vaří v kyselině mravenčí (což způsobí izomeraci lupanového skeletu na skelet oleananový) za vzniku allobetulinformiátu (XII), který se následně izoluje. Druhým krokem je přeměna allobetulinformiátu na allobetulin (IX), čehož se dosáhne zavedením alkálie třeba hydroxidu sodného v ethanolovém prostředí. Posledním krokem je tosylace v suchém pyridinu tosylchloridem (TsCl) a následným zahříváním, čímž vznikne kýžený γ -apoallobetulin (X). Tato příprava je však velice nepříjemná, zvláště pak kvůli manipulaci s TsCl v pyridinu. Bylo však zjištěno, že tato příprava lze nahradit jednodušší reakcí, která vede od betulinu (VII) ke γ -apoallobetulinu (X) přímo, a sice tavením betulinu s hydrogensíranem draselným^[14] (viz schéma 1.2). Tato reakce byla provedena v mikroměřítku na bodotávku s mikroskopem, již jsem také ověřil a kterou samostatně rozebírám v kap. 2.3.

19 β ,28-epoxy-18 α -olean-2-en, což je podle IUPAC semisystematický název pro γ -apoallobetulin (X), může jako výchozí látka poskytovat mnoho dalších produktů a meziproduktů. Jelikož se jedná o alken, během vybraných reakcí se působí především na dvojnou vazbu mezi uhlíky C2 a C3, podléhá tedy například epoxidaci^[15] (schéma 1.1), čímž lze připravit 2 α ,3 α ;19 β ,28-diepoxy-18 α -oleanan (XI). Získaný epoxid může být další klíčovou výchozí látkou pro jiné organické reakce; za zmínku stojí redukce tetrahydridohlinitanem lithným^[15] nebo reakce s Grignardovým činidlem^[16].

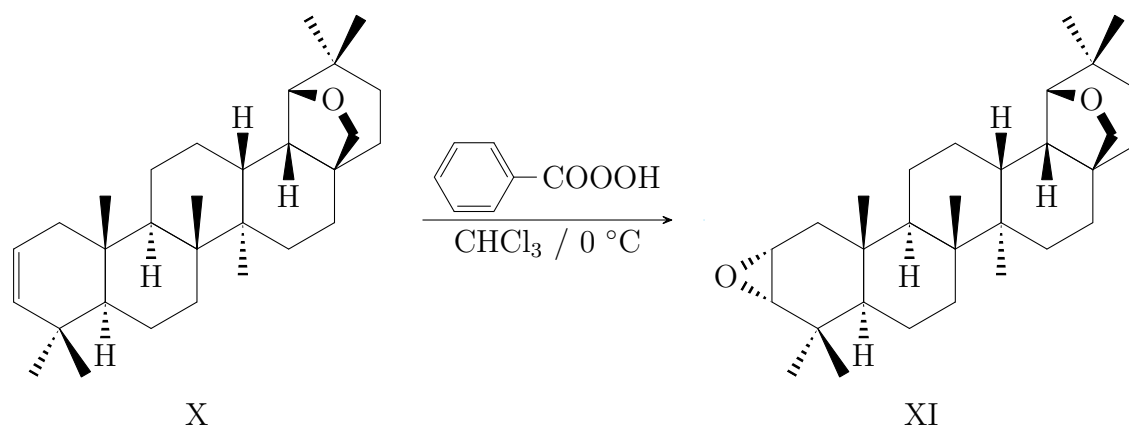
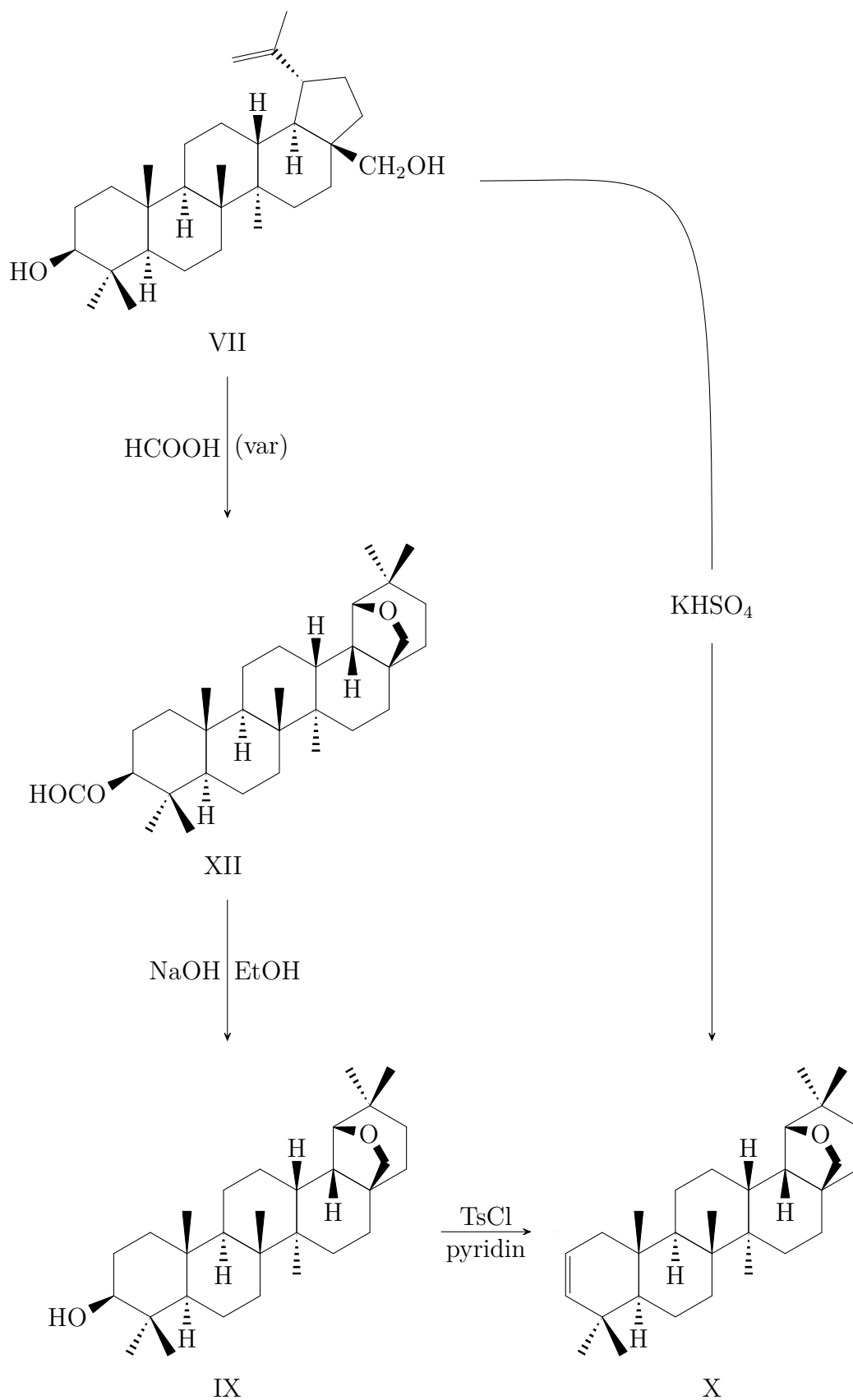


Schéma 1.1: α,α epoxidace γ -apoallobetulinu.

Schéma 1.2: Příprava γ -apoallobetulinu z betulinu.

Dále může γ -apoallobetulin (X) vystupovat v Prinsově reakci s formaldehydem (schéma 1.3), při níž vzniká 2-hydroxymethyl-19 β ,28-epoxy-18 α -olean-2-en (XIII) a v menší míře i 2-hydroxymethyl-3-hydroxy-19 β ,28-epoxy-18 α -oleanan (XIV)^[17].

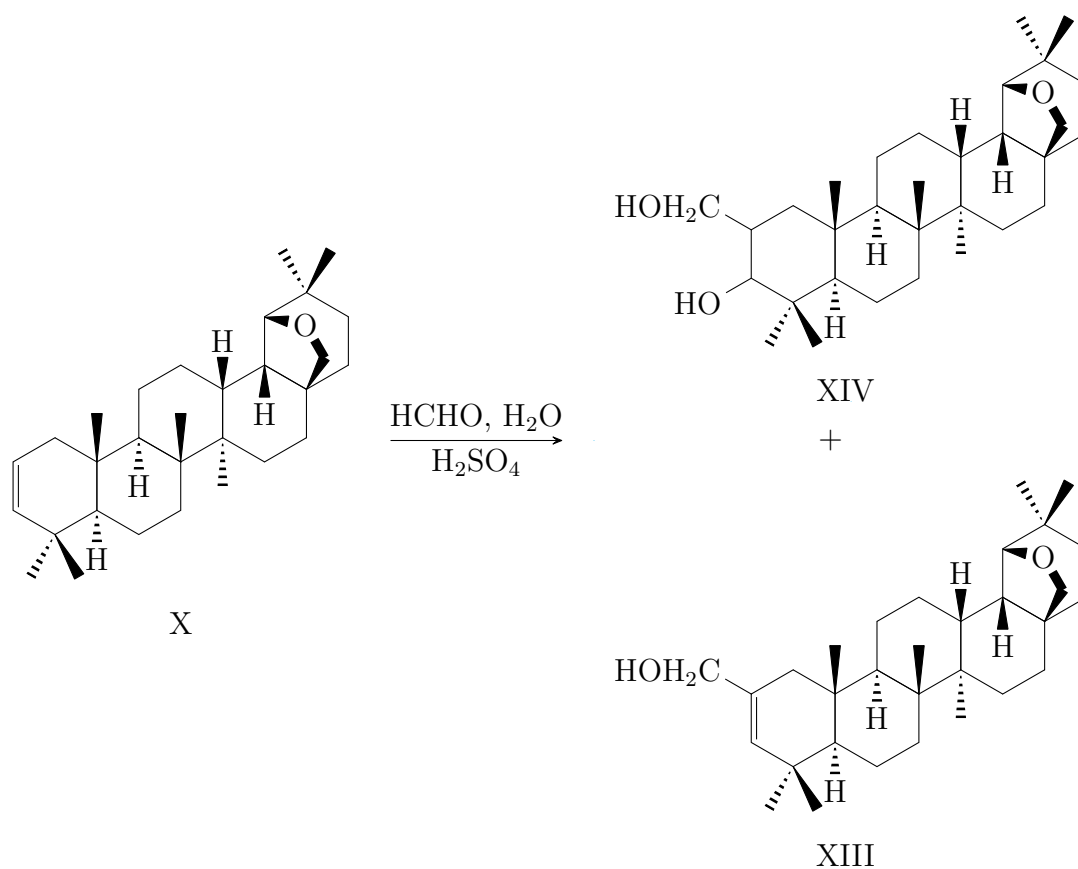


Schéma 1.3: Transformace γ -apoallobetulinu Prinsovou reakcí.

γ -apoallobetulin (X) je také vhodným reaktantem při ozonolýze (vzniká 2-oxo-2,3-*seco*-allobetulon (XV), schéma 1.4), jejíž obecný princip je popsán v lit.^[1], nebo také při různých adičních dějích, jako je hydrogenace nebo halogenace^[18].

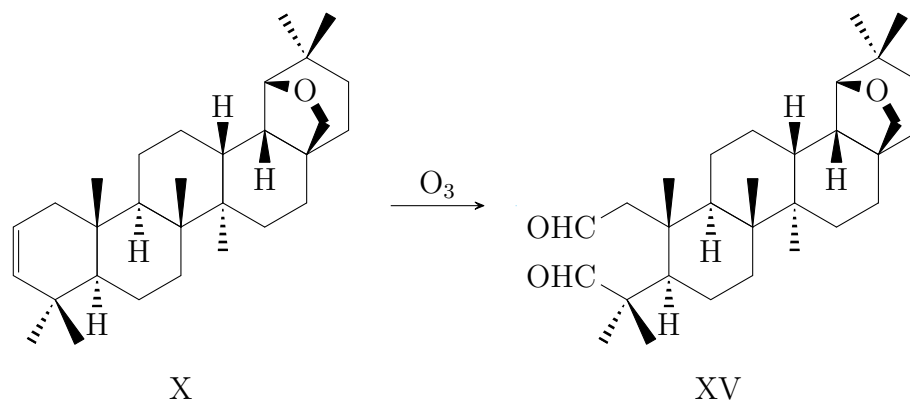


Schéma 1.4: Ozonolýza γ -apoallobetulinu.

