

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

**OPTIMALIZACE ZPRACOVÁNÍ
TRITERPENOIDNÍCH SLOUČENIN KŮRY
JEŘÁBU OBECNÉHO**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Matyáš Konopa

Přírodovědná studia obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň 2019

..

Čestné prohlášení

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

V Plzni dne 2019

.....
vlastnoruční podpis autora

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce panu Doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za ochotu a inspiraci při námětu této práce. Zároveň bych mu chtěl vyjádřit své upřímné díky za trpělivost při experimentální části práce.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická

Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Matyáš KONOPA**

Osobní číslo: **P16B0019P**

Studijní program: **B1001 Přírodovědná studia**

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

Název tématu: **Optimalizace zpracování triterpenoidních sloučenin kůry
jeřábu obecného**

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 chemií triterpenoidních sloučenin.
2. Seznámit se se základními metodami semimikrotechniky.
3. Seznámit se s technikou tenkovrstvé chromatografie.
4. Seznámit se s technikou preparativní tenkovrstvé chromatografie.



Rozsah grafických prací:

Rozsah kvalifikační práce: 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Keil B. a kol.: Laboratorní technika organické chemie, ČSAV, 1963

Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii, Pedagogická fakulta ZČU v Plzni, 1993

Gasparič J., Chudáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981

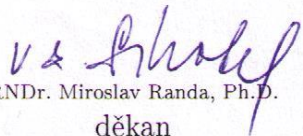
Vedoucí bakalářské práce:

Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.

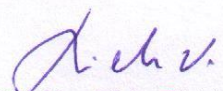
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 29. června 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. června 2019


RNDr. Miroslav Randa, Ph.D.
děkan




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 29. června 2018

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část.....	2
2.1. Terpeny	2
2.1.1. 23-hydroxybetulin	3
2.1.2. Betulin	3
2.2. Použité laboratorní metody	4
2.2.1. Extrakce.....	4
2.2.2. Destilace	5
2.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	5
2.2.4. Retenční faktor	8
2.2.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie	9
2.3. Metodika extrakce 23-hydroxybetulinu	10
2.3.1. Vyvození postupu extrakce	11
2.4. Chromatografická rozpouštědla	11
2.4.1. Eluotropní řada.....	12
2.4.2. Zásady pro výběr vhodného rozpouštědla.....	13
2.5. Pomůcky.....	13
2.5.1. Balónek	13
2.5.2. Kapiláry.....	14
3. Experimentální část	16
3.1. Pomůcky.....	16
3.1.1. Zhotovení kapiláry	16
3.1.2. Zhotovení balónku.....	18
3.1.3. Příprava desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii	19
3.2. Výběr rozpouštědla pro extrakci	20
3.2.1. TLC vzorků	21
3.2.2. Preparativní TLC vzorků.....	24
3.2.3. Využití RF při experimentu.....	25
3.2.4. Využití sloupcové chromatografie	26
3.2.5. Zhodnocení a výběr vhodného rozpouštědla.....	28
3.3. Extrakce 23-hydroxybetulinu.....	28
3.3.1. Soxlethův přístroj	28
3.3.2. Zmýdelnění vzorku	30

3.3.3.	Výpočet množství ethanolického roztoku NaOH pro zmýdelnění.....	31
3.3.4.	Proces zmýdelnění vzorku.....	32
3.3.5.	Preparativní tenkovrstvá chromatografie zmýdelněného materiálu.....	33
3.4.	Porovnání TLC meziproductů a produktu.....	36
3.5.	Porovnání výtěžků s předchozími pracemi.....	38
4.	Závěr	39
5.	Resumé	40
6.	Seznam použité literatury	41
7.	Seznam obrázků	42
8.	Seznam tabulek	42

1. Úvod

Tato práce navazuje na řadu prací, které byly již v minulosti na katedře chemie FPE ZČU v Plzni řešeny. Většina předchozích prací se zabývala izolací a přeměnami betulinu získaného z březové kůry. Izolace betulinu je součástí náplně laboratorních cvičení z organické chemie. Betulin je delší dobu sledován, hlavně pro své biologické účinky. V souvislosti s tím je často zmiňována vysoká biologická aktivita jeho kyslíkatých derivátů. Vedle kyseliny betulinové, která je obsažena, kromě jiného, v kůře platanu, je znám obsah 23-hydroxybetulinu v kůře jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*). Izolací tohoto terpenoidu se již někteří autoři obdobných prací zabývali. Předložená práce pojednává o možnostech získání 23-hydroxybetulinu na základě jeho známých vlastností, s cílem minimalizovat nároky na čas a materiál.

Nejčastějšími užitými metodami v této práci jsou: extrakce, krystalizace, tenkovrstvá chromatografie a preparativní tenkovrstvá chromatografie.

2. Teoretická část

2.1. Terpeny

Terpeny, též nazývány terpenoidy, jsou organické látky, které mají cyklický či acyklický charakter. Nejčastějším zdrojem těchto látek jsou převážně části rostlinných těl (např. kůra). Nalezneme je však i v pachových žlázách živočichů, tzv. feromonech hmyzu¹.

Pojem „terpeny“ označuje převážně uhlovodíky, přičemž obecnější pojem „terpenoid“ zahrnuje i jejich deriváty².

Terpenoidy dělíme dle počtu izoprenových jednotek tak, jak je uvedeno v tabulce č. 1. Jedná se o látky, jejichž fyzikální vlastnosti jsou v konečné fázi ovlivněny substitucí jednotlivých uhlíků. S počtem atomů uhlíku stoupá možnost tvorby izoprenových sloučenin. Velikou skupinu sloučenin tvoří monoterpeny a seskviterpeny, které jsou významné svou těkavostí. Zmíněné látky jsou známé jako vonné sloučeniny rostlin. V rámci jejich izolace je výhodné využít destilaci vodní parou. Z přírodních materiálů tak obvykle vyniká směs vonných silic¹.

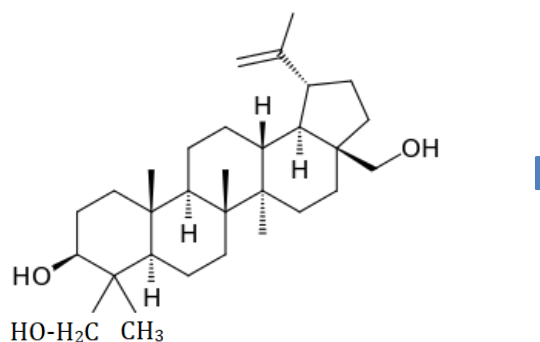
Tabulka 1: Dělení terpenů podle počtu izoprenových jednotek ve skeletu sloučenin¹

Počet izoprenových jednotek	Počet atomů uhlíku v molekule	Terpen
2	10	Monoterpen
3	15	Seskviterpen
4	20	Diterpen
6	30	Triterpen
8	40	Tetraterpen
n > 1000	5n	Polyterpen

2.1.1. 23-hydroxybetulin

23-hydroxybetulin (I) je pentacyklická látka triterpenoidního charakteru, jež se od betulinu (II) liší převážně obsahem hydroxylové skupiny na 23. uhlíku skeletu. Tato látka se nachází převážně v kůře jeřábu obecného z čeledi růžovitých, který se obvykle nachází na lesních pasekách či rumištích.

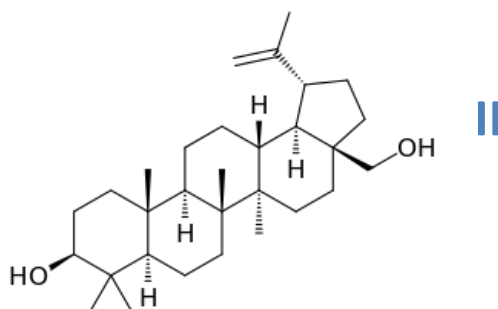
23-hydroxybetulin (I) lze také extrahovat z kořene čínské léčivé rostliny *Pulsatilla chinensis*. Tato látka se osvědčila jako prevence před nákazou virem HIV a údajně má sloužit také jako ochrana před nádorovými onemocněními. Tato sloučenina vykazuje podobné biologické aktivity jako betulin³.



2.1.2. Betulin

Betulin (II) je látka obsažená převážně v kůře bříz (*Betula* p.), odkud pochází také jeho název. Jedná se o přírodní, pentacyklický, tripenický alkohol, který se získává například extrakcí svrchní březové kůry s ethanolem⁴.

Mezi jeho účinky patří antibakteriální a antifungicidní vlastnosti, díky nimž nepodléhá rozkladu. Stejně jako 23-hydroxybetulin má protivirové a anti-HIV účinky. Poprvé byl připraven vědcem Löwitzem roku 1788⁴.



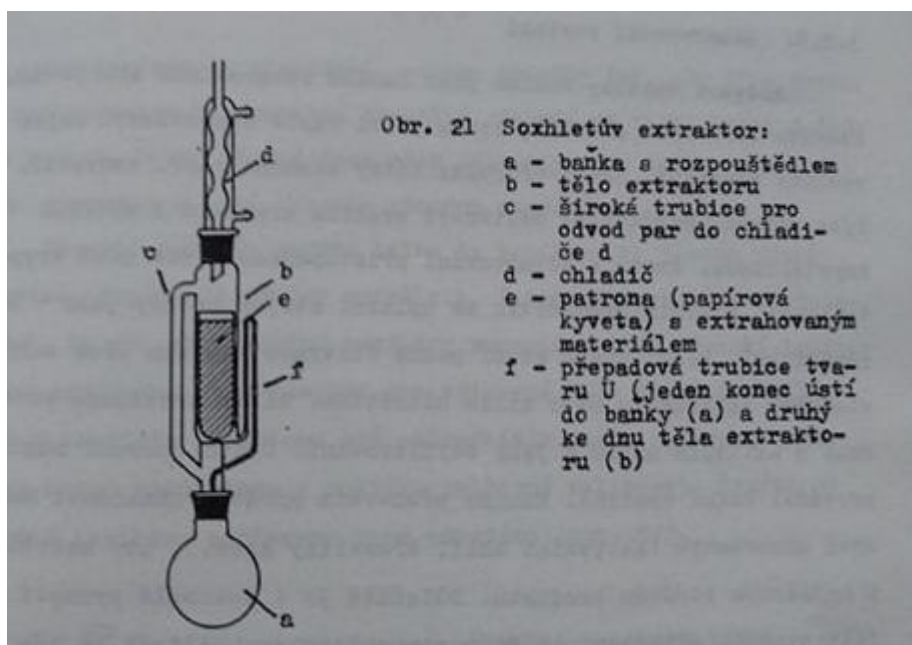
2.2. Použité laboratorní metody

2.2.1. Extrakce

23-hydroxybetulin lze získat pomocí Soxhletova přístroje extrakcí methanolem. Tato operace trvá několik hodin a provádí se opakovaně pro větší koncentraci látky obsažené v roztoku. Následně je látka koncentrována v rozpouštědle, spolu s dalšími jeho deriváty.

