

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

OPTIMALIZACE OXIDAČNÍCH REAKCÍ ALLOBETULINU

A JEHO DERIVÁTŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Markéta Svobodová

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň, 2013

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

Plzeň, 20. července 2013

.....
vlastnoruční podpis

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce, asistentovi doc. Mgr. Václavu Richtrovi CSc. za námět, ochotu, trpělivost a odbornou pomoc při řešení problematiky oxidačních a elektrooxidačních reakcí.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická

Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Markéta SVOBODOVÁ
Osobní číslo: P09B0044P
Studijní program: B1001 Přírodovědná studia
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání
Název tématu: Optimalizace oxidačních reakcí allobetulinu a jeho derivátů
Zadávající katedra: Katedra chemie

Zásady pro vypracování:

1. Seznámit se se zásadami semimikrotechniky.
2. Procvičit základní separační metody.
3. Připravit výchozí allobetulin.
4. Zvolit a realizovat vhodné oxidační postupy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii. PF, Plzeň 1993.

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

Míndl J.: Základy elektroorganické chemie. Academia, Praha 2000.

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 15. června 2011

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2012

J. Coufalová
0.9. J. Coufalová, CSc.
děkanka



V. Richtr
Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. června 2011



FAKULTA PEDAGOGICKÁ
ZÁPADOČESKÉ
UNIVERZITY
V PLZNI

V Plzni dne 18. března 2013
č.j. ZCU-008675/2013/K

Rozhodnutí

Dle ust. čl. 55 odst. 3 Studijního a zkušebního řádu v platném znění (dále jen studijní a zkušební řád) rozhodla děkanka

takto:

Studentce **Markétě SVOBODOVÉ**, nar. 8. srpna 1990, bytem Mánesova 95, Plzeň studující ve studijním programu **Přírodovědná studia**, studijní obor **Chemie se zaměřením na vzdělávání** se určuje náhradní termín odevzdání bakalářské práce s názvem „Optimalizace oxidačních reakcí allobetulinu a jeho derivátů“ do **31. července 2013**.

Odůvodnění:

Studentka byla povinna odevzdat kvalifikační práci dle jejího zadání nejpozději do 31. března 2013. Studentka, aniž by odevzdala kvalifikační práci, podala k děkance včas podle čl. 55 odst. 2 studijního a zkušebního řádu žádost o stanovení náhradního termínu odevzdání kvalifikační práce s odůvodněním, že v daném termínu nestihla zpracovat téma bakalářské práce

Děkanka s ohledem na důvody uvedené v žádosti vyhověla žádosti studentky a v souladu s ust. čl. 55 odst. 3 studijního a zkušebního řádu stanovila studentce náhradní termín pro odevzdání kvalifikační práce.

Poučení:

Proti tomuto rozhodnutí není opravného prostředku.

M. R. J. Černíková

CSc.

Doc. PaedDr. Jana Coufalová,
děkanka FPE ZČU v Plzni

Obsah

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Triterpeny	9
2.2 Izolace betulinu z březové kůry	9
2.3 Allobetulin jako výchozí látka	10
2.3.1 Oxidační činidla.....	10
2.3.2 Příprava allobetulinu z betulinu přes allobetulin-formiát.....	11
2.3.3 Příprava allobetulinu přímo z betulinu.....	11
2.4 Chromatografie na tenké vrstvě	12
2.4.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie.....	14
2.4.2 Tenkovrstvá preparativní chromatografie.....	14
2.5 Elektrooxidace organických látek	17
2.6 Elektrooxidace allobetulinu na allobetulon	17
2.6.1 Elektrooxidace tetrahydrofuranu.....	17
2.6.2 Elektrochemická reakce allobetulinu.....	18
2.7 Použitý typ elektrolyzéru	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Zhotovení a funkce balonku	21
3.1.1 Přenášení, oddělování a uchovávání kapalin.....	21
3.2 Tenkovrstvá chromatografie	25
3.2.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie.....	25
3.2.2 Tenkovrstvá preparativní chromatografie.....	26
3.3 Extrakce březové kůry	26
3.4 Příprava allobetulin-formiátu	27
3.5 Allobetulin	27
3.6 Oxidace allobetulinu na allobetulon	29
3.6.1 Oxidace oxidem chromovým.....	29
3.6.2 Oxidace dichromanem sodným.....	29
3.6.3 Oxidace Jonesovým činidlem za varu.....	30
3.6.4 Oxidace Jonesovým činidlem za studena.....	30
3.6.5 Dehydrogenace allobetulinu měděným práškem.....	31