1.2 Separační metody

Separační metody jsou založeny na rozdělování vícesložkového systému do několika frakcí, které se liší složením. K separačním metodám lze přistupovat z různých hledisek^[19]; třeba metody zohledňující rozdíly v rovnovážné distribuci mezi dvěma fázemi jsou uvedeny v tabulce 1.3.

Tab. 1.3: Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze. Převzato z lit.^[19].

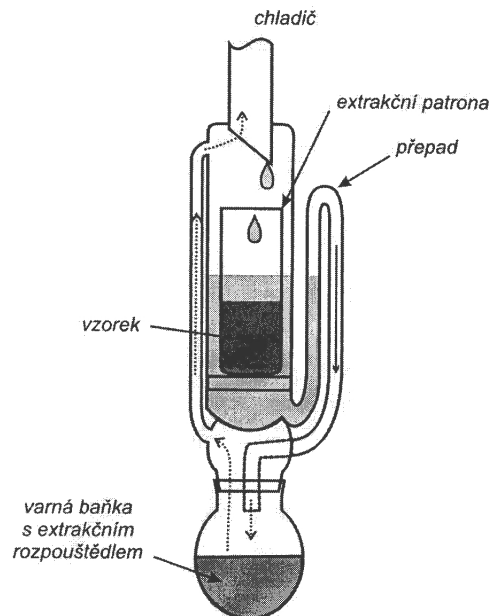
plyn-kapalina	plyn-tuhá fáze	kapalina-kapalina	kapalina-tuhá fáze
GLC	GSC	extrakce	LSC
destilace	sublimace	LLC	IEC
plynové dělení	molekulová síta	GPC	molekulová síta
			srážení
			zonální tavení
			frakční krystalizace

1.2.1 Extrakce

Jako extrakci označujeme separační metodu, která umožňuje selektivní přechod složky mezi dvěma nemísitelnými kapalinami nebo kapalinou a pevnou fází s cílem danou složku izolovat^[19].

Abychom extrahovali žádanou složku z pevného materiálu, používá se buď vhodná kapalina, nebo tekutina v nadkritickém stavu^[19], přičemž důležitým hlediskem je rozpustnost té které látky ve zvoleném rozpouštědle. Zařízení, ve kterých probíhají extrakční pochody, se nazývají extraktory, jichž je několik rozličných typů; příklady kontinuálně pracujících jsou Soxhletův nebo Graefův extraktor.

Princip Soxhletova extraktoru je zřejmý z obrázku 1.1. Z varné baňky se destiluje čisté rozpouštědlo, jehož páry stoupají širokou trubicí a kondenzují v chladiči. Kondenzát potom skapává do extrakční patrony, která je zhotovena z porézního materiálu, se surovým materiálem a postupně vyplňuje prostor těla extraktoru. Jakmile dosáhne



Obr. 1.1: Soxhletův extraktor s vyznačeným tokem par čistého rozpouštědla (vzhůru) a rozpouštědla obohaceného o extrahovanou látku (dolů). Převzato z lit.^[19].

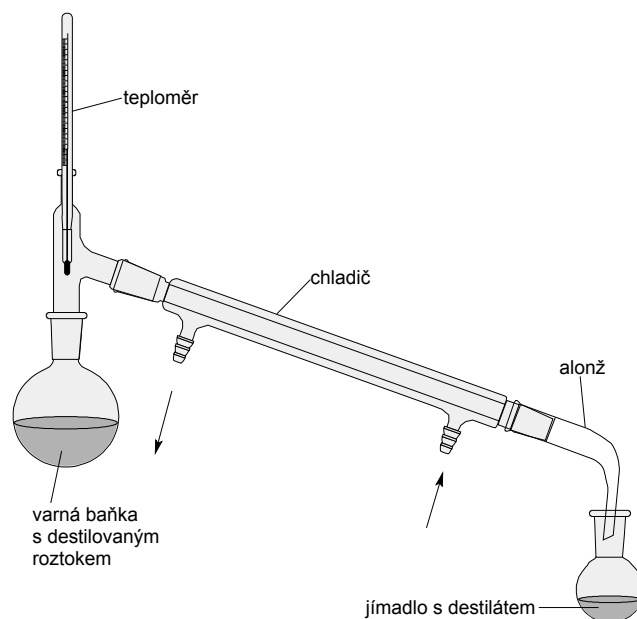
výška hladiny kapalně fáze přepadu extraktoru (vrcholu U-trubice), všechna kapalná fáze s extraktem se převede zpět do varné baňky a extrakční proces se opakuje. Soxhletův extraktor je velmi účinný pro extrakci jak menších, tak i větších množství. Po ukončení extrakce lze extrakční činidlo oddestilovat^[19,20].

1.2.2 Destilace

Destilace je obecně separační metoda založená na oddělování směsi kapalin navzájem lišících se teplotou varu. Máme-li tedy vícesložkový kapalný systém, vnikající plynná fáze se liší od kapalně složením a následný destilát je bohatší na těkavější složku směsi. Chceme-li v jednoduché destilační aparatuře dokonale rozdělit směs dvou kapalin jedinou prostou destilací, udává se, že jejich body varu se musí lišit alespoň o 50 °C a destilované látky nesmějí tvořit azeotropickou směs^[21].

Destilačních metod je více typů, přičemž každá z nich má jiné provedení. Prostá destilace, jejíž aparatura je znázorněna na obrázku 1.2, obvykle slouží k oddělení rozpouštědla od netěkavé látky, příp. oddělení dvou látek s výrazně rozdílnou teplotou varu. Frakční destilace odděluje směs kapalin blízkých teplot varu, často

se využívá tzv. destilačních kolon (potom jde o rektifikaci), nicméně tato metoda je náročnější a pracnější. Další destilační metodou je destilace za sníženého tlaku (vakuová destilace), jež se používá u látek, které podléhají za standardního tlaku při teplotě varu nežádoucí chemické změně. A konečně destilace s vodní párou umožňuje destilovat málo těkavé látky, které se s vodou nemísí, nebo jsou v ní rozpustné jen nepatrně, přičemž je není nutné zahřívat k varu^[22].



Obr. 1.2: Prostá destilační aparatura s vyznačeným tokem chladiva.

1.2.3 Chromatografie

Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších separačních metod vůbec, jejíž historie se odkazuje na rok 1903, kdy byl tento termín poprvé použit ruským biologem M. S. Cvětem. Ačkoliv název této separační metody napovídá spojitost s barevností látek³ (řecky $\chi\rho\omega\mu\alpha$ – barva, $\gamma\rho\alpha\varphi\omega$ – píši), její princip je zcela nezávislý na tom, jak barevně se látka jeví, a je založen na rozdílné migraci složek dělené směsi v systému dvou fází – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou)^[19,23].

Mobilní fází může být plyn, pak jde o plynovou chromatografii, nebo kapalina, potom se jedná o kapalinovou chromatografii. Stacionární fáze může být pevná nebo

³Cvět pozoroval separaci při postupu petroletherového extraktu rostlinných barviv skleněnou kolonou naplněnou práškovým uhlíčitánem vápenatým^[19,23].

kapalná (kapalina je však zachycena v pevném porézním materiálu – nosiči)^[19]. Dělení chromatografických technik podle skupenství stacionární a mobilní fáze je uvedeno v tabulce 1.4.

Tab. 1.4: Dělení chromatografických technik podle skupenství mobilní a stacionární fáze. Převzato z lit.^[19].

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografie (zkratka)
plyn	tuhá látka	GSC
plyn	kapalina na nosiči	GLC
kapalina	tuhá látka	LSC
kapalina	kapalina (polymer) vázaná na nosiči	LLC
kapalina	kapalina v pórech sorbentu	GPC
kapalina	tuhá látka	IEC
tekutina v nadkritickém stavu	kapalina (polymer) vázaná na nosiči	SFC

K rozdělení chromatografických metod lze přistupovat také podle uspořádání stacionární fáze, kdy rozlišujeme chromatografii sloupcovou a plošnou (planární), která je zastoupena chromatografií papírovou a tenkovrstvou (TLC)^[23]. Materiály, které tvoří stacionární fázi nebo nosiče kapalných stacionárních fází, jsou vysoce porézní, mezi něž patří silikagel (hydratovaný SiO_2), alumina (Al_2O_3) nebo florisil ($\text{MgO}\cdot\text{SiO}_2$)^[19].

Rozdílná migrace jednotlivých složek dělené směsi vyvolaná tokem mobilní fáze, jež je dána jejich rozdílnou interakcí se stacionární fází (jsou na ni adsorbovány nebo v ní rozpouštěny), je hlavním mechanismem separace. Vzájemné interakce té které složky a stacionární fáze jsou způsobeny slabými intermolekulárními silami, uplatňují

se tedy van der Waalsovy interakce, vodíkové vazby nebo π - π interakce aromatických systémů^[19].

Záznam o průběhu chromatografie se nazývá chromatogram. Je-li chromatografie provedena instrumentálně, přístroj pro chromatografickou separaci označujeme jako chromatograf^[19].

1.2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie

Ačkoliv se tenkovrstvá chromatografie (TLC) používala zprvu pouze k analytickým účelům, našla vedle sloupcové chromatografie své uplatnění i v preparativních metodách. Velkou výhodou TLC je nejen rychlost, ale také fakt, že jde o levnou formu kapalinové chromatografie^[19,20] (tudíž lze tento typ chromatografie používat i jako didaktickou pomůcku pro demonstraci jejích principů, a lze ji dokonce zařadit mezi laboratorní práce na vysokých nebo středních školách). Separace složek dělené směsi tenkovrstvou chromatografií je založena na odlišné interakci té které složky se sorbentem (stacionární fází), který je nanášen na podložku v tenké vrstvě. Mobilní fázi pak tvoří rozpouštědla vhodné polarity, jejichž výběr a správný poměr vyžaduje zkušenosti a trpělivost^[23].

Je-li TLC v analytickém provedení, bývá stacionární fáze nanášena v tenké vrstvě okolo 250 μm na desku (skleněnou, hliníkovou, plastovou) o rozměrech 5 \times 5 až 20 \times 20 cm, preparativní provedení se potom liší v rozměrech, které jsou aspoň 20 \times 20 cm, ale mohou být i výrazně větší, a tloušťka vrstvy nabývá až 3 mm. Tenká vrstva stacionární fáze je tvořena buď volně sypaným sorbentem, nebo je fixovaná pojivem (škrobem, sádrou), které však mění dělicí vlastnosti vrstvy a schopnost detekce chromatogramu. Nejjednodušší případ TLC je papírová chromatografie, kdy stacionární fázi tvoří papír^[19,20,23].

Samotné provedení tenkovrstvé chromatografie je velmi jednoduché. Je-li připravena chromatografická deska s tenkou vrstvou, je potřeba si vyznačit od okraje desky start, tedy čáru (třeba jemným vrypem špachtlí), na níž se předem připravenou skleněnou kapilárou budou nanášet stopy standardů a vzorků určených k analýze asi 5 až 10 mm od sebe, nebo vzorku určeného k preparaci složek v souvislém proužku tlustém cca 5 mm. Dále je pak vhodné naproti startu označit čarou místo, tzv. čelo, kam vzlínáním dospělo rozpouštědlo. Jsou-li naneseny zkoumané vzorky nebo

standards, posečká se, až se rozpouštědla napomáhající přenosu na start odpaří; poté je možné desku se vzorky vložit do chromatografické komory, přičemž se okraj desky ponoří do mobilní fáze tak, aby nanesené vzorky zůstaly nad hladinou. Chromatografickou komoru zpravidla hermeticky uzavíráme, aby nedocházelo kvůli odpařování rozpouštědel ke změnám složení mobilní fáze. Vlivem kapilárních jevů začne mobilní fáze vzlínat, přičemž s sebou unáší složky vzorků rychlostí závislou na interakcích té které složky s adsorbentem stacionární fáze a na rozpustnosti v mobilní fázi. Jakmile mobilní fáze dosáhne téměř k hornímu okraji desky, chromatografická deska se vyjme z komory a označí se čelo rozpouštědel.