Výhodou Soxhletova přístroje je kontinuální extrakce stále čerstvým rozpouštědlem. Páry rozpouštědla stoupají širokou trubicí (c) do chladiče (d), kde kondenzují. Vzniklá kapalina, která následně kape do patrony. V patroně dochází k extrakci, přičemž vzniklý extrakt prolíná stěnou patrony a hromadí se v těle extraktoru (b). V případě, že hladina extraktu dosáhne vrcholu U-trubice (f), veškerý extrakt přeteče zpět do baňky (a) a celý proces se zopakuje (viz obr. č. 1). Jedná se o všeobecně využívanou metodu⁵.

Obrázek 1: Soxhletův extraktor⁵



2.2.2. Destilace

Destilace kapalin je jedna z nejdůležitějších a nejnáročnějších metod semimikrotechniky, kterou můžeme provádět v rozličných aparaturách. Dělicí efekt destilace je přímo úměrný rozdílu teplot varu destilovaných kapalin. Tato metoda je založena na různé těkavosti kapalných či zkapalněných látek s rozdílnou teplotou varu, díky čemuž jsou touto metodou dělitelné⁵.

Páry vzniklé varem směsi kapalin kondenzují v chladiči a jsou jímány do jímací baňky⁵.

2.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

V semimikrotechnice využijeme metodu známou jako tenkovrstvou chromatografií (TLC), která slouží pro analytické účely ke sledování čistoty zkoumané organické látky. Tato metoda je nejvhodnější pro zpracování barevných sloučenin, avšak dá se použít i pro látky bezbarvé. Následně je nutné využít různých detekčních činidel, jako například jodu či kyseliny sírové⁵.

Chromatografií 23-hydroxybetulinu se zabýval americký biochemik Lawrie, který z kůry blahovičnicku královského (*Eucalyptus regens*), odtučněním vzorku pomocí petroletheru a světla, vyextrahoval etherem 14 g nezmýdelněného materiálu. Proces trval celých 24 hodin. Tento nezmýdelněný materiál obsahoval 23-hydroxybetulin (7-3g). Vzorek následně chromatografoval v poměru 99:1 směsí ether:methanol na oxidu hlinitém. Eluce těchto směsí následně poskytla frakce, které se spojily a vykrytalizovaly⁶.

Jeho práce také zahrnovala zkoumání různých derivátů této látky. Například 23-hydroxyallobetulin, získaný pětihodinovým vařením 23-hydroxybetulinu pod zpětným chladičem ve směsi ethanolu a koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Produkt dále izoloval etherem, což vedlo ke vzniku látky 23-hydroxyallobetulin. Druhým způsobem vhodným k získání stejné látky byl var 23-hydroxybetulinu pod zpětným chladičem s koncentrovanou kyselinou mravenčí, jež poskytl látku 23-formyloxyallobetulin⁶.

Posléze Lawrie využil reakci přestavby 23-hydroxyallobetulinu na allobetulin tím, že zahříval tuto látku společně s diethylglykolem a hydrátem hydrazinu pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Následně do roztoku přidal 13 g hydroxidu draselného ve 20 ml destilované vody. Dalším krokem bylo půlhodinové zahřívání kapaliny pod zpětným

chladičem a navazující destilace do bodu, kdy teplota páry dosáhla 220 °C. Poslední krok obnášel var směsi pod zpětným chladičem, ochlazení směsi, okyselení kyselinou chlorovodíkovou a extrakci etherem. Výsledkem byl tmavě červený olejovitý roztok, který byl chromatografován na oxidu hlinitém, a poté eluován etherem. Finální krystalizací vznikla látka allobetulin⁶.

„TLC“

Metoda TLC spočívá v nanesení zkoumaného vzorku či vzorků na předem označené místo či místa na startu destičky. Startem destičky se myslí oblast cca 1 cm od spodního okraje. Nejčastěji se jedná o hliníkovou destičku pokrytou sorbentem (směs silikagelu a oxidu hlinitého), která je tzv. stacionární fází. Mobilní fází se myslí směs rozpouštědel umístěných do vyvíjecí soustavy.

Soustavu rozpouštědel reprezentujících mobilní fází je doporučeno předem vyzkoušet. Z toho důvodu byly otestovány různé poměry dvojice látek n-hexanu a ethyl-acetátu, jež se pro pokus jeví jako nejvhodnější.

Jednotlivé poměry látek n-hexan a ethyl-acetát byly testovány v tomto pořadí: 10:3, 1:1, 3:10, 1:0 a 0:1. Nejvhodnějším poměrem se na základě testů prokázal poměr 10:3, a to konkrétně 1 ml Hexanu ku 0,3 ml ethyl-acetátu.

Při pokusech s ostatními poměry rozpouštědel došlo k nedostatečnému vzlínání směsi, či k nezastavení směsi v požadovaném rozmezí mezi čelem a startem⁹.

Po vložení chromatografické destičky do vyvíjecí soustavy s vhodným poměrem rozpouštědel dojde k okamžitému vzlínání rozpouštědla silikagelem směrem vzhůru. Jakmile se rozpouštědla dostanou k místům obsahující organickou látku, dojde k jejímu dělení stejným způsobem, jakým se dělí barva fixu na papíře politém vodou.

Je možno zvolit jakéhokoliv poměru rozpouštědel (jinou vyvíjecí soustavu). V případě využívání rozdílných vyvíjecích soustav upozorujeme, že se identická látka dělí v různých vzdálenostech mezi startem a čelem. Tento jev vyjadřuje veličina známá jako retenční faktor (Rf).

Obrázek 2: TLC látky v různých soustavách rozpouštědel (*n*-hexan:ethyl-acetát zleva: 10:3, 1:1, 3:10, 1:0, 0:1)

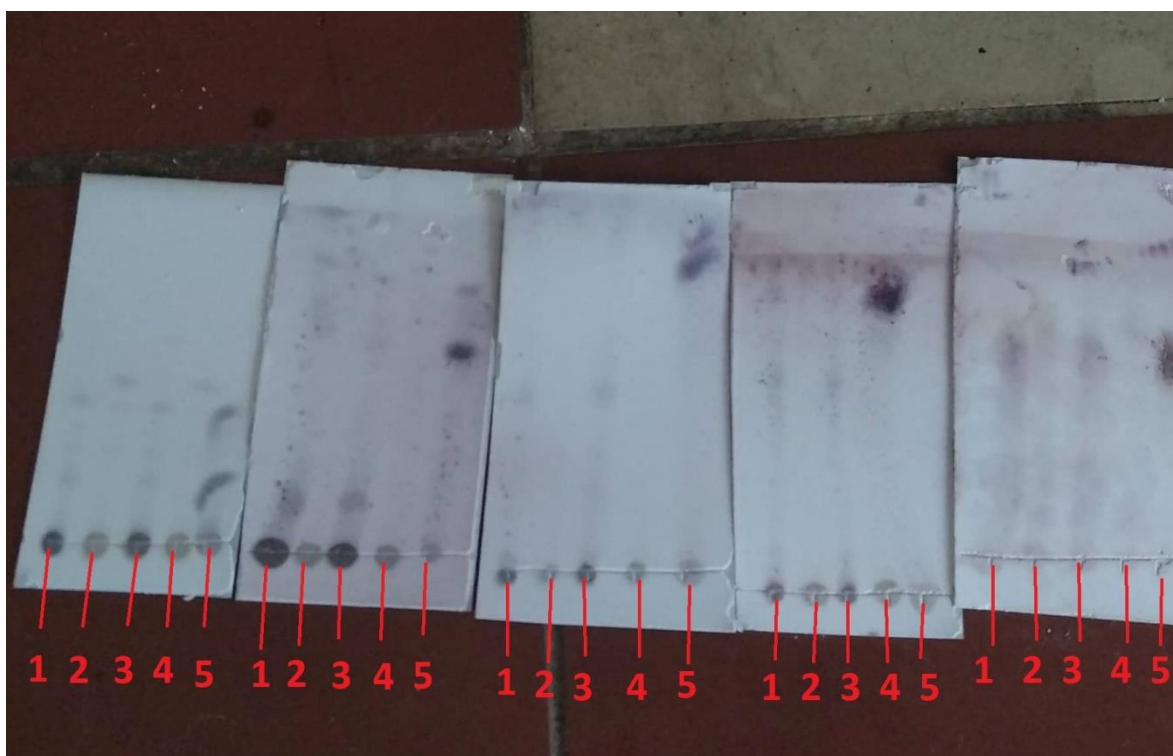
Pozice 1 - vzorek louhovaný v methanolu

Pozice 2 - vzorek louhovaný v ethanolu

Pozice 3 - vzorek louhovaný v chloroformu

Pozice 4 - vzorek louhovaný v acetonu

Pozice 5 - vzorek louhovaný v dioxamu



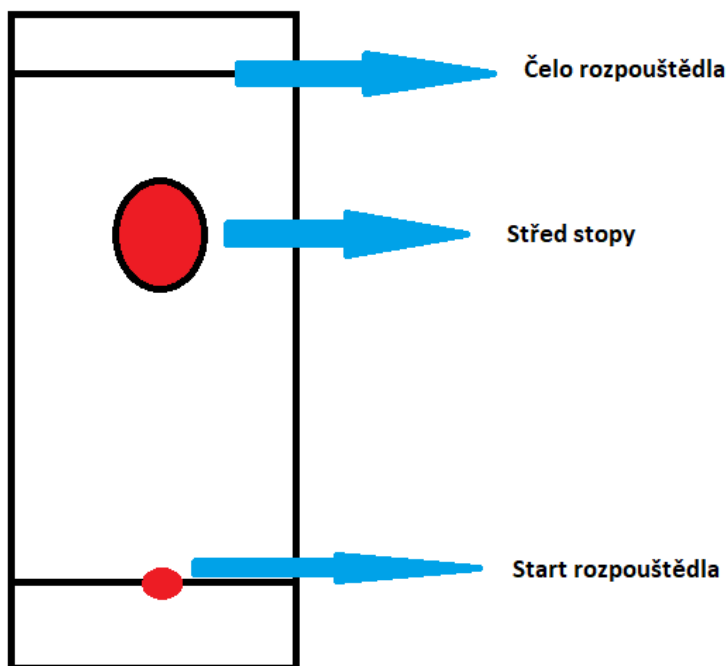
2.2.4. Retenční faktor

Retenční faktor se vypočítá jako podíl vzdálenosti středu stopy analyzované látky po vztlínání (a) a vzdálenosti startu a čela vztlínaného rozpouštědla (b)⁷.