3.7 Elektrooxidace allobetulinu na allobetulon.....	32
3.7.1 Příprava vhodného rozpouštědla.....	32
3.7.2 Elektrooxidace s přidavkem octanu sodného.....	33
3.7.3 Zkouška na zreagovaný allobetulin.....	33
3.7.4 Zpracování látky po dokončené elektrolýze.....	34
3.7.5 Preparativní TLC chromatografie produktu elektrolýzy.....	35
3.7.6 Krystalizace spojených frakcí 5 a 12.....	38
3.7.7 Zpracování spojených složek 1, 2, 10 a 12.....	39
4 ZÁVĚR.....	41
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	42

1 ÚVOD

Izolací přírodních látek, konkrétně triterpenů, se katedra chemie Pedagogické fakulty ZČU v Plzni zabývá již po delší dobu. Na toto téma je také zpracována tato bakalářská práce. Hlavním cílem je zjistit, jaký typ reakce by byl nejvhodnější pro oxidaci allobetulinu na allobetulon. Vycházeno je z betulinu získaného extrakcí z březové kůry, který se již dobře známým způsobem nechá převést na allobetulin. Poté je zpracováno několik oxidačních reakcí allobetulinu, pomocí různých oxidačních činidel a za různých podmínek.

Dalším cílem je prověřit, zda je možno allobetulin zoxidovat na allobetulon pomocí elektrochemických reakcí. Tato možnost vychází z toho, že na katedře chemie již byly studovány elektrochemické přeměny betulinu, jako nejdostupnějšího triterpenu. Proto je také věnována pozornost přeměně betulinu na allobetulin. V souvislosti s tím jsou popisovány i základní techniky izolace, přeměn a identifikace.

Jako izolační techniky jsou zde používány extrakce, krystalizace a chromatografie na tenké vrstvě. K identifikaci slouží tenkovrstvá chromatografie (TLC) a stanovení teploty tání (t. t.).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Triterpeny

Terpeny se vyskytují v přírodě jako uhlovodíky nebo jako jejich deriváty. Mohou být jak rostlinného původu, např. betulin (I) obsažený v březové kůře, z kterého je v této práci vycházeno, tak živočišného původu jako je např. ambrein, který je součástí pravé ambry vylučované vorvaněm¹.

Betulin (I) se řadí mezi triterpeny a obsahuje šest isoprenových jednotek¹.

2.2 Izolace betulinu z březové kůry

Betulin (I) je pentacyklický triterpenický alkohol. V přírodě je zastoupen hojně, především v březové kůře. Díky této bílé krystalické látce má březová kůra bílou barvu a několik specifických vlastností, ke kterým patří její odolnost vůči plísni a hnilobě. Betulin (I) má totiž protiplísňové a antibakteriální účinky².

Betulin (I) byl z březové kůry izolován již v roce 1788 Löwitzem sublimací čisté chemické substance².

Dnes se betulin (I) z březové kůry získává extrakcí ethanolem. Extrakce se provádí v Soxhletově přístroji a trvá několik hodin. Po ukončení extrakce je betulin (I) koncentrován v ethanolu spolu s dalšími jeho deriváty.

Na katedře chemie FPE ZČU v Plzni je extrakce březové kůry a chromatografický rozbor získaného extraktu jednou z prací zařazených do laboratorních cvičení z organické chemie³.

Betulin (I) je pro další použití velmi často varem s kyselinou mravenčí převáděn na formiát II, který v ethanolickém roztoku hydroxidů přechází na allobetulin (III), jako výchozí látku pro přechod z lupanové do oleananové řady triterpenů. V současné době je tento klasický postup modifikován náhradou kyseliny mravenčí kyselinou p-toluensulfonovou (IV).