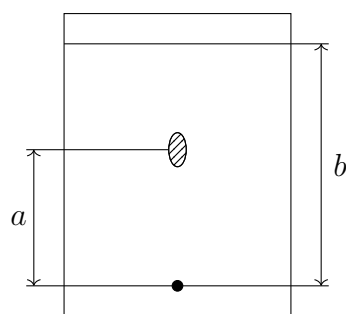
Bylo-li cílem separovat látky, které absorbují elektromagnetické záření ve viditelné oblasti spektra, jejich detekce je zřejmá hned – jsou vidět oddělené barevné stopy na chromatogramu. Pakliže bylo cílem separovat látky, které absorbují elektromagnetické záření mimo oblast viditelného spektra, k jejich detekci lze užít buď destruktivní, nebo nedestruktivní metody. Jednou z destruktivních metod, která napomáhá k vybarvení stopy separované složky, je vypálení třeba na elektrickém vařiči, což zapříčiní karbonizaci (zhnědnutí) organické netěkavé látky (je však třeba dbát na to, aby byla deska suchá, organická rozpouštědla odpařená, jinak by mohlo dojít ke vznícení, a tím i k znehodnocení celé preparativní desky). Tento proces můžeme urychlit a zvýraznit postříkem chromatogramu 10% kyselinou sírovou (ne však, pokud bylo použito organického pojiva např. škrobu)^[23]. K detekci vybarvením stopy lze využít činidla neselektivní (H_2SO_4 , I_2) i selektivní (např. ninyhydrin pro aminy)^[19]. Pokud je však potřeba použít nedestruktivní metody (třeba pro preparativní TLC), lze jednotlivé stopy separovaných složek detekovat UV zářením za použití adsorbentu s fluorescenčním indikátorem^{[19]4}.

Chceme-li jednotlivé stopy chromatogramu charakterizovat matematicky, můžeme vypočítat podíl vzdálenosti středu stopy od startu a a vzdálenosti čela a startu b (viz obr. 1.3), potom podíl (1.1) definuje veličinu retardační faktor R_F

$$R_F = \frac{a}{b}, \quad (1.1)$$

který je závislý na volbě stacionární i mobilní fáze.

⁴Takto upravené sorbenty jsou zpravidla značeny číslem 254, což značí, že sorbent fluoreskuje ve světle rtuťové lampy^[19].



Obr. 1.3: Vyhodnocení chromatogramu retardačním faktorem R_F .

Při výběru stacionární fáze je nutné hledět na vlastnosti jak adsorbentu, tak chromatografované látky. Základní rozdíl mezi aluminou (Al_2O_3) a silikagelem (SiO_2) je odlišná koordinační schopnost hliníku, resp. křemíku. Alumina jako stacionární fáze reaguje s chromatografovanými látkami především elektrostatickými silami, je vhodnější pro středně polární látky a má také mírně bazický charakter (dochází k retenci kyselých složek). Silikagel, který je silně polární a jehož silanolové skupiny na povrchu interagují s látkami tvorbou vodíkových vazeb, vykazuje kyselý charakter (dochází k silné retenci bazických složek)^[19,23].

Mobilní fáze je tvořena zpravidla směsí různě polárních rozpouštědel. Při vhodném výběru se orientujeme samozřejmě podle vlastností chromatografované látky, ale také dle tzv. eluční síly, což označuje schopnost vytěsnění složky adsorbované na povrchu stacionární fáze. Pokles eluční síly je udáván eluotropickou řadou: voda, methanol, ethanol, propan-1-ol, aceton, ethyl-acetát, diethylether, chloroform, benzen, toluen, tetrachlormethan, cyklohexan, hexan^[19,23].

2 Experimentální část

2.1 Provedení tenkovrstvé chromatografie

2.1.1 Příprava litých desek pro analytické provedení TLC

Na čistou skleněnou desku jsem vyskládal a k sobě zarovnal 36 podložních sklíček o rozměrech 26×75 mm. Do baňky jsem si připravil 40 g silikagelu Merck (Kieselgel 60 G), který jsem důkladně rozmíchal v 100 cm^3 destilované vody. Vzniklou suspenzi jsem opatrně nalil na srovnaná mikroskopická sklíčka a skleněnou tyčinkou na obou koncích opatřenou prstenci z pryže rovnoměrně rozetřel po celé ploše sklíček. Takto upravená skleněná tyčinka zajistí na všech mikroskopických sklíčkách vymezenou tloušťku tenké vrstvy. Po úplném zaschnutí tenké vrstvy se jednotlivá sklíčka odlamují od ostatních a slouží pro analytické účely.

2.1.2 Příprava litých desek pro preparativní provedení TLC

Připravil jsem si skleněnou desku o rozměrech 20×20 cm a důkladně ji omyl vodou, destilovanou vodou, ethanolem a znovu destilovanou vodou a nechal ji oschnout. Dále jsem si do baňky odvážil 20 g silikagelu Merck (Kieselgel 60 G) obsahující sádro jako pojivový materiál, z odměrného válce přilil 50 cm^3 destilované vody a v baňce důkladně protřepal, čímž vznikla suspenze vhodné konzistence.

Na desku zbavenou všech nečistot (anorganických i organických), kterou jsem jednou rukou zespoda držel, jsem druhou rukou naléval připravenou suspenzi nejprve krouživými pohyby od středu ke stranám desky, potom meandrovitě od jedné strany k protilehlé. Hrdlem baňky jsem dále roztíral suspenzi po celé ploše a s určitou mírou opatrnosti a zručnosti jsem vyrovnal nanesenou tenkou vrstvou poklepáváním bříšky prstů na spodní stranu desky. O správnosti vyrovnání nalitého sorbentu jsem se přesvědčil bočním pohledem na desku v protisvětle. Nakonec jsem nechal desku s tenkou vrstvou volně schnout na vzduchu.

Tímto způsobem jsem si připravil i další desky potřebné k mé práci.

2.1.3 Provedení TLC a detekce

2.1.3.1 Analytické provedení

Téměř výhradně jsem pro analytické účely využíval chromatografickou fólii DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ od firmy Merck, která byla rozměrů 20 × 20 cm. Jelikož jsem analyzoval nanejvýš 6 vzorků při jedné chromatografii, z fólie původních rozměrů jsem si vždy vystříhoval menší, odpovídající velikosti.

Ještě před provedením samotné chromatografie jsem si připravil ze skleněných trubic kapiláry. Dále jsem odňal malá množství analyzovaných materiálů a rozpustil je v kapce chloroformu. Rozpuštěné vzorky jsem nasál do kapilár, jimiž jsem nanášel roztoky vzorků asi 5 mm od sebe na start menší chromatografické fólie, který jsem si označil jemným vrypem špachtlí. Po odpaření rozpouštědla ze startu jsem si do menší chromatografické komory připravil tu kterou směs rozpouštědel, tvořící mobilní fázi, a vložil do ní chromatografickou fólii a hermeticky uzavřel. Až rozpouštědla vztlínáním dosáhla asi 1 cm pod okraj fólie, vyjmul jsem fólii z chromatografické komory a označil si čelo.

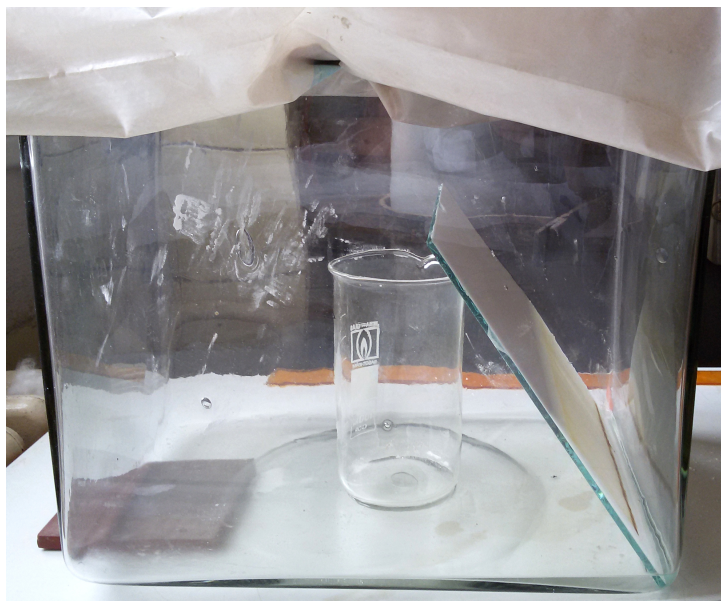
K detekci stop na chromatogramu jsem postříkal fólii 10% roztokem kyseliny sírové a vypálil na elektrickém vařiči.

2.1.3.2 Preparativní provedení

Pro preparativní TLC jsem používal připravené lité desky o rozměrech 20 × 20 cm. Na start, který byl asi 25 mm od hrany desky, jsem rovnoměrně v jednom souvislém proužku širokém asi 5 mm nanasl roztok té které látky určené k TLC (ne však přes celý start, nechal jsem několik milimetrů od obou konců, aby nanášená látka nestekla z desky). K nanášení chromatografované látky mi sloužil skleněný balónek, který jsem si vyfoukl ze skleněné trubice (podrobný postup při zhotovování skleněného balónku a manipulaci s ním při přenášení kapalin je popsán v lit.^[20]).

Jakmile se rozpouštědla z chromatografické desky odpařila, připravil jsem si rozměrnější chromatografickou komoru. Jako chromatografická komora mi posloužilo skleněné akvárium, do nějž jsem si připravil rozpouštědla ve vhodném poměru a vložil s opatrností chromatografickou desku tak, aby nanesená látka byla nad hladinou rozpouštědel. Zároveň jsem akvárium mírně naklonil a podložil, chromatografickou

desku zapřel o vloženou kádinku (která měla prostý účel jako opěradlo) a nakonec akvárium utěsnil, abych zamezil úniku rozpouštědel (viz obr. 2.1).



Obr. 2.1: Preparativní litá deska v chromatografické komoře.

Jakmile vzlínáním rozpouštědla dosáhla asi 15 mm pod okraj desky, vyjmul jsem chromatografickou desku a naznačil čelo. Teprve až chromatogram zcela vyschnul (odpařila se rozpouštědla), bylo možné přejít k detekci vypálením odporovým drátem. V místě netěkavé organické látky došlo ke karbonizaci, a tudíž k zviditelnění stop. Pro zpracování takového chromatogramu bylo dále zapotřebí označení zón, v nichž se separované složky chromatografované látky nacházely, odstranění (třeba špachtlí) rozkladných produktů vzniklých karbonizací po detekci a oddělení těch kterých zón, které jsem zpracovával odděleně.

2.2 Izolace betulinu z extraktu březové kůry

Extrakci z březové kůry lze provádět několika způsoby. V běžných školních laboratorních podmínkách se extrakt z březové kůry získává několikahodinovým promýváním ethanolem třeba v Soxhletově extraktoru, jak je popsáno v lit.^[2].

Svou práci jsem započal zpracováváním surového extraktu březové kůry, který jsem nejprve pomocí preparativní TLC čistil od nežádoucích příměsí. Na litou analytickou desku, připravenou již popsáním způsobem v kap. 2.1.1, jsem nanesl chloroformový

roztok vzorku extraktu březové kůry a standard čistého betulinu pro porovnání a po vyvinutí chromatogramu směsí rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3 vypočítal retardační faktor stopy betulinu ($R_F = 0,377$). Posléze jsem přistoupil k preparaci betulinu tenkovrstvou chromatografií (viz kap. 2.1.3.2), přičemž mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Abych však předešel destruktivní detekci vypálením odporovým drátem, prováděl jsem sondování odebíráním malých vzorků v místech s retardačním faktorem okolo 0,377 (podle výpočtu z analytického provedení TLC) a jejich následnou analýzou TLC v porovnání se standardem betulinu. Nicméně toto sondování nedokázalo prokázat přítomnost betulinu (avšak ani žádné jiné organické látky). Z tohoto důvodu jsem se uchýlil k destruktivní detekci odporovým drátem a zjistil jsem, že organické stopy – včetně betulinu – zůstaly velmi blízko startu¹.