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

Díky retenčnímu faktoru si můžeme přepočítat rozmezí jednotlivých zón obsahující specifické oddělené látky z malých TLC destiček na velké skleněné desky (20x20 cm) převrstvené silikagelem. Skleněných desek využívá metoda, známá jako preparativní tenkovrstvá chromatografie (viz další pododstavec)⁷.

Obrázek 3: Hliníková destička a sorbent



2.2.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

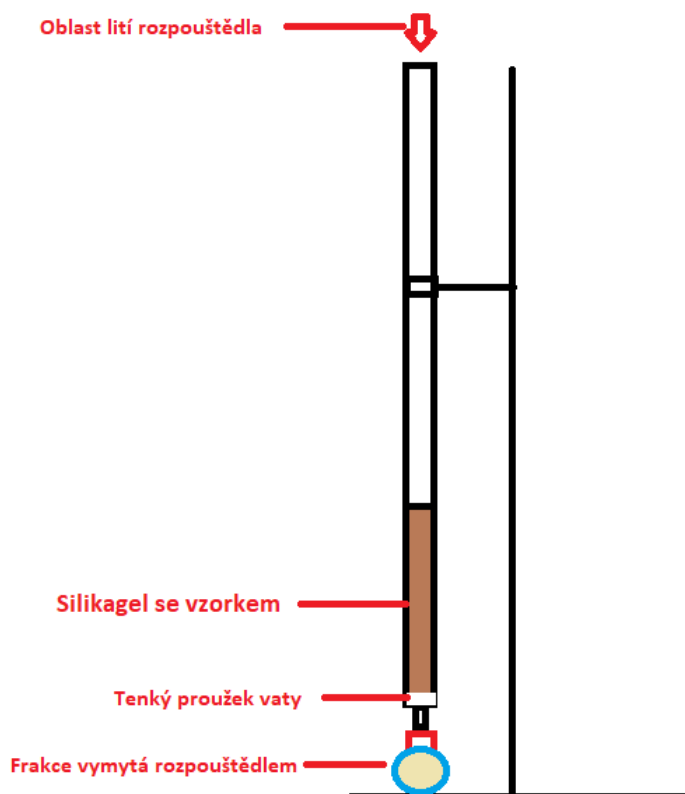
Metoda preparativní TLC, původně určená pro analytickou chemii, je skvěle využitelná pro preparativní účely. Tato metoda spočívá ve vhodné detekci chromatografických zón jednotlivých látek stoupajících silikagelem, sejmutím příslušné části vrstvy do chromatografické trubice a elucí vhodným (obvykle polárním) rozpouštědlem do předem zvážené baňky s varným kamínkem⁵.

Frakce vzniklé elucí rozpouštědla v kolonách jsou následně vyjmuty, oddestilovány ve vhodné destilační aparatuře a dále dosušeny v sušárně při cca 120 °C.

Po řádném vysušení vzorku se baňka zváží, načez se vypočítá výtěžek odečtením hmotnosti prázdné baňky obsahující varný kamínek a stejné baňky s kamínkem uchovávající vzorek.

Finálním krokem této metody je zakápnutí jednotlivých vysušených frakcí 2 ml chloroformu a následné nanesení vzorků kapilárou na chromatografické destičky, které později využijeme pro metodu tenkovrstvé chromatografie. Díky tomuto postupu zjistíme, jaká rozpouštědla jsou více či méně vhodná pro extrakci dané látky.

Obrázek 4: Znázornění aparatury sloupcové chromatografie



2.3. Metodika extrakce 23-hydroxybetulinu

Z důvodu průměrné vybavenosti univerzitní laboratoře byl zvolen praxí prověřený Soxhletův přístroj, jež je vhodný k extrakci organických látek z přírodních kůr a jiných materiálů.

Pro korektní postup extrakce 23-hydroxybetulinu bylo zprvu nezbytné zvolit správnou metodiku práce.

Metodika autorů článku Chemical Society č. 4303 z roku 1960

Skupina amerických vědců pod vedením J. W. Lawrieho odtučnila vzorek kůry blahovičnicku královského pomocí petroletheru (*Eucalyptus regens*) a následně etherem vyextrahovala 14 g nezmýdelněného materiálu, který na základě chromatografií ve směsi 99:1 ether:methanol na oxidu hlinitém obsahoval 3-7 g 23-hydroxybetulinu⁶.

Metodika Doc. Mgr. Václava Richtra, CSc.

Český vědec extrahoval 180 g kůry jeřábu obecného (*sorbus aucuparia*), vysušeného do konstantní hmotnosti při 105 stupních celsia v Soxlethově extraktoru pomocí petroletheru. Následným oddestilováním rozpouštědla získal procentuální výtěžek 0,9 %, který dle TLC 23-hydroxybetulin prakticky neobsahoval. V petrolétherickém extraktu se nacházely jiné, méně polární složky⁸.

Posléze tuto kůru extrahoval etherem (50 hod.) a po usušení při 105 stupních celsia získal procentuální obsah látky 3,2%. TLC metoda prokázala, že etherický vzorek obsahoval 23-hydroxybetulin ve velkém množství⁸.

Třetí extrakce v pořadí, provedena methanolem, trvala 50 hodin a po oddestilování rozpouštědla Richtr navázil 19,4 g extraktu, což je jednoznačně nejvyšší množství. Tato hmotnost odpovídá procentuálnímu výtěžku 10,8 % nezmýdelněné látky. Výsledná látka po analýze metodou TLC obsahovala velké množství polárnějších složek na úkor 23-hydroxybetulinu⁸.

Následovala reakce zmýdelňování vzorku pomocí alkoholického roztoku hydroxidu draselného, přičemž se uvolňovalo mnoho amoniaku.

Ani ve zmýdelněném methanolickém roztoku nebyla prokázána přítomnost žádané látky. Čistý 23-hydroxybetulin byl detekován až chromatografií na sloupci oxidu hlinitého a krystalizací ze směsi methanolu a benzenu⁸.

Při zpracování většího množství etherického extraktu je vhodné využít opakované krystalizace ve směsi methanolu a benzenu⁸.

2.3.1. Vyvození postupu extrakce

Při extrakci 23-hydroxybetulinu methanolem je nutné výsledný extrakt zmýdelnit ethanolickým roztokem NaOH, následně jej chromatografovat na sloupci oxidu hlinitého a poté opakovaně krystalizovat ve směsi methanolu a benzenu.

Během této práce byla otestována metoda extrakce vzorku přímo v methanolu, následovaná jeho zmýdelněním ethanolickým roztokem NaOH. Výsledný produkt byl podroben preparativní TLC, jejíž frakce poskytla vzorek 23-hydroxybetulinu o relativní čistotě.

2.4. Chromatografická rozpouštědla

Chromatografická rozpouštědla se liší především svou schopností rozpustit danou látku, což závisí na jejich polaritě a selektivitě⁹.

Polarita je řízena poučkou „podobné se rozpouští v podobném“, z toho vyplívá závislost podobnosti polarit rozpouštědla a rozpouštěné látky⁹.

Nebude-li mít mobilní a stacionární fáze podobnou polaritu, pak se nemusí se chromatografie zdařit. V případě rozdílné podobnosti zůstane stacionární (pevná) fáze na startu chromatografické destičky a metoda se nepovede, neboť mobilní fáze nebude schopna se vzorkem vzlínat vzhůru. Druhá možnost udává nezastavení mobilní fáze a vzlínání fáze stacionární přes vhodné chromatografické rozmezí⁹.

Hodnota R_f rozpouštědla nesmí být přehnaně vysoká ale ani příliš nízká, neboť výběr rozpouštědla má přímý vliv na hodnotu R_f látek, které jsou od sebe oddělovány⁹.

Z důvodu vlivu různých rozpouštědel na R_f je třídíme do tzv. eluotropních řad⁹.

2.4.1. Eluotropní řada

V eluotropních řadách jsou rozpouštědla zařazena podle klesající relativní permitivity v následujícím pořadí (viz tab. č. 2)¹⁰.

Rozpouštědla, která se v této řadě nacházejí nejvýše, jsou vhodná i pro vymytí složek směsí s vysokou polaritou. Naopak rozpouštědla zastupující nejnižší pozice jsou vhodná především pro jemnější dělení směsí¹⁰.

Tabulka 2: Eluotropní řada rozpouštědel vhodných pro tenkovrstvou chromatografii

Rozpouštědlo:	Pořadí:
Voda	1
Methanol	2
Ethanol	3
Propan-1-ol	4
Aceton	5
Ethyl-acetát	6
Diethylester	7
Chloroform	8
Benzen	9
Toluen	10
Chlorid uhličitý	11
Cyklohexan	12

2.4.2. Zásady pro výběr vhodného rozpouštědla

První zásadou je výběr takového rozpouštědla, v němž se všechny složky směsi ještě rozpouštějí¹⁰.

Dle druhé zásady je vhodné vybrat takové rozpouštědlo, aby dělené látky nebyly na zvoleném absorbentu poutány příliš málo ale ani příliš pevně. Budou-li látky na absorbentu poutány příliš pevně, dojde k zastavení směsi již na startu. V druhém případě se směs látek v postupu nezastaví. Nejvýhodnější je tedy poutat dělené látky na absorbentu středně pevně, přičemž se uplatní rozdíly v jejich retenčním faktoru¹⁰.

2.5. Pomůcky

2.5.1. Balónek

Velmi účinný nástroj pro manipulaci s kapalinami je bezesporu balónek. Balónek můžeme zhotovit převážně ze skleněných trubic o vhodném průměru. Během několikaleté praxe na naší fakultě bylo zjištěno, že nejlepší průměr skleněných trubic činí 8 – 12 mm, což umožňuje snadnou výrobu tohoto jednoduchého nástroje. Vhodné je zvolit trubici se silnější stěnou, což eliminuje jeho přehnanou křehkost a zamezí prasknutí.