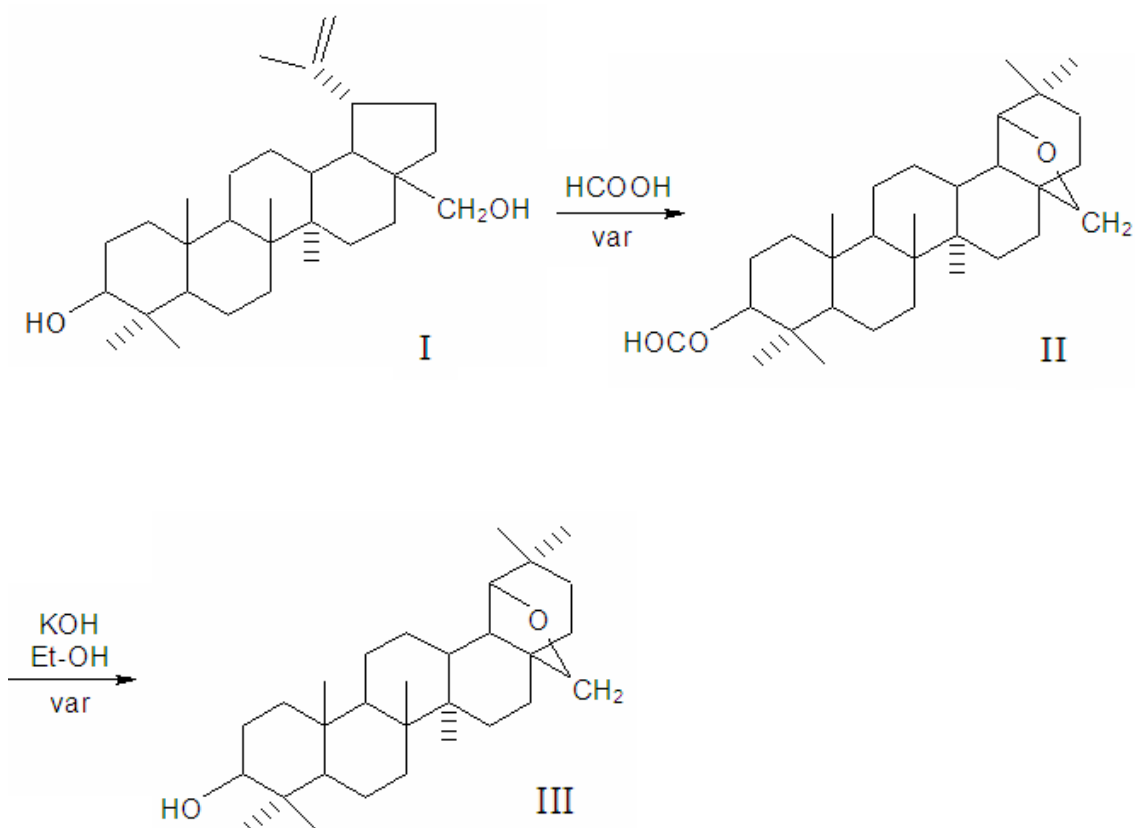
2.3 Allobetulin jako výchozí látka

Allobetulin (III) je výchozí sloučeninou pro oxidační a elektrooxidační reakce, při kterých chceme získat allobetulon (V). Allobetulin (III) se připravuje z betulinu (I) podle již dříve vypracované metody.

Betulin (I) se získává z březové kůry. Extrakcí březové kůry vzniká směs několika látek, která vedle betulinu (I) obsahuje řadu dalších derivátů³. Je tedy nutné betulin (I) izolovat. To se provádí opakovanou krystalizací, kdy první krystalický podíl je na betulin (I) nejbohatší. Analyticky čistý betulin (I) se získává chromatografickými metodami.

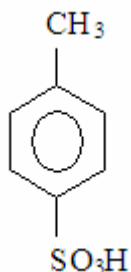
2.3.1 Příprava allobetulinu z betulinu přes allobetulin-formiát

Přeměna betulinu (I) na allobetulin (III) spočívá v přesmyku pětičlenného kruhu na šestičlenný, kdy nejprve v kyselém prostředí vzniká allobetulin-formiát (II) a jeho následnou hydrolyzou se připraví allobetulin (III). Tato reakce byla studována již dříve⁴.