2.2.1 Zpracování chromatogramu separovaného extraktu březové kůry

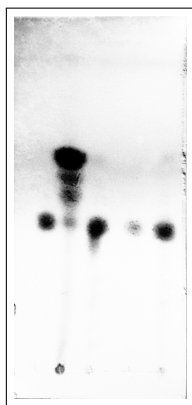
Na chromatogramu vyvinutém vypálením odporovým drátem jsem vyznačil čtyři zóny (zóny se sestávaly ze čtyř pásů rovnoběžných s hranou desky), které jsem potom zpracovával odděleně. Číslo 1 jsem přiřadil zóně nejdále startu a číslo 4 nejbližší startu. Následně jsem si připravil čtyři chromatografické trubice (jichž lze užít i u sloupcové chromatografie), které jsem zbavil nečistot vypláchnutím vodou, destilovanou vodou, chloroformem, potom znovu destilovanou vodou a nechal je vyschnout. Do suchých chromatografických trubic jsem potom vložil malý smotek vaty, který jsem upěchoval u ústí trubice (vata slouží jako náhrada za jinak vbudovanou fritu). Dále jsem si připravil a obdobným způsobem jako u trubic zbavil nečistot čtyři stomililitrové varné baňky s úzkým hrdlem, nechal je vyschnout, vložil do nich varný kamínek a i s kamínkem je zvažil. Nakonec jsem si označil trubice i varné baňky od B1 do B4 a zkompletoval je.

Následně jsem se vrátil k chromatogramu, z něhož jsem špachtlí odstranil zahnědlé části tenké vrstvy po vypálení odporovým drátem, abych se zbavil rozkladných

¹Vzhledem k tomuto faktu usuzuji, že litá preparativní chromatografická deska nebyla dostatečně vyschlá před použitím.

produktů (ty by byly při dalším zpracovávání nežádoucí). Potom jsem čistým suchým plastovým třiceticentimetrovým pravítkem odstranil přebytečný sorbent, jenž nevykazoval přítomnost zkoumaného betulinu, a následně snímal a odděloval jednotlivé pásy sorbentu ve vyznačených zónách chromatogramu. Po každé sejmuté zóně jsem sorbent na hladkém papíře rozmělnil a naplnil jím postupně chromatografické trubice; sorbentem ze zóny 1 jsem naplnil trubici označenou B1, sorbentem ze zóny 2 trubici označenou B2 atp. Jakmile byla trubice naplněna příslušným sorbentem, jemným poklepáváním ve vertikální poloze o dřevěnou podložku jsem docílil upěchování materiálu, čímž jsem před extrakcí značně homogenizoval sloupec sorbentu (zmizely vzduchové kapsy). Dále jsem chromatografickou trubici upevnil do držáku a pod její ústí umístil příslušnou varnou baňku. A konečně jsem se mohl uchýlit k extrakci adsorbované látky na silikagelu; důkladně jsem promyl každý sloupec sorbentu asi 50 cm³ ethyl-acetátu a eluát jím do varných baněk připravených pod trubici. Dále jsem ze získaných frakčních eluátů k suchu oddestiloval rozpouštědlo, a po vychladnutí tak mohl přistoupit k vážení a analýze jednotlivých frakcí (hmotnosti krystalických podílů frakcí jsou zaznamenány v tab. 2.1).

2.2.2 Analýza frakcí TLC a měření bodu tání



1 2 3 4 5

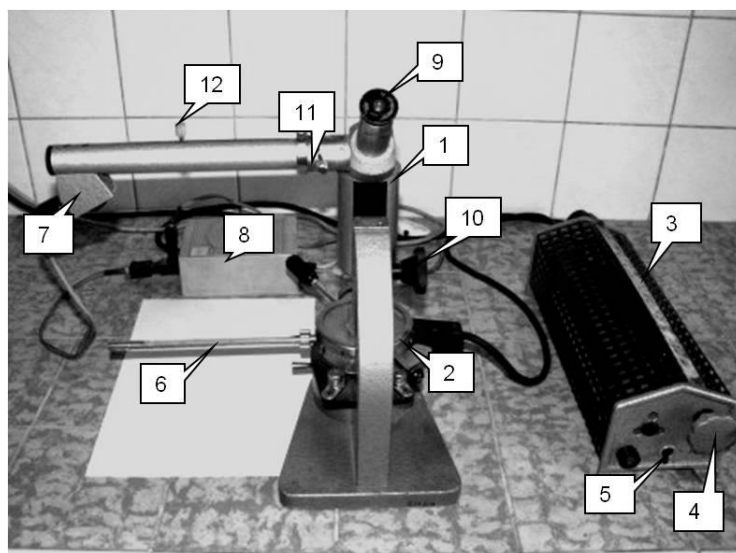
Obr. 2.2: TLC frakcí extraktu březové kůry. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. frakce B1, 3. B3, 4. B4.

Provedl jsem analýzu TLC vzorků z frakcí B1, B2, B3 a B4 na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) již v kap. 2.1.3.1 popsaným způsobem. Mobilní fázi tvořila

2.2. IZOLACE BETULINU Z EXTRAKTU BŘEZOVÉ KŮRY

směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Výsledky, prezentované na obr. 2.2, dokládaly skutečnost, že frakce B1 obsahovala velké množství jiné organické látky než betulinu (zřejmě lupeolu^[23]).

Abych se přesvědčil o čistotě získaného betulinu, změřil jsem na bodotávku s mikroskopem (viz obr. 2.3) teploty tání získaných betulinových frakcí (viz tab. 2.1).



Obr. 2.3: Bodotávek s mikroskopem: 1. mikroskop, 2. elektrický vyhřívaný kovový blok, 3. reostat, 4. regulační klička reostatu, 5. vypínač vyhřívaného 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 lit.^[14].

Tab. 2.1: Hmotnosti a teploty tání krystalických podílů frakcí B2 až B4.

Frakce	Hmotnost	Teplota tání
B2	10,0 mg	210 – 213 °C
B3	8,6 mg	228 °C
B4	8,0 mg	229 – 230 °C

2.2.3 Spojování frakcí a rekrystalizace

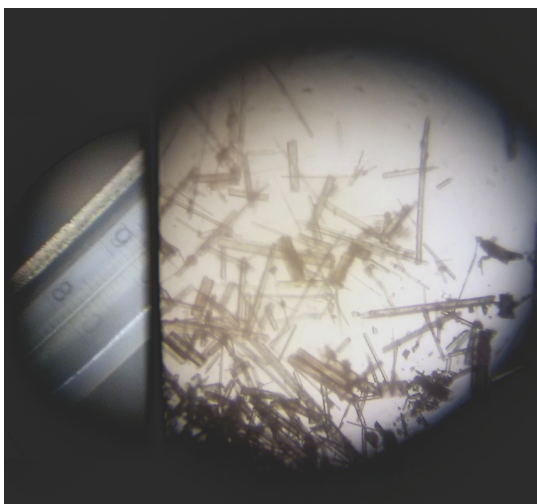
Jelikož se body tání všech tří betulinových frakcí značně lišily od tabelované hodnoty (viz tab. 1.2), rozhodl jsem se pro čištění rekrystalizací betulinu. Protože blízké body tání byly u frakcí B3 a B4, spojil jsem je v jednu, kterou jsem označil B34.

Ke spojování frakcí jsem nejprve potřeboval suchou čistou skleněnou lékovku, kterou jsem předem zvážil, a vyrobil jsem si nový balónek ze skleněné trubice (postup zhotovení je popsán v lit.^[20]) pro přenášení kapalin. Krystaly obsažené v baňkách B3 a B4 jsem rozpustil v chloroformu a balónkem jsem převedl roztoky do lékovky B34. Abych docílil kvalitativního převedení, vypláchl jsem ještě malým množstvím čistého chloroformu baňky B3 a B4 a znovu skleněným balónkem převedl do lékovky B34. Následně jsem si připravil regulovatelný elektrický vaříč, na nějž jsem umístil azbestovou sítku, a zhotovil jsem si skleněnou varnou kapiláru (na obou koncích zatavenou kapiláru nahrazující varný kamínek) delší než tělo lékovky, již jsem ponořil do chloroformového roztoku betulinu B34. Lékovku s varnou kapilárou jsem umístil na azbestovou sítku a mírným zahříváním jsem přivedl roztok k varu. Po odpaření chloroformu přibližně na pětinový objem jsem vypnul vaříč a ještě za horka do lékovky přikapával čistý methanol². Postupně se začal nahrazovat chloroform methanolem, v němž je betulin méně rozpustný než v chloroformu, čímž se vyloučily čistší krystaly betulinu. Matečný louh jsem z lékovky odsál čistým skleněným balónkem, jehož kapiláru jsem potom zatavil k uchování kapaliny pro případné další zpracování (zatavený balónek jsem označil BKF1). Vyloučené krystaly v lékovce B34 jsem vysušil a zvážil.

Nakonec jsem zjišťoval čistotu krystalů betulinu B34 měřením teploty tání na bodotávku s mikroskopem. Krystaly betulinu se pod mikroskopem jevily jako malé jehlice (viz obr. 2.4), které se kolem 210 °C začaly větvit do stran. Tento jev může být přisouzen sublimaci a následné desublimaci na svrchní krycí sklíčko. Tyto malé jehličky však začaly při teplotě 220 °C tát, což se v mikroskopu jevilo jako malé kapénky (které mohly znamenat stále přítomnost nečistot v betulinu). A konečně při

²Methanol by šel též nahradit n-hexanem, v němž je betulin také méně rozpustný než v chloroformu.

teplotě 244 °C začaly dlouhé jehlicovité krystaly betulinu tát; konec intervalu tání byl při teplotě 245 °C. I nadále byl bod tání betulinu nižší než tabelovaná hodnota (viz tab. 2.2), nicméně jsem v další krystalizaci nepokračoval. Případné přechištění by bylo spočívalo v opětovné rekrystalizaci betulinu, což by ve bylo vedlo k dalším značným ztrátám. Z tab. 2.2 je také vidět, že rekrystalizace spojených frakcí B3 a B4 vedla k 47,6% ztrátám.



Obr. 2.4: Krystaly betulinu pod mikroskopem na bodotávku.

Obrázek 2.4 jsem získal ze dvou fotografií pořízených automatickým digitálním fotoaparátem vbudovaným do mobilního telefonu, které bylo potřeba na počítači v grafickém editoru upravit a spojit. Tato grafická operace byla nutná, neboť při automatickém ostření fotoaparátu šel zachytit v okuláru právě obraz z objektivu mikroskopu, nebo z kamery snímající teploměr.

Tab. 2.2: Hmotnosti a teploty tání krystalických podílů betulinových frakcí B3, B4 a B34 v porovnání se standardizovanými hodnotami.

	Hmotnost	Teplota tání
B3	8,6 mg	228 °C
B4	8,0 mg	229 – 230 °C
B34	8,7 mg	244 – 245 °C
betulin (standard)	-	256 – 257 °C[cit. 9]

2.3 Reakce betulinu s hydrogensíranem draselným

Jak již bylo zmíněno v kap. 1.1.2.3, betulin (VII) v přímé reakci s hydrogensíranem draselným za zvýšené teploty poskytuje γ -apoallobetulin (X). Tuto reakci si připomeňme schématem 2.1. Principem této reakce je v kyselém prostředí hydrogensíranu draselného izomerace kruhu E lupanového skeletu betulinu (VII) ve skelet oleananový, čímž vzniká allobetulin (IX); zvýšená teplota potom zaručuje dehydrataci, která znamená odštěpení molekuly H_2O a vznik dvojně vazby mezi C2 a C3, a tudíž i vznik γ -apoallobetulinu (X).

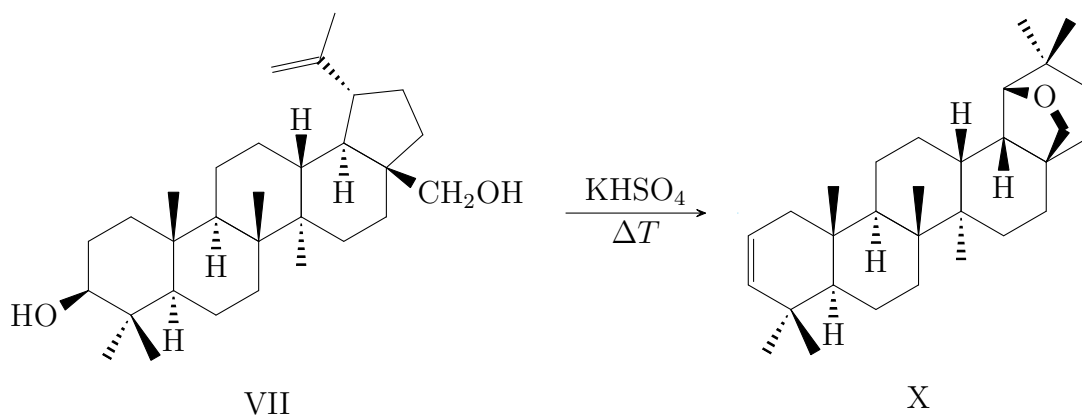


Schéma 2.1: Reakce betulinu s hydrogensíranem draselným.