Funkce balónku je dána především změnou tlaku plynu obsaženého uvnitř v závislosti na vnitřní a vnější teplotě. Snižování teploty zapříčiní snížení tlaku uvnitř balónku a dochází k nasávání. Naopak při zvýšení teploty dojde ke zvýšení tlaku, což vede k jeho vyprazdňování. Balónek může zároveň sloužit k uchovávání kapalin v semimikrotechnice⁵.

2.5.2. Kapiláry

Změna výšky hladiny v kapilárách je spojena převážně s kapilárním tlakem, který vzniká díky zakřivení povrchu. Pod rovným povrchem je vnitřní tlak menší než těsně pod rovinným povrchem kapaliny v okolí kapiláry, a to o kapilární tlak. Kapalina tedy klesne přesně o takovou výšku, aby byl kapilární tlak kompenzován¹¹.

Pro volný povrch kapaliny kulového tvaru je kapilární tlak p_k dán vztahem

$$p_k = \frac{2\sigma}{r},$$

kde r je poloměr kapiláry a σ povrchové napětí kapaliny. V případě kapilární elevace vystoupí kapalina do takové výšky h , aby hydrostatický tlak odpovídající sloupci kapaliny výšky h byl stejný jako kapilární tlak. Má-li kapalina hustotu ρ , pak uvedenou podmínku zapíšeme ve tvaru

$$h\rho g = \frac{2\sigma}{r}.$$

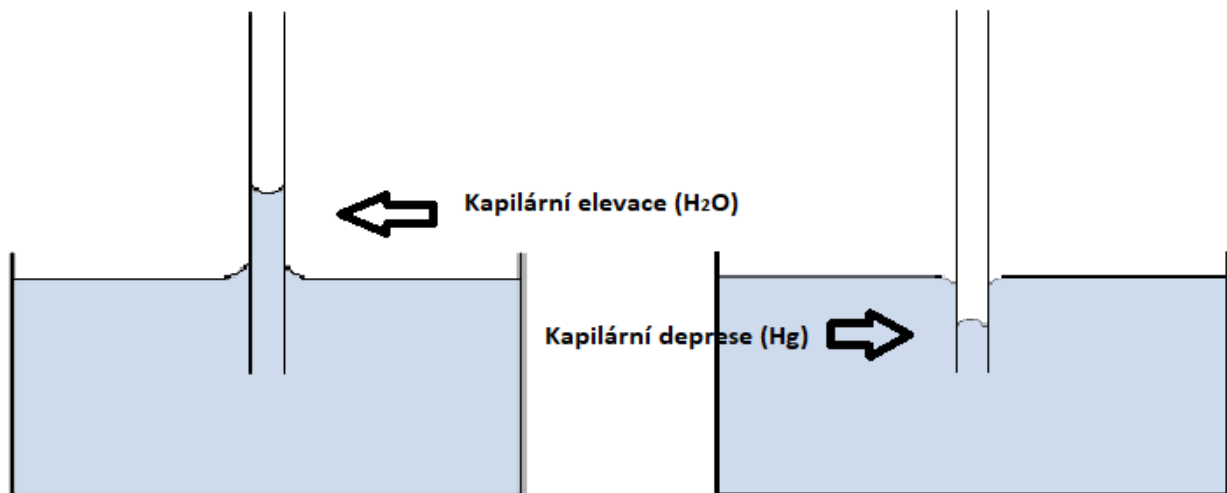
Odtud výška při kapilární elevaci

$$h = \frac{2\sigma}{r\rho g}.$$

Při daném poloměru kapiláry je výška h tím větší, čím větší je povrchové napětí kapaliny. Obdobné úvahy platí i pro kapilární depresi. Vztah pro výpočet výšky při kapilární elevaci umožňuje experimentálně určit povrchové napětí kapaliny pomocí kapiláry¹¹.

Kapilární elevace je stav, kdy je kapilára zanořena do takové kapaliny, ve které jsou molekulové interakce mezi buňkami stěny kapiláry silnější, než interakce mezi molekulami kapaliny. Výsledkem tohoto jevu je silové působení, které vede ke vzlínání kapaliny kapilárou. Opakem toho jevu, kdy dochází k sestupu kapaliny kapilárou níže, než je hladina tekutiny v okolí kapiláry, se nazývá kapilární deprese¹².

Obrázek 5: Kapilární elevace a deprese¹¹



3. Experimentální část

V průběhu experimentální části bylo využito dostupného vybavení školní laboratoře. Pod pojmem „voda“ je myšlena voda destilovaná a bylo užíváno chemikálií o běžné čistotě.

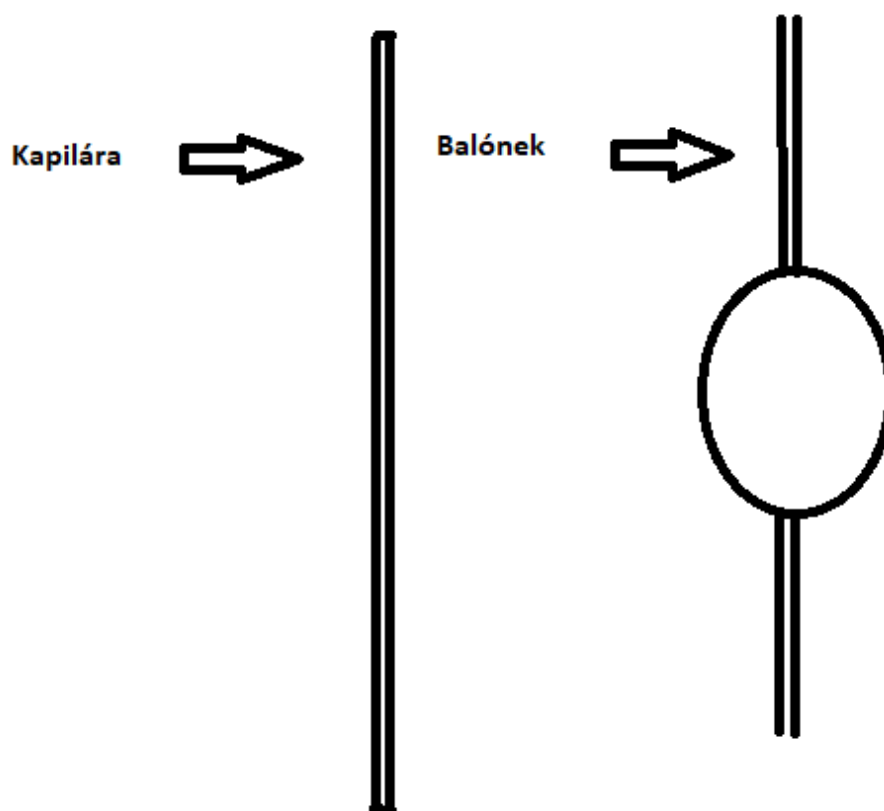
3.1. Pomůcky

Nezbytnou fází práce byla příprava důmyslných pomůcek, jež nám práci značně usnadnily. Jedná se o nástroje vhodné k přemísťování kapalin, a sice kapiláry a balonky.

Druhá část zahrnovala přípravu skleněných chromatografických desek užitých v preparativní tenkovrstvé chromatografii.

3.1.1. Zhotovení kapiláry

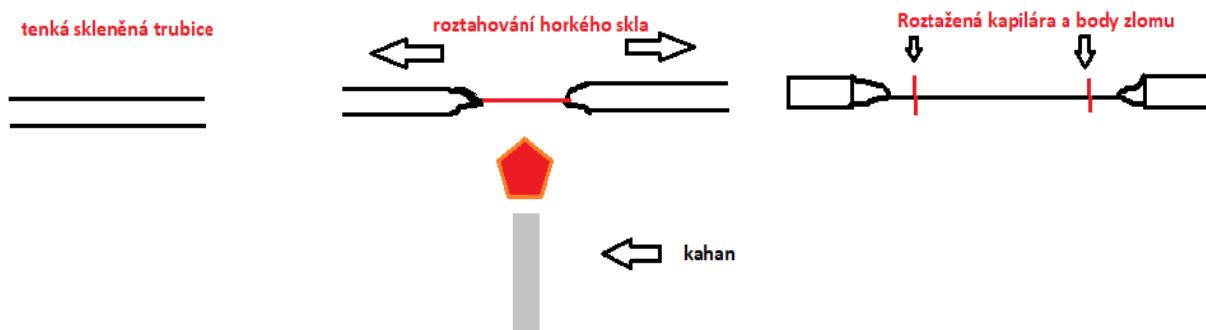
Obrázek 6: Tvar kapiláry a balónku



Mezi pomůcky nutné k přípravě kapiláry patří vhodná skleněná trubice o průměru (8 – 12 mm), nůž na sklo a kahan.

Postup pro výrobu kapiláry je jednoduchý. Uřízneme si dostatečně velký kus skleněné trubice (přibližně 20 cm). Trubice se řeže způsobem lehkého naříznutí stěny skla speciálním nožem a následným pohybem vzhůru, kdy dojde k rovnoměrnému lomu směrem k bodu naříznutí. Po uříznutí trubici chytíme na koncích, přičemž ji rovnoměrně zahříváme plamenem kahanu. Ve chvíli kdy jsme si jisti dostatečným zahřátím materiálu, přejdeme k mírnému potahu od sebe. V průběhu této operace vyjmeme trubici z plamene a opatrným potahem roztáhneme sklo do vhodných rozměrů. V této fázi práce může dojít k přetrhnutí trubice, proto je nutná opatrnost a pečlivost. V případě úspěšného pokusu vznikne uprostřed skla tenoučká kapilára, kterou následně vylomíme (viz obr. č. 7)⁵.