2.3.1 Reakce v mikroměřítku na bodotávku

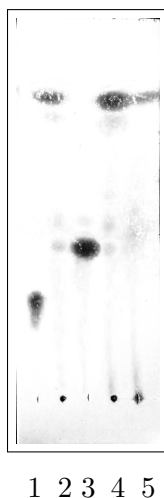
Před ověřením reakce, reprezentované schématem 2.1, jsem si připravil směs betulinu a hydrogensíranu draselného v poměru 1 : 2, konkrétně 10 mg betulinu a 20 mg $KHSO_4$. Směs jsem důkladně homogenizoval třením v achátové mističce tloučkem a přemístil se do pracovního prostoru s bodotávkem.

Připravil jsem si jedno mikroskopické sklíčko, na něž jsem špachtlí naněsl vzorek připravené směsi, překryl krycím sklíčkem a vložil na blok bodotávku. Po zaostření mikroskopu jsem směs zahříval. Jakmile jsem dosáhl teploty $210\text{ }^\circ\text{C}$, roztavil se hydrogensíran draselný, v němž se rozpustil betulin, což bylo doprovázeno barevnou změnou z čiré na hnědnou. Pokračoval jsem dál v zahřívání až do teploty $247\text{ }^\circ\text{C}$, následně jsem vypínáním a zapínáním ohřevu bodotávku po dobu 5 minut udržoval teplotu v intervalu $245\text{ až }250\text{ }^\circ\text{C}$. Po těchto pěti minutách jsem vypnul ohřev,

2.3. REAKCE BETULINU S HYDROGENSÍRANEM DRASELNÝM

posečkal, až teplota klesne na 220 °C, sňal sklíčka na připravenou látkovou podložku a odebral svrchní krycí sklíčko, aby mi roztavená směs po ztuhnutí neslepila sklíčka k sobě.

Po vychladnutí jsem produkty tavení analyzoval TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Vzorky produktů byly porovnávány se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu. Chromatogram je uvedený na obr. 2.5.



Obr. 2.5: TLC produktů tavení betulinu s KHSO_4 . Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. produkt tavení, 3. allobetulin (standard), 4. produkt ve vyšší koncentraci, 5. γ -apoallobetulin (standard).

Na základě potvrzení reakce betulinu s KHSO_4 k přípravě γ -apoallobetulinu jsem se rozhodl zjistit, zda lze připravit větší množství této látky preparativní tenkovrstvou chromatografií a za jakých různých podmínek je reakce realizovatelná.

2.3.2 Reakce v semimikroměřítku

První otázkou bylo, v čem bude vhodné zahřívát směs betulinu a hydrogensíranu draselného. Jako reaktor, který dokázal udržet teplotu v úzkém teplotním intervalu, posloužila elektrická pírka s regulovatelným výkonem opatřená teploměrem, posléze regulovatelná elektrická sušárna. Byla provedena série šesti reakcí betulinu s KHSO_4

při šesti různých teplotních režimech.

2.3.2.1 Příprava reakční směsi

Ke každé zkoumané reakci byla připravena směs betulinu a hydrogensíranu draselného v poměru 2 : 5, konkrétně 100 mg betulinu a 250 mg KHSO_4 . Složky směsi jsem vážil na profesionálních analytických vahách, potom je smíchal dohromady a směs homogenizoval důkladným třením v achátové mističce tloučkem.

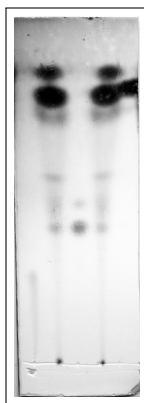
Nakonec jsem připravenou homogenizovanou směs kvantitativně převedl do malého porcelánového kelímku, který jsem následně uložil do většího porcelánového kelímku a přikryl pokličkou vystřiženou z hliníkového plíšku z použité chromatografické fólie (viz obr. 2.6).



Obr. 2.6: Uspořádání kelímků pro reakční směs.

2.3.2.2 Série reakcí

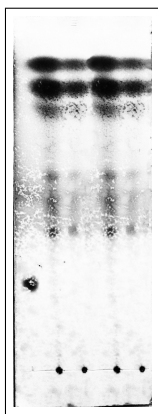
První reakční směs jsem převedl do kelímku I, ten jsem následně uložil do elektrické pícky předem vyhřáté na $238\text{ }^{\circ}\text{C}$. Otevřením dvířek pícky, vložením kelímku a zavřením dvířek pícky však poklesla teplota na $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně jsem nechal teplotu vystoupat na $232\text{ }^{\circ}\text{C}$, což trvalo 25 minut, a dále udržoval tuto teplotu po dobu 5 minut. Poté jsem pec vypnul a po dalších 5 minutách (když teplota klesla na $200\text{ }^{\circ}\text{C}$) jsem otevřel její dvířka. Po vychladnutí jsem kelímek s reakčními produkty vyjmul a provedl jejich analýzu TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Vzorky produktů P_I byly porovnávány se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu. Chromatogram je uvedený na obr. 2.7.



1 2 3 4 5

Obr. 2.7: TLC produktů P_I reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P_I , 3. allobetulin (standard), 4. P_I , 5. γ -apoallobetulin (standard).

Druhou reakční směs jsem převedl do kelímku II, ten jsem následně uložil do elektrické pírky, kterou jsem posléze zapnul. Po 2 hodinách a 25 minutách, kdy teplota v pírce dosáhla $210\text{ }^\circ\text{C}$, jsem vypnul zahřívání, avšak neotvíral dvířka. Teprve po vychladnutí prostoru pece na laboratorní teplotu jsem kelímek s reakčními produkty vyjmul a provedl jejich analýzu TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck) způsobem již popsaným v kap. 2.1.3.1. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Vzorky produktů P_{II} byly porovnávány se standardem betulinu a vzorky produktů P_I . Chromatogram je uvedený na obr. 2.8.

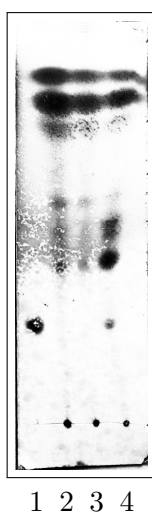


1 2 3 4 5

Obr. 2.8: TLC produktů P_{II} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard); 2.,4. P_I ; 3.,5. P_{II} .

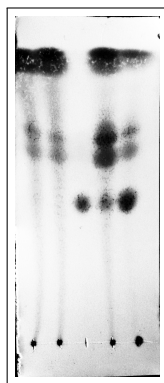
2.3. REAKCE BETULINU S HYDROGENSÍRANEM DRASELNÝM

Třetí reakční směs jsem převedl do kelímku III, ten jsem následně uložil do elektrické pícky, kterou jsem posléze zapnul. Po 1 hodině, kdy teplota v píce dosáhla 195 °C, jsem vypnul zahřívání a otevřel dvířka. Po vychladnutí jsem kelímek s reakčními produkty vyjmul a provedl jejich analýzu TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Vzorek produktů P_{III} byl porovnáván se standardem betulinu a vzorky produktů P_I a P_{II}. Chromatogram je uvedený na obr. 2.9.



Obr. 2.9: TLC produktů P_{III} reakce betulinu s KHSO₄. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P_I, 3. P_{II}, 4. P_{III}.

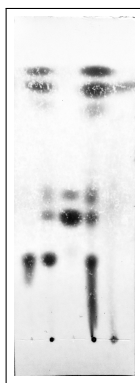
Čtvrtou reakční směs jsem převedl do kelímku IV, ten jsem následně uložil do elektrické pícky, kterou jsem posléze zapnul. Po 35 minutách, kdy teplota v píce dosáhla 140 °C, jsem vypnul zahřívání, avšak dvířka jsem neotevřel. Setrvačností ještě teplota vystoupala na 148 °C, pak už jen klesala. Po 25 minutách od vypnutí pece, kdy teplota poklesla na 122 °C, jsem otevřel dvířka a kelímek vyjmul. Po vychladnutí kelímku s reakčními produkty jsem provedl jejich analýzu TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Vzorek produktů P_{IV} byl porovnáván se standardem betulinu a vzorky produktů P_I, P_{II} a P_{III}. Chromatogram je uvedený na obr. 2.10.



1 2 3 4 5

Obr. 2.10: TLC produktů P_{IV} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. P_I , 2. P_{II} , 3. betulin (standard), 4. P_{III} , 5. P_{IV} .

Dále byla provedena analýza produktů P_{IV} TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1 ve srovnání se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Chromatogram je uvedený na obr. 2.11.



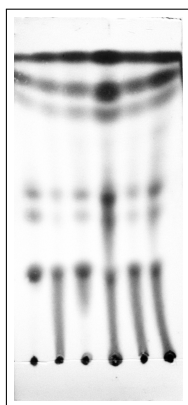
1 2 3 4 5

Obr. 2.11: TLC produktů P_{IV} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. betulin (standard); 2.,4 P_{IV} ; 3. allobetulin (standard); 5. γ -apoallobetulin (standard).

Poslední pátou a šestou reakční směs jsem převedl do kelímku V, resp. do kelímku VI a oba je vložil do elektrické sušárny předehřáté na 120 °C (sušárna udržovala tuto teplotu po celou dobu). Kelímek V jsem ze sušárny vyjmul po 2 hodinách a 30 mi-

2.3. REAKCE BETULINU S HYDROGENSÍRANEM DRASELNÝM

nutách, kelímek VI až po 6 hodinách a 30 minutách. Po vychladnutí obou kelímků jsem provedl analýzu TLC produktů P_V a P_{VI} na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1 ve srovnání s produkty P_{IV} . Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Chromatogram je uvedený na obr. 2.12.



1 2 3 4 5 6

Obr. 2.12: TLC produktů P_{IV} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1.,4 P_{IV} ; 2.,5 P_V ; 3.,6. P_{VI} .

2.3.2.3 Zhodnocení průběhu experimentů

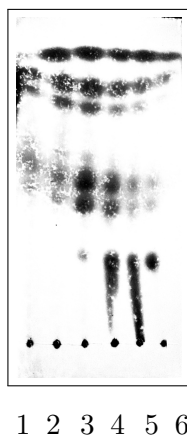
Každá reakce ze série se vyznačovala různými podmínkami, které ovlivňovaly její rychlost. Souhrn podmínek k dosažení produktů P_I až P_{VI} je dán tabulkou 2.3.

Tab. 2.3: Souhrn reakčních podmínek k dosažení produktů P_I až P_{VI} .

	Nejvyšší dosažená teplota během reakce	Teplotní interval, v němž reakce probíhala	Celková doba zahřívání
P_I	232 °C	200 – 232 °C	42 min
P_{II}	210 °C	25 – 210 °C	2 h 25 min
P_{III}	195 °C	25 – 195 °C	1 h
P_{IV}	248 °C	25 – 248 °C	1 h
P_V	120 °C	120 °C	2 h 30 min
P_{VI}	120 °C	120 °C	6 h 30 min

2.3. REAKCE BETULINU S HYDROGENSÍRANEM DRASELNÝM

Ke zhodnocení byla provedena TLC všech produktů ze série reakcí na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1 ve vzájemném srovnání. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Chromatogram je uvedený na obr. 2.13.

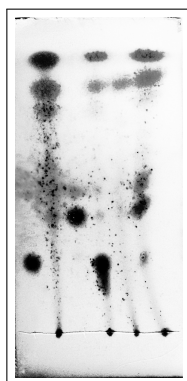


Obr. 2.13: TLC všech produktů ze série reakcí betulinu s KHSO_4 . Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. P_I, 2. P_{II}, 3. P_{III}, 4. P_{IV}, 5. P_V, 6. P_{VI}.