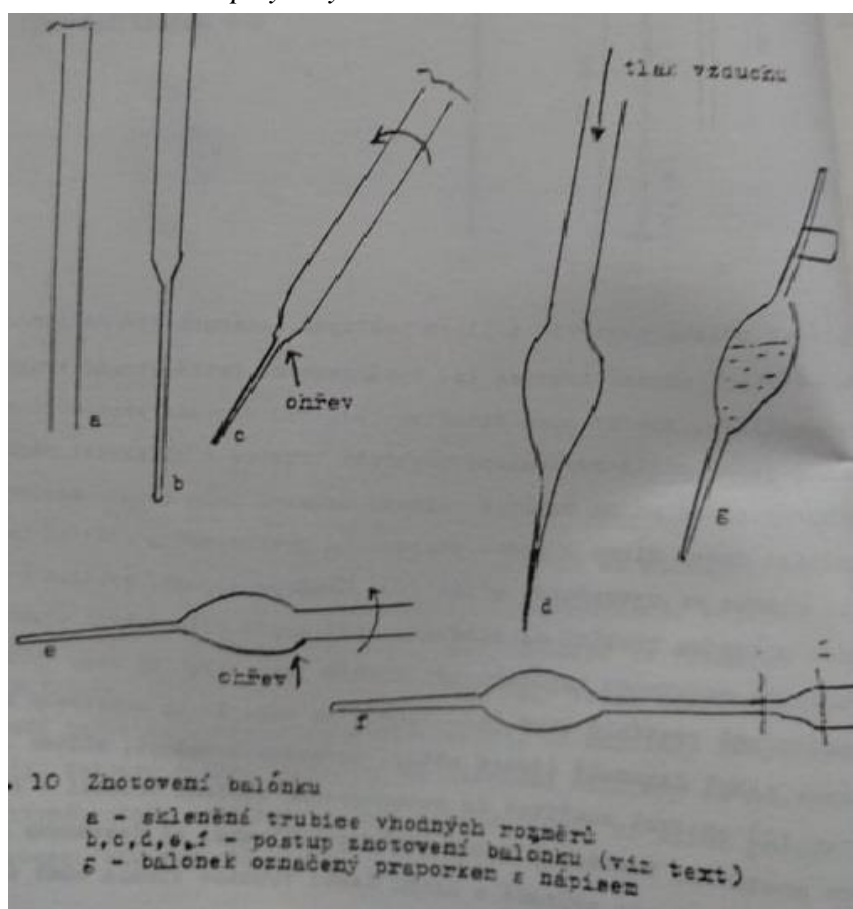
Obrázek 7: Výroba kapiláry běžným způsobem



3.1.2. Zhotovení balónku

Nejideálnějším způsobem zhotovení balónku je oddělení vhodné dlouhé skleněné trubice (cca 20 cm) a její následné vytažení do kapiláry, kterou ihned zatavíme. Je důležité prohřát trubicu v blízkosti kapilárního vytažení na teplotu měknutí skla. Z tohoto důvodu je třeba držet sklo šikmo k desce stolu a ve vhodné výšce s polotovarem rovnoměrně otáčet nad plamenem. Po dostatečném prohřátí skla jej ihned vyjmeme ze žáru, chytíme jej za studenou část a tahem vytvoříme tenkou kapiláru. Kapiláru na jedné straně utavíme, přičemž část zužující se trubice do tvaru kapiláry znovu nahřejeme. Dosáhne-li polotovar měkkého stavu, vyjmeme jej a foukneme do studeného konce skleněné trubice, což má za následek vytvoření duté vyboulené části. Dalším krokem je vytvoření zúženého kapilárního místa nad vypouklou dutinou. Toho docílíme zahřátím místa styku trubice s vypouklou částí a následným vyjmutím balónku z plamene. Tahem vytvoříme tvar balonku, načež protáhlou část ve vhodné výšce odломíme. Postup je shrnut na následujícím obrázku č. 8⁵.

Obrázek 8: Postup výroby balónku⁵



3.1.3. Příprava desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografií

Pro metodu preparativní tenkovrstvé chromatografie bylo použito skleněných desek o rozměrech 20x20 cm, které byly očištěny ethanolem. Po jejich vyschnutí byl připraven silikagel pro pokrytí deskového povrchu.

Základní surovinou pro přípravu povrchu bylo zvoleno 20 g práškového silikagelu a 45 ml destilované vody. Prvním krokem bylo navážení silikagelu, k čemuž se využila elektronická váha. Na této váze byla umístěna Erlenmeyerova baňka sloužící pro mísení této směsi. Nespornou výhodou elektronické váhy je možnost vytárování nádoby, do níž odsypáváme váženou látku. Baňka byla tedy vytárována do hmotnosti 0 g a naplněna 20 g silikagelu. Po naplnění baňky přesně 20 g této látky došlo k opatrnému přilítí 45 ml destilované vody pomocí odměrného válce a následnému homogenizování směsi mícháním. Po homogenizaci byl obsah vylit na skleněnou desku a rovnoměrně rozprostřen na jejím povrchu. Při nedostatečném rozprostření silikagelu bylo zvoleno metody poklepání zespodu desky a rozetření směsi pomocí hrdla Erlenmeyerovi baňky, ve které se obsah nacházel.

Obrázek 9: Skleněná desku určená pro preparativní tenkovrstvou chromatografií pokryta silikagelem



3.2. Výběr rozpouštědla pro extrakci

Na počátku práce bylo nutno zvolit nejvhodnější rozpouštědlo pro extrakci 23-hydroxybetulinu z kůry jeřábu obecného, to znamená zvolení takového rozpouštědla, které ze vzorku vymývá největší procentuální výtěžky extrahované látky.

Z toho důvodu bylo přistoupeno k metodě naplnění pěti lékovek malými, předem zváženými podíly kůry a následnému přilítí různých rozpouštědel (viz tab. č. 3).

Tabulka 3: Obsah jednotlivých lékovek

Číslo vzorku	Rozpouštědlo	Hmotnost kůry v gramech
1	methanol	0,9981
2	Etanol	1,0023
3	aceton	1,0026
4	dioxan	1,0069

Po několikadenním louhování kůry v různých rozpouštědlech bylo přistoupeno k metodě tenkovrstvé chromatografie z důvodu zjištění, ve kterém rozpouštědle dojde k největšímu vymývání extrahované látky.

Byla využita soustava 10:3 hexan:ethyl-acetát, neboť poměr těchto rozpouštědel vynáší látky na chromatografické desce v rozumném rozmezí mezi startem a čelem.

Tyto poměry byly v průběhu experimentu testovány (viz kapitola 3.2.1.).

3.2.1. TLC vzorků

Prvním krokem metody TLC bylo ustřížení plíšku chromatografické fólie DC-AlufolienKieselgel 60 F254 pokrytého silikagelem o vhodném rozměru pasujícím do vyvíjecí soustavy. Následně došlo k vyznačení startu (na straně pokryté silikagelem cca 1 cm od spodku plíšku). Po vyznačení startu následovalo vyrytí pěti bodů pro nanesení jednotlivých vzorků s optimálními odstupy (prevence překrytí drah vzlínání). V případě překrytí drah by bylo nutno celý postup opakovat.

Dalším krokem bylo nanášení vzorku tenkou kapilárou. Kapilára byla namočena do lékovky se vzorkem a nasátá tekutina byla nanesena na vyznačený bod v silikagelu. Kontaminovaná část kapiláry byla odlomena a zbytek byl použit na nanesení dalšího vzorku. Tento postup byl opakován u všech následujících lékovek. Poslední pozice na chromatografické destičce byla převrstvena vzorkem betulinu, který sloužil k účelu porovnání.

Po nanesení všech vzorků došlo k naplnění vyvíjecí soustavy, přičemž nanesené vzorky vysychaly. Vyvíjecí soustava byla plněna hexanem a ethyl-acetátem v poměru 10:3, což znamená 1 ml hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu. Pro zachování čistoty a přesnosti chromatografie není moudré využívat pouze jedné pipety pro přenos všech látek.

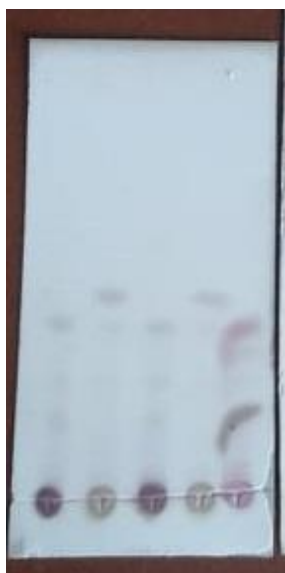
Po naplnění vyvíjecí soustavy započalo vyvíjení vzorku. Chromatografický plíšek s nanesenými vzorky byl vložen pomocí pinzety dospod vyvíjecí soustavy a následně byla soustava překryta krycím sklíčkem, jež zabraňuje úniku par rozpouštědel.

Posléze bylo pozorováno vzlínání rozpouštědel skrz silikagelovou vrstvu chromatografické destičky.

Po vystoupení rozpouštědel cca 2 cm od vrchního okraje, byl plíšek vyjmut a postříkán roztokem 10% kyseliny sírové. H_2SO_4 je vhodné detekční činidlo, pro vypálení stopy vzlínání vzorku na topné spirále.

Na základě souboru **obrázků č. 10** bylo usouzeno, že nejvhodnější poměr rozpouštědel vyvíjecí soustavy je 10:3 n-hexan:ethyl-acetát.

Soubor obrázků 10: *Různý poměr rozpouštědel hexan:ethyl-acetát v poměru a) 10:3, b) 1:1, c) 3:10, d) 1:0 a e) 0:1, pozice jednotlivých rozpouštědel viz obr. č. 2*



a)



b)



c)



d)



e)

Zahuštění a výtěžky vzorků

Po provedení všech chromatografií bylo přistoupeno k vysušení jednotlivých vzorků na topné spirále za opatrného míchání a vložení zatavené kapiláry. Zatavené kapiláry bylo použito pro zamezení výskytu utajeného varu. Její nesporná výhoda spočívá ve snadném vyjmutí po zahuštění vzorku, přičemž nemusí být využito varného kamínku, který by zkresloval hmotnostní data.

Pro dosažení optimální hustoty vzorku bylo třeba jisté opatrnosti, neboť by mohlo dojít k jeho spálení. Z důvodu nebezpečí připálení nebyl vzorek destilován do sucha. Po optimálním zahuštění byl vzorek vložen do laboratorní sušárny, kde při 120 °C doschnul do konstantní hmotnosti.

Po vyschnutí byla lékovka s vysušeným extraktem zvážena. Následně byly získané hodnoty hmotnosti lékovky prázdné a lékovky se vzorkem navzájem odečteny. Hmotnosti a procentuální obsahy jednotlivých vzorků prezentují tabulky číslo 4 a 5.

Tabulka 4: Jednotlivé hmotnosti extraktů extrahované v příslušných rozpouštědlech

Číslo vzorku	Použité rozpouštědlo	m prázdné lékovky	m lékovky se vzorkem	m vzorku
1	methanol	14,561 g	14,700 g	0,139 g
2	ethanol	14,885 g	14,885 g	0,102 g
3	chloroform	14,807 g	14, 870 g	0,063 g
4	Aceton	14,678 g	14, 773 g	0,095 g
5	dioxam	14,801 g	14,977 g	0,176 g

Tabulka 5: Procentuální výtěžky jednotlivých extraktů v lékovkách

Vzorek	Rozpouštědlo	m kůry	m extraktu	% výtěžek
1	methanol	0,9981 g	0,139 g	13,92 %
2	ethanol	1,0023 g	0,102 g	10,17 %
3	chloroform	1,0026 g	0,063 g	6,28 %
4	aceton	0,9971 g	0,095 g	9,52 %
5	dioxam	0,9971 g	0,176 g	17,65 %

Dle tabulky číslo 5 bylo usouzeno, že největšího procentuálního výtěžku extrakce v Soxlethově přístroji bude dosaženo použitím methanolu či dioxamu. Methanol je však vhodnější díky svým vlastnostem, ceně a vymývá značně čistší produkt, než druhé zmíněné rozpouštědlo (viz soubor obrázků číslo 10, destička a)).

3.2.2. Preparativní TLC vzorků

Jednotlivé lékovky obsahující vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 2 ml methanolu a následně balónkem přemístěny na chromatografické desky převrstvené vrstvou silikagelu.

Vzorky byly na desky nanášeny v cca 3 cm vrstvě nad spodním okrajem. Obsah balonku byl opatrně nanášen ve formě souvislé čáry 2 cm od laterálních okrajů chromatografické desky (viz obrázek číslo 11).

Obrázek 11: Nanesený vzorek na chromatografické desce



Posléze byly desky obsahující vzorky umístěny do akvária s předem otestovanou soustavou rozpouštědel (10:3 hexan:ethyl-acetát). Po uzavření a zatížení stropu akvária začaly páry rozpouštědel vzlínat a vytlačovat stacionární fázi vzhůru.

3.2.3. Využití Rf při experimentu

Po vyjmutí a vysušení preparativních desek bylo nutno spočítat vzdálenosti jednotlivých zón vymytých látek od startu (čára naneseného vzorku).

Pomocí Rf je možné přepočítat vzdálenost jednotlivých zón pomocí analogické vzdálenosti na malých preparativních destičkách použitých v TLC.

Postupujeme dle vzorce

$$RF = \frac{Vm}{Vr}$$

Vm = vzdálenost skvrny od startu

Vr = vzdálenost čela od startu

Rf = retenční faktor

- **Malá chromatografická destička stejné chromatografované látky.**

a) **Vm**=0.5 cm (vzdálenost první skvrny od startu)

b) **Vm**=2 cm (vzdálenost druhé skvrny od startu)

Vr =4,55 cm

a) $Rf = \frac{0,5}{4,55} = 0,10989$

b) $Rf = \frac{2}{4,395} = 0,4395$

- **Velká chromatografická deska, stejné chromatografované látky**

$V_r = 23,5$ cm (vzdálenost čela od startu)

$$V_m = R_f * V_r$$

a) $R_f = 0,10984 * 23,5 = 2,6$ cm

b) $R_f = 0,4395 * 23,5 = 10,3$ cm

Tímto způsobem je možné přesně určit vzdálenost jednotlivých zón vymyté látky od startu.

3.2.4. Využití sloupcové chromatografie

Detekci jednotlivých zón na preparativních deskách následovalo jejich označení špachtlí a sejmutí do příslušných, předem popsanych kolon. Kolony označené „vrch“, „střed“ a „spodek“ byly zality 50 ml ethanolu, který z nich vymyl jednotlivé frakce do předem zváženy a označeny Erlenmeyerových baněk, obsahujících varný kamínek. Tato metoda byla opakována u všech vzorků 1,2,3,4 a 5.

Po dvoudenním vymývání kolon následovalo vysušení jednotlivých frakcí v destilační aparatuře. Jednotlivé frakce byly zahuštěny a dosušeny v sušárně na konstantní hmotnost při 120 stupních celsia.

Posledním krokem této metody bylo zvážení vysušených vzorků (viz tabulka číslo 6).

Tabulka 6: Hmotnosti a procentuální výtěžek jednotlivých frakcí.

Vzorek	m prázdné baňky s v. kamínkem	m baňky se vzorkem s v. kamínkem	m vzorku	% výtěžek
1 A	51,584 g	51,599 g	0,015 g	1,5 %
1 B	52,450 g	52,467 g	0,017 g	1,7 %
1 C	50,795 g	50,888 g	0,093 g	9,3 %
2 A	51,874 g	51,882 g	0,008 g	0,8 %
2 B	51,166 g	51,190 g	0,024 g	2,4 %
2 C	50,807 g	50,855 g	0,048 g	4,8 %
3 A	129,5338 g	129,549 g	0,0152 g	1,5 %
3 B	103,65 g	103,668 g	0,018 g	1,8 %
3 C	152,927 g	152,9530 g	0,026 g	2,6 %
4 A	51,535 g	51,611 g	0,076 g	7,6 %
4 B	51,418 g	51,437 g	0,019 g	1,9 %
4 C	51,535 g	51,599 g	0,064 g	6,4 %
5 A	130,254 g	130,302 g	0,048 g	4,8 %
5 B	125,799 g	upadla	upadla	Upadla
5 C	123,202 g	123,291 g	0,088 g	8,8 %

Z tabulky číslo 6 vyplývá, že nejvíce extrahované látky bylo obsaženo ve frakcích C, což jsou frakce zón nejbližší startu. Procentuální i hmotnostní výtěžek frakce 1 C v tabulce potvrdil užití methanolu pro extrakci látky v Soxlethově přístroji. Posléze byly jednotlivé skupiny vzorků spojeny (př.: C1+C2+C3), oddestilovány, vysušeny v sušárně do konstantní hmotnosti a chromatografovány (viz kapitola 3.4.).

3.2.5. Zhodnocení a výběr vhodného rozpouštědla

Ze získaných dat bylo usouzeno, že nejlepšími rozpouštědly pro extrakci 23-hydroxybetulinu z kůry jeřábu obecného jsou chemikálie č. 1 a 5. Extrakce látky v methanolu a dioxamu poskytla nejvyšší procentuální výtěžky daného produktu (viz tabulka č. 5 a 6).

Z těchto látek byl pro extrakci 23-hydroxybetulinu vybrán methanol, neboť dle TLC z kůry vymývá značně čistší produkt, než rozpouštědlo dioxam (viz soubor obr. č. 10, destička a)).

3.3. Extrakce 23-hydroxybetulinu

3.3.1. Soxlethův přístroj

Po zkoušce jednotlivých rozpouštědel v průběhu předchozího experimentu bylo pro extrakci vybráno rozpouštědlo methanol, neboť splňuje naše požadavky pro správné vymývání 23 - hydroxybetulinu.

Prvním krokem bylo nařezání kůry jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*) a jeho vysušení do konstantní hmotnosti.

Následně bylo nutno vysušený vzorek nalámat na malé kousky vhodné pro plnění do patrony Soxhletova extraktoru.

Po nalámání byl vzorek v papírové krabici zvážen z důvodu určení hmotnosti jednotlivých dávek vložených do patrony extraktoru a získání přehledu o poměru navážené kůry a výsledného výtěžku.

Tabulka 7: Celková hmotnost kůry po vysušení a hmotnost sušiny pro jednotlivá plnění patrony extraktoru

Celková hmotnost vysušené kůry použité k extrakci	1. Plnění	2. plnění	3. plnění
120,805 g	37,505 g	40,1 g	43,2 g

Po vložení kůry do extraktoru byla rozpouštědlem naplněná varná baňka opatřena několika varnými kamínky pro případnou eliminaci utajeného varu a vložena do topného hnízda. Směs se přivedla k varu a započala samotná extrakce, jež probíhala desítky hodin (jedna cca 24 hodin). Reflux byl proveden 3 x, následován opětovnou výměnou již použité kůry.

Po dokončení procesu byla varná baňka vyňata z hnízda a produkt v ní obsažen byl destilován v destilační aparatuře. Extrakt byl poté vysušen do konstantní hmotnosti při 120 °C v sušárně.

Vysušený extrakt byl následně zvážen a výsledná hodnota hmotnosti činila 20,6552 g. Posléze bylo nutné vypočítat procentní výtěžek nezmýdelněného produktu (viz tabulka č. 8).

Tabulka 8: Procentuální výtěžek extrakce.

m použité kůry	m vyextrahované látky	Výtěžek %
120,805 g	20,6552 g	17,09 %

Na základě tabulky č. 8 bylo extrakcí 120,805 g kůry jeřábu obecného vyextrahováno 20,6552 g nezmýdelněného materiálu, který byl dále zpracován.

Obrázek 12: Znáznornění 20,6552 g nezmýdelněného materiálu vzniklého po extrakci kůry a následné destilaci roztoku.



3.3.2. Zmýdelnění vzorku

Pro proces zmýdelnění se odebralo 5 g nesaponifikovaného vyextrahovaného materiálu.

Mezi chemikálie potřebné k tomuto procesu patří převážně ethanolický roztok NaOH.

3.3.3. Výpočet množství ethanolického roztoku NaOH pro zmýdelnění

Pro správný metodický postup bylo zapotřebí vypočítat množství rozpouštědla nutného k procesu saponifikace vzorku. Bylo využito informací z práce⁶ a následným výpočtem byl zjištěn nutný objem ethanolu potřebný k přípravě ethanolického roztoku NaOH.

Lawrie vyextrahoval 80 g vzorku, kterou následně zmýdelnil 1,5 litry methanolického roztoku hydroxidu draselného⁶.

Postup výpočtu objemu Et-OH za využití přímé úměry

a)

80 g extraktu..... 1,5 l Met-OH ⊙ KOH
21 g extraktu x ml Et-OH ⊙ NaOH

$$X = 1,5 * \frac{21}{80} = 400ml$$

Tato rovnice znázorňuje přepočet množství ethanolu potřebného k přípravě ethanolického roztoku NaOH pro 21 g extraktu pomocí údajů obsažených v práci⁶.

b)

80 g extraktu..... 1,5 l Met-OH ⊙ KOH
5 g extraktu x ml Et-OH ⊙ NaOH

$$X = 1,5 * \frac{5}{80} = 93,75ml$$

Tato rovnice znázorňuje přepočet množství ethanolu k přípravě ethanolického roztoku NaOH pro 5g nezmýdelněného vzorku pomocí údajů obsažených v práci⁶.