Z uvedeného chromatogramu na obr. 2.13 lze vyčíst, že u stop 1 a 2 produktů P_I a P_{II} nebyla prokazatelná přítomnost nezreagovaného betulinu jako u ostatních stop 3, 4, 5, 6. Zároveň pak produkty P_I a P_{II} obsahovaly menší množství allobetulinu. Zajímavé je, že všechny produkty série reakcí vykazovaly přítomnost dosud neidentifikovaných látek, a především látky vyznačující se na chromatogramu větší pohyblivostí než γ -apoallobetulin, držící se v čele rozpouštědel, již jsem se pokusil separovat dále v preparativním provedení TLC (což rozvádím v kap. 2.4), ale také látky méně pohyblivé než γ -apoallobetulin, držící se v jeho těsné blízkosti. Tento fakt je o to překvapivější, že během tavení betulinu s KHSO_4 nevznikaly neidentifikovatelné produkty, nebo nebyly TLC odhaleny (kap. 2.3.1, obr. 2.5).

Než jsem se uchýlil k separaci γ -apoallobetulinu, provedl jsem TLC tří produktů, které se výrazně lišily poměrem přítomných složek, a sice P_I, P_{III} a P_V na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1 ve srovnání se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexan : ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Chromatogram je uvedený

na obr. 2.14.



1 2 3 4 5 6

Obr. 2.14: TLC produktů P_I , P_{III} a P_V ze série reakcí betulinu s $KHSO_4$.

Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P_I , 3. allobetulin (standard), 4. P_V , 5. γ -apoallobetulin (standard), 6. P_{III} .

2.4 Separace γ -apoallobetulinu

Pro separaci γ -apoallobetulinu jsem zvolil kelímek ze série reakcí betulinu s $KHSO_4$ podle TLC s vysokým podílem tohoto olefinu, a sice kelímek I.

2.4.1 Oddělení organické složky od anorganické

Stěžejním úkolem pro další zpracovávání bylo oddělení organických produktů P_I od přebytečného hydrogensíranu draselného. Rozhodl jsem se převést organickou část do roztoku rozpuštěním v chloroformu ($KHSO_4$ je v chloroformu prakticky nerozpustný) a roztok následně odsát. K přenášení kapalin mi posloužil skleněný balónek, zhotovený ze skleněné trubice (podrobný pracovní postup lze najít v lit. ^[20]), jemuž jsem kapiláru na konci dostatečně zúžil.

Také jsem si připravil tři malé porcelánové kelímky, jež jsem označil I1, I2 a I3 a které jsem zvažil (hmotnosti jsou uvedeny v tab. 2.4). Do kelímku I, obsahujícího produkty P_I , jsem pipetou přidal 1 cm^3 chloroformu a vyloužil jsem tak první frakci organických látek. Jelikož se při reakci vedoucí k produktům P_I dostala teplota nad bod tání $KHSO_4$ a výsledný produkt měl po vychladnutí sklovitý charakter, bylo potřeba obsah kelímku I jemnou manipulací špachtle opatrně rozbít, aby se spečené

kousky oddělily. Následně jsem roztok odsál připraveným skleněným balónkem a převedl roztok do kelímku I1. Balónek s tenkou kapilárou zamezil nasání nerozpuštěné anorganické látky, manipulace však byla trochu problematická, neboť se někdy ústí kapiláry balónku ucpalo krystalkem KHSO_4 , který musel být odstraněn, aby filtrace mohla zdárně pokračovat.

Dále jsem znovu do kelímku I přidal 1 cm^3 chloroformu, do něhož přešla nerozpuštěná část organických látek a analogickým způsobem jsem odsál roztok balónkem a převedl jej do kelímku I2. Nakonec jsem vymyl organickou složku ještě jednou přidáním 1 cm^3 chloroformu do kelímku I a následným převedením roztoku do kelímku I3. Toto trojité vymytí kelímku vedlo ke kvantitativnímu převedení produktů P_I z kelímku I. Dále jsem nechal volně odpařit rozpouštědlo z kelímků a odparky společně s příslušnými kelímky zvažil (viz tab. 2.4).

Tab. 2.4: Vážení odparků produktů P_I po rozdělení do frakcí.

Frakce	Hmotnost prázdného kelímku	Hmotnost kelímku se vzorkem	Hmotnost frakce
I1	4,0107 g	4,0892 g	0,0785 g
I2	4,0026 g	4,0124 g	0,0098 g
I3	3,9145 g	3,9167 g	0,0022 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0905 g

2.4.2 První preparativní TLC

Před separací preparativní TLC γ -apoallobetulinu jsem si připravil litou chromatografickou desku postupem, který jsem již popsal v kap. 2.1.2, a následně spojil skleněným balónkem frakce I1, I2, I3 produktů P_I tak, že jsem do kelímku I3 s odparkem přidal 1 cm^3 chloroformu a vzniklý roztok převedl balónkem do kelímku I2, čímž se obsah v tomto kelímku rozpustil a roztok zkoncentroval. Tento postup jsem zopakoval ještě jednou; převedl jsem roztok pomocí balónku z kelímku I2 do kelímku I1. Spojené frakce v kelímku I1 jsem odsál balónkem a nanesl na start připravené preparativní chromatografické desky. Abych kvantitativně na preparativní desku nanesl produkty P_I , vymyl jsem kelímek I3 1 cm^3 čistého chloroformu a balónkem

převodl roztok do kelímku I2 a následně do I1, z něhož jsem potom vymývací roztok nanesl na preparativní chromatografickou desku. Jakmile se odpařilo rozpouštědlo ze startu, algoritmus vymývání, nanášení a čekání na odpaření rozpouštědla jsem opakoval ještě třikrát.

Abych zjistil, jaké množství látek jsem přesně nanesl na preparativní chromatografickou desku, znovu jsem zvažil kelímky I1, I2 a I3 a na základě difference hmotností kelímku s příslušnou frakcí a nyní suchého kelímku po nanesení látek určených k separaci jsem toto množství vypočítal (viz tab. 2.5).

Tab. 2.5: Hmotnosti nanesených frakcí produktů P_I na preparativní chromatografickou desku.

Kelímek	Hmotnost s frakcí před nanesením	Hmotnost po nanesení	Hmotnost nanesené frakce
I1	4,0892 g	4,0113 g	0,0779 g
I2	4,0124 g	4,0031 g	0,0093 g
I3	3,9167 g	3,9154 g	0,0013 g
Celková hmotnost organických látek nanesených na chromatografickou desku			0,0885 g

Na základě výsledků analytické TLC byla provedena preparativní TLC způsobem popsaným v kap. 2.1.3.2. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10 : 3, detekce byla provedena vypálením odporovým drátem. Výsledný chromatogram je uveden na obr. 2.15, na němž je znázorněna zóna $\gamma_{I/1}$ obsahující organické netěkavé látky, především pak γ -apoallobetulin.

K dalšímu zpracovávání chromatogramu jsem si připravil čisté chromatografické trubice, jejichž ústí jsem uzavřel smotkem vaty. Jakmile jsem z chromatogramu odstranil karbonizované části, celou zónu $\gamma_{I/1}$ jsem pomocí čistého suchého třicetimetřového pravítka seškrábl na hladký křídový papír, na kterém jsem adsorbent rozmělnil. Snadno přesypatelným sorbentem sňatým z chromatogramu jsem naplnil chromatografickou trubici a opatrným poklepáváním trubice ve vertikální poloze o dřevěnou podložku jsem zpevnil sloupec sorbentu (přičemž unikly uvězněné vzduchové kapsy). Trubicí jsem upevnil do držáku a pod její ústí jsem umístil předem



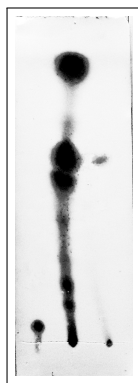
Obr. 2.15: Chromatogram v preparativním provedení TLC k separaci γ -apoallobetulinu. $\gamma_{I/1}$ značí zónu, kterou jsem z chromatografu sňal a dále zpracovával.

zváženou čistou suchou stomililitrovou baňku s varným kamínkem.

Nyní jsem mohl provést extrakci organických látek z adsorbentu; nad sloupec jsem opatrně naléval asi 50 cm³ eluentu – ethyl-acetátu – a vyčkal, než se trubice promyla. Jakmile do baňky neprokapávalo žádné rozpouštědlo, z jímaného eluátu jsem oddestiloval přebytečný ethyl-acetát téměř k suchu. Poněvadž v eluátu nebylo chemické individuum, nýbrž stále směs organických látek, nedošlo ani po vyschnutí k vyloučení krystalů. Nicméně získaný výtěžek organických látek jsem zvažil. Hmotnost odparku činila 0,0707 g.

2.4.2.1 Analýza látek získaných ze zóny $\gamma_{I/1}$

Před analýzou látek ze zóny $\gamma_{I/1}$ jsem s vědomím, že směs bude obsahovat i látku na TLC pohyblivější než γ -apoallobetulin, provedl analýzu TLC produktů ze série reakcí betulinu s hydrogensíranem draselným P_{II} způsobem již popsáním v kap. 2.1.3.1 ve srovnání se standardy betulinu a γ -apoallobetulinu. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexanu a ethyl-acetátu, ale tentokrát za účelem snížení pohyblivosti složek reakční směsi v poměru 10 : 1. Výsledný chromatogram je na obr. 2.16.



1 2 3

Obr. 2.16: TLC produktů P_{II} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze: n-hexan : ethylacetát (10 : 1): 1. betulin (standard), 2. P_{II} , 3. γ -apoallobetulin (standard).

Jiný poměr rozpouštědel tvořící mobilní fázi způsobil oddělení pohyblivější látky než γ -apoallobetulin, nicméně látka méně pohyblivá byla stále v těsné blízkosti. Proto jsem zkusil provést ještě jednu TLC produktů P_{II} zcela obdobným způsobem. Ke srovnání jsem použil standardy betulinu, γ -apoallobetulinu a allobetulinu, mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexanu a ethyl-acetátu tentokrát v poměru 20 : 1. Výsledný chromatogram je na obr. 2.17.

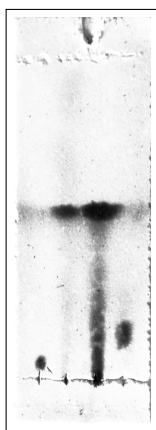


1 2 3 4

Obr. 2.17: TLC produktů P_{II} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze: n-hexan : ethyl-acetát (20 : 1): 1. betulin (standard), 2. P_{II} , 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. allobetulin (standard).

Z chromatogramu na obr. 2.17 je dobře vidět, že stopa betulinu a allobetulinu zůstávají ve vybrané soustavě rozpouštědel na startu, resp. velmi blízko startu. Velmi pohyblivá látka se od stopy γ -apoallobetulinu zcela oddělila (drží se v čele), nicméně látka méně pohyblivá než γ -apoallobetulin je stále velmi blízko.

Konečně jsem se mohl odebrat k samotné analýze látek eluovaných ze zóny $\gamma_{I/1}$. Vzal jsem si jednu připravenou litou desku pro analytické provedení TLC (viz kap. 2.1.1), odebral jsem malý vzorek eluentu $\gamma_{I/1}$, který jsem rozpustil v kapce chloroformu a nasál do kapiláry. Na vyznačený start jsem nanesl vzorek $\gamma_{I/1}$ spolu se vzorky standardů betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu způsobem popsáním v kap. 2.1.3.1. K vyvinutí chromatogramu byla použita mobilní fáze o složení n-hexan : ethyl-acetát v poměru 15 : 1. Chromatogram byl detekován postříkem 10% roztokem kyseliny sírové a vypálením na elektrickém vařiči, záznam je na obr. 2.18.