3.3.4. Proces zmýdelnění vzorku

Počátkem procesu byla příprava ethanolického roztoku NaOH, jenž byl získán rozpuštěním 5 g pevného hydroxidu sodného v 93,75 ml ethanolu. Směs bylo nutno důkladně míchat do úplného rozpuštění pevného podílu hydroxidu.

5 g nezmýdelněného vzorku bylo vloženo do varné baňky se zpětným chladičem umístěné v topném hnízdě. Vzorek byl následně zalit 100 ml ethanolického roztoku NaOH.

Následným vařením této směsi po dobu 3 hodin docházelo k cyklickému ději známému jako „reflux“ (kondenzace par a jejich navrácení do směsi díky zpětnému chladiči). Posléze byla směs naředěna vodou a 3 krát extrahována v dělicí nádobce diethyletherem (3x50ml). Poté byl diethyletherický podíl promyt destilovanou vodou, vysušen síranem sodným a znovu oddělen do předem zvážené baňky. Na konec došlo ke zredukování směsi destilací a dosušení v sušárně do konstantní hmotnosti.

Tabulka 9: Hmotnost zmýdelněného materiálu a její % výtěžek z 5 g nezmýdelněného materiálu

Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost vzorku	% výtěžek vztažený k odebranému vzorku	Hmotnost vz. k celk. hmotnosti kůry	% výtěžek vz. k celk. hmotnosti kůry
103,2157 g	104,2414 g	1,0257 g	20,51 %	4,237 g	3,5 %

Obrázek 13: Znárodnění 1,0257 g zmýdelněného vzorku



3.3.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie zmýdelněného materiálu

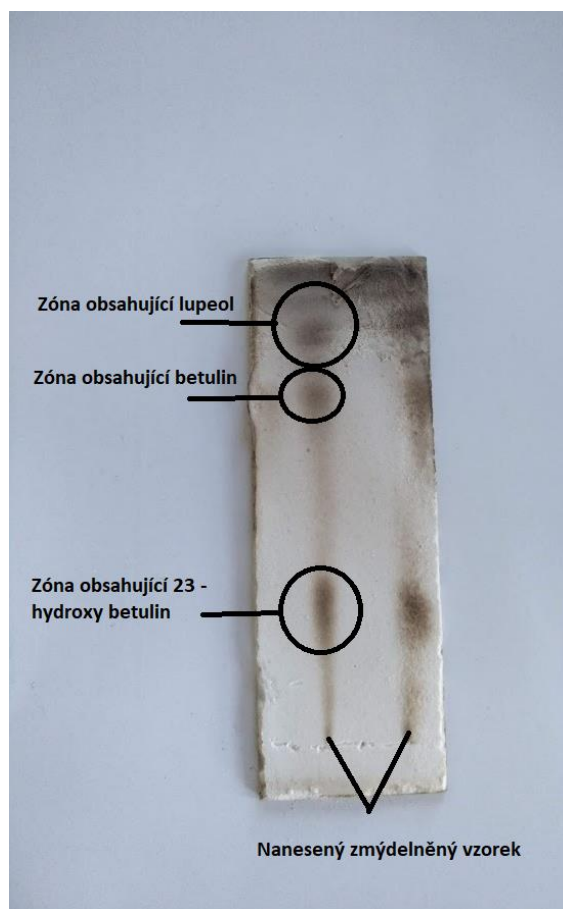
Pro získání informace o čistotě a přítomnosti 23-hydroxybetulinu obsaženého ve vzorku bylo nutno využít metody preparativní tenkovrstvé chromatografie.

Tato metoda započala odebráním malého množství zmýdelněného materiálu do lékovky.

78 mg zmýdelněné látky bylo rozpuštěno ve 2 ml diethyletheru a nanášeno na desku převrstvenou silikagelem (postup viz kapitola 3.2.2.).

Preparativní deska se vzorkem byla vložena do akvária obsahujícího vyvolávací soustavu hexan:ethyl-acetát 1:1. Tato soustava vynesla stacionární fázi do různých zón desky. Na základě chromatografické, silikagelem převrstvené destičky s nanášeným vzorkem byla pomocí R_f vypočítána vzdálenost jednotlivých zón (převážně zóna obsahující 23-hydroxybetulin). Zóna s obsahem 23-hydroxybetulinu byla na základě výpočtů nalezena v rozmezí 350 – 650 mm od startu.

Obrázek 14: Chromatografická destička využita k výpočtu vzdálenosti zóny obsahující 23-hydroxybetulin od startu.



Jednotlivé zóny byly sejmuty do chromatografických kolon a promyty 50 ml ethanolu, což poskytlo 3 frakce jímané do předem zvážených baněk. Frakce byly zredukovány destilací a dosušeny do konstantní hmotnosti. Ve frakci číslo 2 byl na základě TLC prokázán obsah 23-hydroxybetulinu o neznámé čistotě. Hmotnost a procentuální výtěžek jednotlivých frakcí znázorňuje tabulka číslo 10.

Tabulka 10: Hmotnost jednotlivých vysušených frakcí a procentuální výtěžek z původních 78 mg

Vzorek č.	m prázdné baňky s kamínkem	m baňky se vzorkem	m vzorku	% obsah Z odebraného vz. (78 mg)	m vzorku vz. k celkové m kůry	% výtěžek vztažený k celkové m kůry
1	52,2154 g	52,2555 g	0,0401 g	51,41 %	2,23g	1,84 %
2	51,8484 g	51,8724 g	0,0240 g	30,77%	1,30g	1,07 %
3	50,9310 g	50,9416 g	0,0106 g	13,59 %	0,58 g	0,47 %

Na základě výpočtu bylo zjištěno, že ze 78 mg původní zmýdelněné látky bylo vymyto 74,7 mg materiálu, což činí 95,7% výtěžnost.

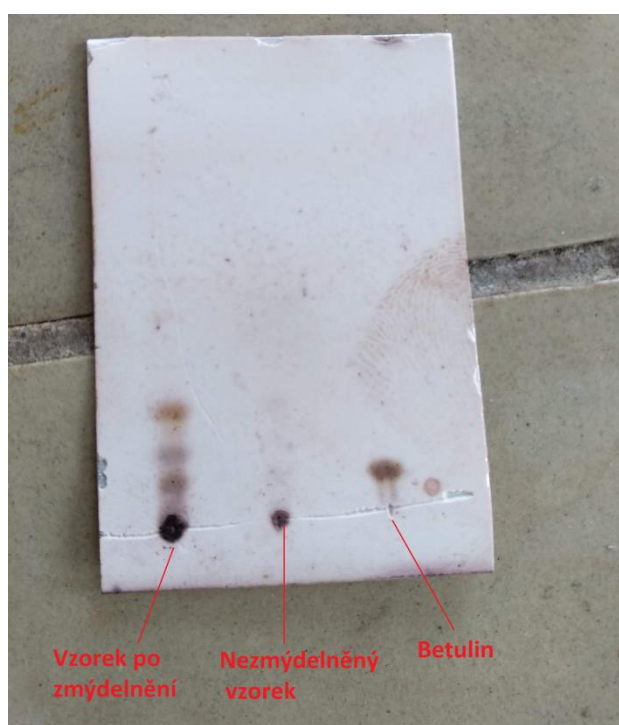
Z tabulky číslo 10 vyplývá, že během práce bylo připraveno 1,3 g vzorku obsahující převážně mírně znečištěný 23-hydroxybetulin. Tato hodnota je vztažena k původní hmotnosti kůry užitá k extrakci. Procentuální výtěžek činí 1,07 %.

3.4. Porovnání TLC meziproduktů a produktu

Obrázek 15: TLC zmýdelněného, nezmýdelněného vzorku a betulinu v soustavě 1:1 / hexan:ethyl-acetát

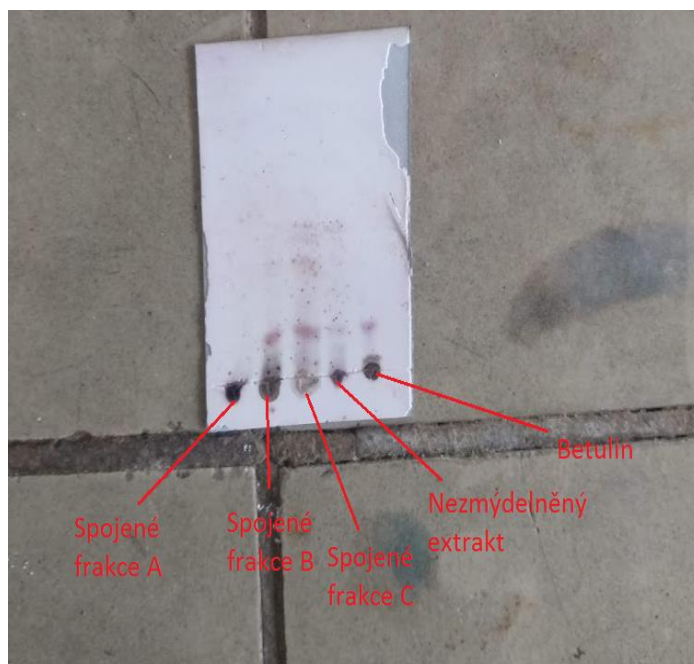


Obrázek 16: TLC zmýdelněného, nezmýdelněného vzorku a betulinu v soustavě 10:3 / hexan:ethyl-acetát

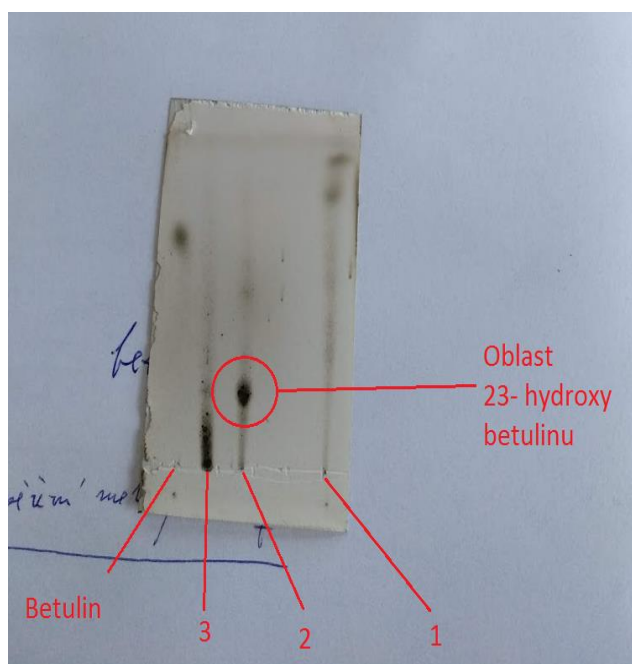


Z obrázků číslo 15 a 16 je patrné, že saponifikovaný vzorek je vymýván ochotněji, než vzorek nezmýdelněný. Soustava 1:1 byla během této chromatografie vhodnější, neboť látky vymývá ve větším a lépe detekovatelném rozmezí.