1 2 3 4

Obr. 2.18: TLC látek ze zóny $\gamma_{I/1}$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (15 : 1):

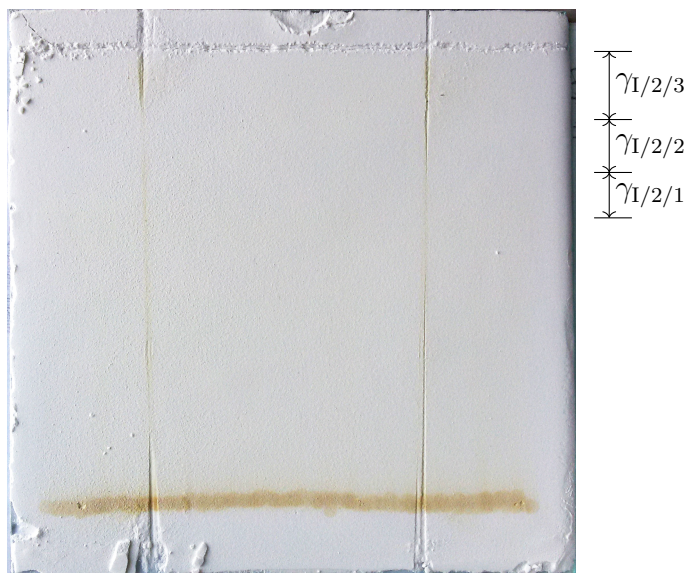
1. betulin (standard), 2. $\gamma_{I/1}$, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. allobetulin (standard).

2.4.3 Druhá preparativní TLC

Jelikož se na chromatogramu separovaných látek ze zóny $\gamma_{I/1}$ (obr. 2.18) zdála být přítomna v malém množství látka pohyblivější než γ -apoallobetulin držící se v čele a jelikož se při první preparaci TLC do oddělené zóny dostala i organická barviva, rozhodl jsem se pro znovuseparování γ -apoallobetulinu preparativní TLC.

Připravil jsem si chromatografickou desku způsobem popsáním v kap. 2.1.2

a látky ze zóny $\gamma_{I/1}$ obsažené v baňce jsem rozpustil asi 1 cm³ chloroformu. Nově vytvořeným skleněným balónkem (zhotovení balónku a manipulace s ním viz lit.^[20]) jsem nanesl roztok látek $\gamma_{I/1}$ na start preparativní chromatografické desky. Způsob nanášení na desku a vyvinutí chromatogramu jsem již popsal v kap. 2.1.3.2. Mobilní fázi tvořila směs rozpouštědel n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 15 : 1, konkrétně 75 cm³ hexanu a 5 cm³ ethyl-acetátu. Jakmile dosáhla vzlínáním rozpouštědla asi 15 mm pod horní okraj, vyjmul jsem desku z chromatografické komory, označil čelo a nechal ji vyschnout³. Detekci jsem provedl vypálením odporovým drátem – v místě výskytu organické látky došlo ke karbonizaci. Výsledný chromatogram je na obr. 2.19.



Obr. 2.19: Druhý chromatogram v preparativním provedení TLC k separaci γ -apoallobetulinu. $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$ a $\gamma_{I/2/3}$ značí zóny, které jsem z chromatografu sňal a dále zpracovával.

Z druhého chromatogramu pro separaci γ -apoallobetulinu jsem odstranil karbonizované části. Připravil jsem si tři čisté chromatografické trubice opatřené u ústí smotkem vaty a tři čisté suché stomililitrové varné baňky, které jsem zvažil společně s varnými kamínky. Následně jsem z chromatogramu postupně sňal adsorbent z vyznačené zóny $\gamma_{I/2/3}$, ten rozmělnil na hladkém křídovém papíře a naplnil jím příslušnou

³Po vyvinutí chromatogramu v chromatografické komoře zbylo 40 cm³ směsi rozpouštědel tvořících mobilní fázi. Spotřebovalo se tedy k TLC 50 % směsi.

chromatografickou trubicí. Analogicky jsem postupoval u zón $\gamma_{1/2/2}$ a $\gamma_{1/2/1}$.

Opatrným poklepáváním chromatografických trubic ve vertikální poloze o dřevěnou podložku jsem upěchoval velmi jemný sorbent, čímž jsem připravil trubice k eluci. Upevnil jsem chromatografické trubice do držáku, pod jejich ústí umístil příslušné předem zvažené varné baňky i s varnými kamínky a nad sloupec sorbentu nalil asi 50 cm³ čistého ethyl-acetátu (viz obr. 2.20).

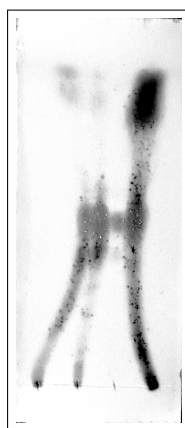


Obr. 2.20: Chromatografické trubice naplněné sorbenty ze zón $\gamma_{1/2/1}$, $\gamma_{1/2/2}$, $\gamma_{1/2/3}$ při eluci obsažených látek do odvážených baněk ethyl-acetátem.

Jakmile byla extrakce hotová, z jímaných eluátů jsem oddestiloval přebytečný ethyl-acetát téměř k suchu. Po kompletním vysušení získaných frakcí jsem opět zvažil varné baňky, a tak zjistil hmotnosti jednotlivých frakcí (viz tab. 2.6). Následně jsem provedl analýzu vzorků frakcí TLC na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) způsobem popsáním v kap. 2.1.3.1 ve srovnání se standardem γ -apoallobetulinu. Výsledný chromatogram je uveden na obr. 2.21.

Tab. 2.6: Hmotnosti frakcí $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$, $\gamma_{I/2/3}$.

Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
$\gamma_{I/2/1}$	61,4006 g	61,4131 g	0,0125 g
$\gamma_{I/2/2}$	56,6250 g	56,6478 g	0,0228 g
$\gamma_{I/2/3}$	108,2536 g	108,2710 g	0,0174 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0527 g



1 2 3 4

Obr. 2.21: TLC látek ze zón $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$, $\gamma_{I/2/3}$. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (15 : 1): 1. $\gamma_{I/2/1}$, 2. $\gamma_{I/2/2}$, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. $\gamma_{I/2/3}$.

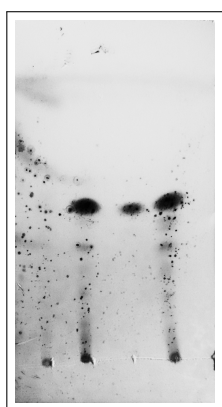
2.4.4 Třetí preparativní TLC

Látky získané při druhé TLC (52,7 mg) jsem po spojení jejich frakcí skleněným balónkem nanasl na novou preparativní desku a elucí v soustavě n-hexanu a ethylacetátu (15 : 1), stejným způsobem jako v případě popsaném v kap. 2.4.3, jsem získal chromatogram. Rozložení organických látek na chromatogramu jsem vyhodnotil detekcí žhavým odporovým drátem v kombinaci s analytickou TLC, a tak byly získány tři zóny silikagelu A, B a C, které chromatografickou desku dělily na tři přibližně stejně velké rovnoběžné pásy. Jednotlivé zóny jsem sňal a rozmělněnými sorbenty z příslušných zón jsem naplnil tři čisté chromatografické trubice, jejichž ústí bylo uzavřeno smotkem vaty.

Následně jsem extrahoval látky adsorbované na silikagelu do příslušných předem zvážených varných baněk elucí ethyl-acetátem. Do baňky A jsem jímал nejpohyblivější látku ze zóny A, do baněk B a C eluáty s předpokládaným obsahem γ -apoallobetulinu ze zón B, resp. C. Po oddestilování ethyl-acetátu jsem baňky zvážil, a tak získal hmotnosti produktů (viz tabulka 2.7), jejichž složení dokládají chromatogramy na obr. 2.22a a 2.22b provedených TLC.

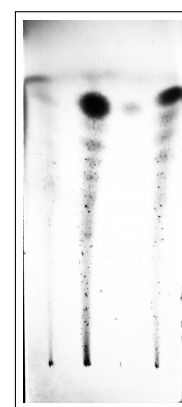
Tab. 2.7: Hmotnosti produktů získaných ze zón A, B a C.

Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
A	65,3415 g	65,3472 g	0,0057 g
B	112,2217 g	112,2309 g	0,0092 g
C	105,9299 g	105,9507 g	0,0208 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0357 g



1 2 3 4

(a) Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát
(15 : 1)



1 2 3 4

(b) Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát
(10 : 3)

Obr. 2.22: TLC látek ze zón po oddělování třetí preparativní TLC. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. pohyblivější látky z baňky A, 2. látky z baňky B, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. látky z baňky C.

2.4.5 Výsledky separace γ -apoallobetulinu

Ze závěrečných chromatogramů (obr. 2.22a nebo obr. 2.22b) je vidět, že látka, která se na všech předešlých chromatogramech jevila značně pohyblivější než γ -apoallobetulin, byla pomocí třetí preparativní tenkovrstvé chromatografie oddělena. Z obr. 2.22a, 2.22b a tab. 2.8 je také zřejmé, že bylo získáno dostatečné množství látky s vysokým obsahem γ -apoallobetulinu. Čistota frakcí B a C by již umožňovala využití pro preparativní účely, pro analytické účely by však bylo vhodné získat γ -apoallobetulin vyšší kvality. V menším množství totiž γ -apoallobetulin ve frakcích B a C doprovázejí látky méně pohyblivé, které se třetí preparativní tenkovrstvou chromatografií oddělit nepodařilo.

Pro analytické účely by bylo vhodné frakce B a C spojit a získanou látku čistit další preparativní TLC, přičemž u tohoto postupu lze předpokládat, že bude izolována frakce s vyšším obsahem γ -apoallobetulinu ovšem za současných ztrát, jak lze usuzovat z materiálové bilance uvedené v tabulce 2.8, nebo opakovanou krystalizací při kontrole TLC.

Tab. 2.8: Úbytek hmotnosti organických látek v průběhu jejich zpracování a izolování γ -apoallobetulinu.

Betulin vážený k reakci s KHSO_4	100,0 mg
Vymyté organické látky po reakci betulinu s KHSO_4	90,5 mg
Organické látky nanesené na chromatografickou desku	88,5 mg
Výtěžek organických látek po první preparativní TLC	70,7 mg
Výtěžek organických látek po druhé preparativní TLC	52,7 mg
Výtěžek organických látek po třetí preparativní TLC	35,7 mg

Z tabulky 2.8 lze také vyčíst, kolik miligramů organických látek se nepodařilo během zpracování preparativní tenkovrstvou chromatografií získat. Po první preparativní TLC činily ztráty 17,8 mg, po druhé 18,0 mg a po třetí 17,0 mg. Použitím tedy postupů separace preparativní TLC a extrakce z adsorbentu ethyl-acetátem došlo průměrně ke ztrátě 17,6 mg organických látek. Tyto ztráty mohly být způsobeny sorpcí na vatu při extrakci ze silikagelu.

Závěr

Tuto práci jsem směřoval především na využití tenkovrstvé chromatografie k izolaci betulinu z extraktu březové kůry a separace γ -apoallobetulinu jako jednoho z produktů reakce betulinu s hydrogensíranem draselným.

V teoretické části této práce jsem zařadil betulin a jeho deriváty (včetně γ -apoallobetulinu) mezi triterpenoidy, stručně je charakterizoval a několik vět jsem věnoval i jejich zajisté velmi významné biologické aktivitě. Také jsem se teoreticky zabýval možnostmi využití γ -apoallobetulinu jako výchozí látky při různých reakcích daných zvláště pak přítomností dvojně vazby mezi uhlíky C2 a C3.

Nemalou pozornost jsem také věnoval chromatografii, zvláště pak chromatografii tenkovrstvé, která je zcela stěžejním bodem celé experimentální části práce. Díky preparativnímu provedení TLC jsem po rekrystalizaci získal z extraktu březové kůry betulin, jehož bod tání jsem stanovil na 244 – 245 °C. Na bodotávku se mi podařilo ověřit přeměnu betulinu v kyselém prostředí KHSO_4 na γ -apoallobetulin. Na základě tohoto zjištění jsem si stanovil hypotézu, zda obdobným způsobem lze provést tuto přeměnu v semimikroměřítku, případně ve větším množství. Hypotéza se potvrdila, bylo však potřeba najít vhodné podmínky, při nichž byla reakce výhodná.

Potom jsem si stanovil za úkol separovat vzniklý γ -apoallobetulin pomocí preparativní TLC. Opakováním preparativní TLC frakcí s obsahem γ -apoallobetulinu se podařilo získat látku vhodnou pro preparativní využití. Z obr. 2.22a a 2.22b je však zřejmé, že k získání analytického vzorku je třeba zvolit další operace vedoucí ke zvýšení čistoty (viz kap. 2.4.5).