Obrázek 17: Spojené frakce (viz kapitola 3.2.4.) A, B a C - nezmýdelněný extrakt a betulin



Obrázek 18: Chromatografie betulinu se vzorky č. 3, 2 a 1. Vzorek č. 2 obsahuje 23-hydroxy betulin. (vzorky č.1,2 a 3 jsou popsány v kapitole č. 3.3.5.)



Z obrázku číslo 17 vyplývá, že spojené frakce C obsahují největší podíl vymytých látek. Chromatografická destička dále zobrazuje spojené vzorky B (střední část preparativní desky), A (svrchní část), extrakt kůry před zmýdlením a betulin pro porovnání.

Obrázek číslo 18 zobrazuje porovnání jednotlivých frakcí 78 mg saponifikované látky a betulinu. Vzorek č. 2 obsahuje lehce znečištěný 23-hydroxybetulin (viz kapitola 3.3.5).

3.5. Porovnání výtěžků s předchozími pracemi

Pro zhodnocení optimalizace extrakce dané látky je nutné shrnout data autorů zabývajících se touto problematikou.

Tabulka 11: Porovnání hmotnosti vyextrahovaného materiálu jednotlivých autorů

Autor	Hmotnost vstupní kůry	m nezmýdlené látky po extrakci v Sox. extraktoru	% výtěžek nezmýdlené látky po extrakci methanolem	% zmýdlený vz.	% výtěžek 23-hydroxybetulinu
Lawrie ⁶	1814 g	80 g	4,41 %		
Richtr ⁸	180 g	5,3 g	10,8 %		2,9%
Konopa	120,805 g	20,6552 g	17,09 %	3,5 %	1%

Z tabulky číslo 11 vyplývá, že v průběhu tohoto experimentu nedošlo k optimalizaci % množství výtěžku oproti ostatním autorům. Avšak je nutno říci, že metoda užitá v práci je méně časově i materiálově náročná, a přesto poskytuje relativně čistý výtěžek 23-hydroxybetulinu. V této práci byla využita přímá extrakce vzorku vhodným rozpouštědlem, následovaná jeho zmýdlením a provedením preparativní TLC. Metoda preparativní TLC poskytla 3 frakce, přičemž frakce č. 2 obsahovala převážně mírně znečištěný 23-hydroxybetulin. Proškrtnutá místa v tabulce znázorňují nedostatek informací či užití jiných metod. Práce⁸ vycházela z práce⁶, která nebyla úhrnně hmotnostně vyhodnocena.

4. Závěr

Počátkem této práce byl výběr vhodného extrakčního činidla nezmýdelněného materiálu obsahujícího 23-hydroxybetulin (I). Z vybraných pěti rozpouštědel byl na základě TLC zvýhodněn methanol.

Práce⁸ vycházela z práce⁶, která nebyla úhrnně hmotnostně vyhodnocena. V práci⁸ byla kůra postupně extrahována 50 hodin petroletherem. Byl získán extrakt (0,9%), který podle TLC obsahoval 23-hydroxybetulin. Následovala 50 hodinová extrakce etherem, jež přinesla zisk 3,2% extraktu převážně obsahujícího 23-hydroxybetulin.

V této práci, v níž byla kůra jeřábu obecného (*Sorbus acuparia*) extrahována methanolem a získaný extrakt byl následně saponifikován, bylo získáno 3,5% materiálu, který podle TLC (viz obr. č. 16) vykazuje vysoký obsah 23-hydroxybetulinu. Postup extrakce původní kůry methanolem a následného zpracování methanolického extraktu poukazuje na vhodnost využití navrženého postupu k získání 23-hydroxybetulinu v semimikrotechnice. Pro zpracování větších hmotností však bude třeba postup doplnit dalšími kroky.

5. Resumé

The beginning of this work was the selection of a suitable extraction agent for non-saponified material containing 23-hydroxybetulin (I). Of the five selected solvents, methanol was preferred by TLC.

Work⁸ was based on work⁶, which was not weighted overall. At work⁸ the bark was gradually extracted with petroleum ether for 50 hours. An extract (0.9%) was obtained, which by TLC contained 23-hydroxybetulin. This was followed by a 50 hour ether extraction which yielded 3.2% of the extract predominantly containing 23-hydroxybetulin.

In this work, in which the bark of the cranium (*Sorbus acuparia*) was extracted with methanol and the extract obtained was subsequently saponified, 3.5% of the material was obtained which, according to TLC (see pic. 16), had a high content of 23-hydroxybetulin. The process of extracting the original bark with methanol and then treating them than olic extract points to the desirability of using the procedure to obtain 23-hydroxybetulin in semimicrotechnics. However, additional steps will be required to process larger weights.

6. Seznam použité literatury

1. Pacák, J.; *Stručné základy organické chemie*. Praha: SNTL, 1975.
2. McMurry, J.; *Organická chemie*. Brno: VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
3. Liu, J.; Sun, F.; Zhang, H.; Cai, H.; Yao, H.; et al.; *Synthesis and Biological Evaluation of Novel Furozan-Based Nitric Oxide-Releasing Derivatives of 23-Hydroxy Betulinic Acid and 3-oxo-23-hydroxybetulinic acid as Potential Anti-Tumor Agents*. *Med chem* 5: 028-036, DOI:10.4172/2161-0444.1000239, 2015.
4. Chemická skupina Betulinines: [online]. *Triterpeny*. [2019-05-28]. Dostupné na WWW: <<http://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>>
5. Richtr, V.; *Semimikrotechnika v organické chemii*. Plzeň: PF, ZČU; 1993.
6. Lawrie, W.; McLean, J.; Taylor, G. R.; *J. Chem. Soc.* 1960, 4303.
7. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: [online]. *Chromatografie na tenké vrstvě*. [cit 28. 05. 2019]. Dostupné na WWW: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Chromatografie_na_tenk%C3%A9_vrstv%C4%9B&oldid=16724749>
8. Richtr, V.; *Triterpenoidy substituované v kruhu B*. Kandidátská disertační práce, 1987.
9. Mikeš, O. a kol.; *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL, 1980.
10. Richtr, V., Kraitr, M.; *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*. Plzeň: Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, 2004.
11. Techmania Science Center: Eduportál: [online]. *Kapilární jevy*. Mgr. Magda Králová [cit 2019-05-21]. Dostupné na WWW: <<https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/struktura-latek/povrch-kapaliny/kapilarni-jevy>>
12. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: [online]. *Kapilára*. [2019-05-21]. Dostupný na WWW: <<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Kapil%C3%A1ra&oldid=17118208>>

7. Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: SOXHLETŮV EXTRAKTOR	4
OBRÁZEK 2: TLC LÁTKY V RŮZNÝCH SOUSTAVÁCH ROZPOUŠTĚDEL	7
OBRÁZEK 3: HLINÍKOVÁ DESTIČKA A SORBENT	8
OBRÁZEK 4: ZNÁZORNĚNÍ APARATURY SLOUPCOVÉ CHROMATOGRAFIE.....	9
OBRÁZEK 5: KAPILÁRNÍ ELEVACE A DEPRESE.....	15
OBRÁZEK 6: TVAR KAPILÁRY A BALÓNKU	16
OBRÁZEK 7: VÝROBA KAPILÁRY BĚŽNÝM ZPŮSOBEM	17
OBRÁZEK 8: POSTUP VÝROBY BALÓNKU	18
OBRÁZEK 9: SKLENĚNÁ DESKA PRO PREPARATIVNÍ TLC	19
OBRÁZEK 10: RŮZNÉ SOUSTAVY ROZPOUŠTĚDEL PRO TLC.....	22
OBRÁZEK 11: NANESENÝ VZOREK NA CHROMATOGRAFICKÉ DESCE.....	24
OBRÁZEK 12: ZNÁZORNĚNÍ NEZMÝDELNĚNÉHO MATERIÁLU.....	30
OBRÁZEK 13: ZNÁZORNĚNÍ ZMÝDELNĚNÉHO MATERIÁLU	33
OBRÁZEK 14: CHROMATOGRAFICKÁ DESTIČKA VYUŽITÁ K VÝPOČTU RF	34
OBRÁZEK 15: TLC MEZIDPRODUKTŮ V SOUSTAVĚ 1:1.....	36
OBRÁZEK 16: TLC MEZIDPRODUKTŮ V SOUSTAVĚ 10:3.....	36
OBRÁZEK 17: TLC SPOJENÝCH FRAKČÍ.....	37
OBRÁZEK 18: PREPARATIVNÍ TLC ZMÝDELNĚNÉHO VZORKU.....	37

8. Seznam tabulek

TABULKA 1: DĚLENÍ TERPENŮ	2
TABULKA 2: ELUOTROPNÍ ŘADA ROZPOUŠTĚDEL V TLC	12
TABULKA 3: OBSAH JEDNOTLIVÝCH LÉKOVEK	20
TABULKA 4: HMOTNOSTI EXTRAKTŮ V LÉKOVKÁCH.....	23
TABULKA 5: PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽKY EXTRAKTŮ V LÉKOVKÁCH	23
TABULKA 6: HMOTNOSTI A PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽEK FRAKČÍ TLC	27
TABULKA 7: CELKOVÁ HMOTNOST KŮRY PO VYSUŠENÍ	28
TABULKA 8: PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽEK EXTRAKCE.....	29
TABULKA 9: HMOTNOST ZMÝDELNĚNÉHO MATERIÁLU	32
TABULKA 10: HMOTNOST FRAKČÍ ZMÝDELNĚNÉHO MATERIÁLU	35
TABULKA 11: POROVNÁNÍ HMOTNOSTI EXTRAKTŮ JEDNOTLIVÝCH AUTORŮ.....	38