Jako poněkud poněkud problematické se jevílo, že stopu γ -apoallobetulinu vždy doprovázela neidentifikovaná látka v jeho téměř bezprostřední blízkosti. Dále jako další produkt reakce vnikala látka, která se v chromatografii držela vždy u čela mobilní fáze. I tato látka nebyla identifikována. Oba vedlejší produkty by mohly být námětem pro další zkoumání, a tedy i pro mou (a nejen mou) budoucí (diplomovou) práci.

Seznam použité literatury

- [1] MCMURRY, J. *Organická chemie*. 1. vydání. VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978-80-7080-637-1.
- [2] KLINOTOVÁ, E., et al. *Základní cvičení z organické chemie*. Praha: Univerzita Karlova, 1980.
- [3] KARRER, W. *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe: exclusive Alkaloide*. Basel: Springer Basel, 1958. ISBN 9783034868082.
- [4] TOLSTIKOV, G. A., et al. Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chem Sust Dev*. 2005, 13, 1-29.
- [5] DREBUSHCHAK, V. A., et al. Melting of orthorhombic betulin. *Journal of thermal analysis and calorimetry*. 2013, 111(3), 2005-2008.
- [6] National Center for Biotechnology Information. *Betulin*. *PubChem Compound Database* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72326>>.
- [7] National Center for Biotechnology Information. *Allobetulin*. *PubChem Compound Database* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11080733>>.
- [8] National Center for Biotechnology Information. *NSC50882*. *PubChem Compound Database* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/242324>>.
- [9] Sigmaaldrich.com. *Betulin: $\geq 98\%$* . *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/b9757>>.
- [10] LEVDANSKIJ, V. A.; LEVDANSKIJ, A. V.; KUZNĚCOV, B. N. Vlivanije ortofosfornoj kisloty na chimičeskije prevraščenija betulinola v butanole, izobutanole i uksusnoj kislote. *J. SFU. Chemistry*. 2008, 1(4), 369-375.
- [11] ISLER, O. *Zur Konstitution des Betulins*. Basel, 1935. Promotionsarbeit. Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Referent Prof. Dr. Ruzicka.

- [12] GREEN, B., et al. Isolation of betulin and rearrangement to allobetulin. A biomimetic natural product synthesis. *J. Chem. Educ.* 2007, 84(12), 1985.
- [13] KWON, Ho Jeong, et al. Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Cancer Science*. 2002, 93(4), 417-425.
- [14] RICHTR, V.; ŠNAIBERKOVÁ M.; ŠTROFOVÁ J. Výzkumná činnost studentů v racionalizaci experimentální přípravy budoucích učitelů chemie. XXIV. Mezinárodní konference o výuce chemie DIDAKTIKA CHEMIE A JEJÍ KONTEXTY. Sborník příspěvků z konference 20.–21. 5. 2015. Brno: Masarykova univerzita, 2015. s. 162–165. ISBN 978-80-210-7996-0.
- [15] KLINOT, J.; VYSTRČIL, A. Triterpenes. VII. Stereochemistry of 2-bromo derivatives of allobetulin and alloheterobetulin. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1966, 31(3), 1079-1091.
- [16] KLINOT, J.; KRUMPOLC, M.; VYSTRČIL, A. Triterpenes. IX. Reaction of isomeric 2,3-epoxides with Grignard reagent. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1966, 31(8), 3174-3181.
- [17] RYBINA, A. V.; SHEPELEVICH, I. S.; TALIPOV, R. F.; GALIN, F. Z.; SPIRIKHIN, L. V. Transformation of 19 β ,28-epoxy-18 α -olean-2-ene by the Prins reaction. *Chem. Nat. Comp.* 2006, 42(6), 740-741.
- [18] KLINOT, J.; WAISSER, K.; STREINZ, L.; VYSTRČIL, A. Triterpenes. XX. The Participation of Dimethylformamide in the Addition of Halogens to the Δ^2 -double bond - A Way to the Preparation of β -epoxides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1970, 35(12), 3610-3617.
- [19] ZÁRUBA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [20] RICHTR, V. *Semimikrotechnika v organické chemii*. 1. vyd. Plzeň: Pedagogická fakulta Západočeské univerzity, 1993. ISBN 80-7043-066-4.

- [21] GALUSZKA, P.; LUHOVÁ, L. *Laboratorní technika pro biochemiky*. 2. vyd. Olomouc: Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, 2005.
- [22] CÍDLOVÁ, H. Destilace. *Laboratorní operace: Při oddělování složek směsí* [online]. Brno: Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, 2006 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <<http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/operace/seznam.htm>>.
- [23] RICHTR, V.; KRAITR M. Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. *Chemie XX: sborník katedry chemie*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni. Fakulta pedagogická, 2004, s. 148. ISBN 80-7043-296-9.

Seznam obrázků

1.1	Soxhletův extraktor s vyznačeným tokem par čistého rozpouštědla (vzhůru) a rozpouštědla obohaceného o extrahovanou látku (dolů). Převzato z lit. ^[19]	12
1.2	Prostá destilační aparatura s vyznačeným tokem chladiva.	13
1.3	Vyhodnocení chromatogramu retardačním faktorem R_F	17
2.1	Preparativní litá deska v chromatografické komoře.	20
2.2	TLC frakcí extraktu březové kůry. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. frakce B1, 3. B3, 4. B4.	22
2.3	Bodotávek s mikroskopem: 1. mikroskop, 2. elektrický vyhřívaný kovový blok, 3. reostat, 4. regulační klička reostatu, 5. vypínač vyhřívaného 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 lit. ^[14]	23
2.4	Krystaly betulinu pod mikroskopem na bodotávku.	25
2.5	TLC produktů tavení betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. produkt tavení, 3. allobetulin (standard), 4. produkt ve vyšší koncentraci, 5. γ -apoallobetulin (standard).	27
2.6	Uspořádání kelímků pro reakční směs.	28
2.7	TLC produktů P_I reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P_I , 3. allobetulin (standard), 4. P_I , 5. γ -apoallobetulin (standard).	29
2.8	TLC produktů P_{II} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard); 2.,4. P_I ; 3.,5. P_{II}	29
2.9	TLC produktů P_{III} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P_I , 3. P_{II} , 4. P_{III}	30
2.10	TLC produktů P_{IV} reakce betulinu s $KHSO_4$. Mobilní fáze n-hexan : ethyl-acetát (10 : 3): 1. P_I , 2. P_{II} , 3. betulin (standard), 4. P_{III} , 5. P_{IV}	31

2.11	TLC produktů P _{IV} reakce betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. betulin (standard); 2.,4 P _{IV} ; 3. allobetulin (standard); 5. γ -apoallobetulin (standard).	31
2.12	TLC produktů P _{IV} reakce betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1.,4 P _{IV} ; 2.,5 P _V ; 3.,6. P _{VI}	32
2.13	TLC všech produktů ze série reakcí betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. P _I , 2. P _{II} , 3. P _{III} , 4. P _{IV} , 5. P _V , 6. P _{VI}	33
2.14	TLC produktů P _I , P _{III} a P _V ze série reakcí betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. betulin (standard), 2. P _I , 3. allobetulin (standard), 4. P _V , 5. γ -apoallobetulin (standard), 6. P _{III}	34
2.15	Chromatogram v preparativním provedení TLC k separaci γ -apoallobetulinu. $\gamma_{I/1}$ značí zónu, kterou jsem z chromatografu sňal a dále zpracovával.	37
2.16	TLC produktů P _{II} reakce betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze: n-hexan : ethylacetát (10 : 1): 1. betulin (standard), 2. P _{II} , 3. γ -apoallobetulin (standard).	38
2.17	TLC produktů P _{II} reakce betulinu s KHSO ₄ . Mobilní fáze: n-hexan : ethylacetát (20 : 1): 1. betulin (standard), 2. P _{II} , 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. allobetulin (standard).	38
2.18	TLC látek ze zóny $\gamma_{I/1}$. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (15 : 1): 1. betulin (standard), 2. $\gamma_{I/1}$, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. allobetulin (standard).	39
2.19	Druhý chromatogram v preparativním provedení TLC k separaci γ -apoallobetulinu. $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$ a $\gamma_{I/2/3}$ značí zóny, které jsem z chromatografu sňal a dále zpracovával.	40
2.20	Chromatografické trubice naplněné sorbenty ze zón $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$, $\gamma_{I/2/3}$ při eluci obsažených látek do odvážených baněk ethylacetátem.	41
2.21	TLC látek ze zón $\gamma_{I/2/1}$, $\gamma_{I/2/2}$, $\gamma_{I/2/3}$. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (15 : 1): 1. $\gamma_{I/2/1}$, 2. $\gamma_{I/2/2}$, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. $\gamma_{I/2/3}$	42
2.22	TLC látek ze zón po oddělování třetí preparativní TLC. Mobilní fáze n-hexan : ethylacetát (10 : 3): 1. pohyblivější látky z baňky A, 2. látky z baňky B, 3. γ -apoallobetulin (standard), 4. látky z baňky C.	43

Seznam tabulek

1.1	Klasifikace terpenů.	4
1.2	Molární hmotnosti a body tání vybraných zástupců betulinu a jeho derivátů.	7
1.3	Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze. Převzato z lit. ^[19]	11
1.4	Dělení chromatografických technik podle skupenství mobilní a stacionární fáze. Převzato z lit. ^[19]	14
2.1	Hmotnosti a teploty tání krystalických podílů frakcí B2 až B4.	23
2.2	Hmotnosti a teploty tání krystalických podílů betulinových frakcí B3, B4 a B34 v porovnání se standardizovanými hodnotami.	25
2.3	Souhrn reakčních podmínek k dosažení produktů P _I až P _{VI}	32
2.4	Vážení odparků produktů P _I po rozdělení do frakcí.	35
2.5	Hmotnosti nanesených frakcí produktů P _I na preparativní chromatografickou desku.	36
2.6	Hmotnosti frakcí $\gamma_{1/2/1}$, $\gamma_{1/2/2}$, $\gamma_{1/2/3}$	42
2.7	Hmotnosti produktů získaných ze zón A, B a C.	43
2.8	Úbytek hmotnosti organických látek v průběhu jejich zpracování a izolování γ -apoallobetulinu.	44

Seznam schémat

1.1	α,α epoxidace γ -apoallobetulinu.	8
1.2	Příprava γ -apoallobetulinu z betulinu.	9
1.3	Transformace γ -apoallobetulinu Prinsovou reakcí.	10
1.4	Ozonolýza γ -apoallobetulinu.	10
2.1	Reakce betulinu s hydrogensíranem draselným.	26

Seznam použitých zkratek

- GLC plynová rozdělovací chromatografie
(angl. *gas-liquid chromatography*)
- GPC gelová permeační chromatografie
(angl. *gel permeation chromatography*)
- GSC plynová adsorpční chromatografie
(angl. *gas-solid chromatography*)
- HIV-1 virus lidské imunodeficiency 1. typu
(angl. *human immunodeficiency virus type 1*)
- HSV-1 *herpes simplex virus* 1. typu
- IEC iontově výměnná chromatografie
(angl. *ion exchange chromatography*)
- IUPAC Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii
(angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LLC kapalinová rozdělovací chromatografie
(angl. *liquid-liquid chromatography*)
- LSC kapalinová odsorpční chromatografie
(angl. *liquid-solid chromatography*)
- SFC chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu
(angl. *supercritical fluid chromatography*)
- TLC tenkovrstvá chromatografie
(angl. *thin-layer chromatography*)
- TsCl tosylchlorid
(podle IUPAC 4-methylbenzensulfonylchlorid)
- UV ultrafialový
(angl. *ultraviolet*)

Resumé

This thesis is comprised of two parts – theoretical and experimental. The theoretical part deals with triterpenoids particularly with betulin and its derivatives, and with chromatography, especially the thin-layer chromatography. Betulin and its derivatives evince significant biological activity, which is also mentioned in the theoretical part as well as the use of γ -apoallobetulin in selected organic reactions. The experimental part of the thesis is focused on an isolation of betulin from the birch bark extract, and on a preparation of γ -apoallobetulin from betulin at the potassium hydrogen sulfate acidic solution and its separation using thin-layer chromatography.