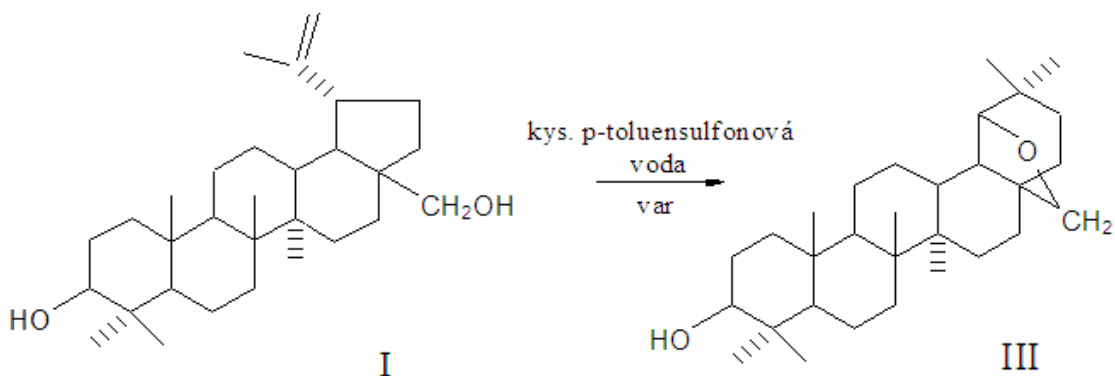
2.3.2 Příprava allobetulinu přímo z betulinu

Allobetulin (III) lze rovněž připravit z betulinu (I) přímo pomocí kyseliny p-toluensulfonové (IV).



IV

Hydrát kyseliny p-toluensulfonové (IV) se rozpustí v chloroformovém roztoku betulinu (I). Poté je přidána voda a tato směs se zahřívá pod zpětným chladičem asi jednu hodinu. Směs je následně zchlazena, promyta 5 % roztokem hydrogenuhličitanu sodného a vysušena síranem sodným. Po odfiltrování a usušení jsou získány jemné krystalky allobetulinu (III) (cit. 5).



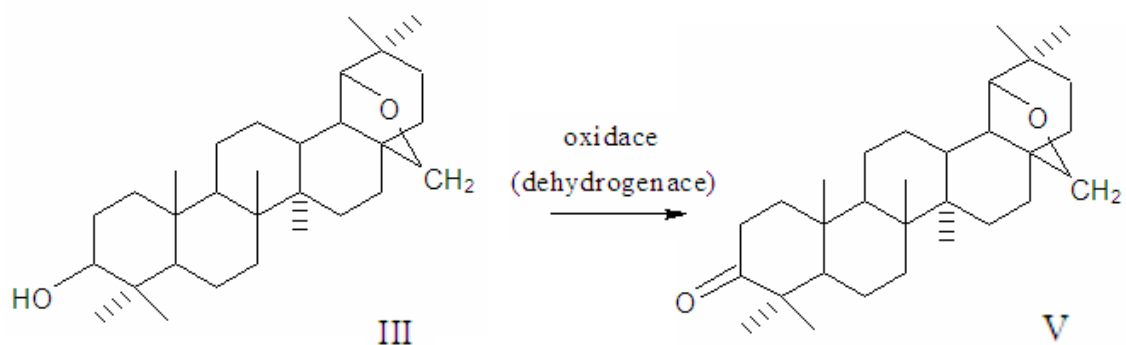
2.3.3 Oxidační činidla

Při oxidacích triterpenoidních sloučenin je možné použít řadu oxidačních činidel.

Při oxidaci allobetulinu (III) na allobetulon (V) se často používá oxid chromový, který slouží jako velmi dobré oxidační činidlo. Po proběhlé oxidaci se jeho nadbytek ruší např. přidáním methanolu. Stejně dobře probíhá oxidace allobetulinu (III) dichromanem sodným v kyselině octové.

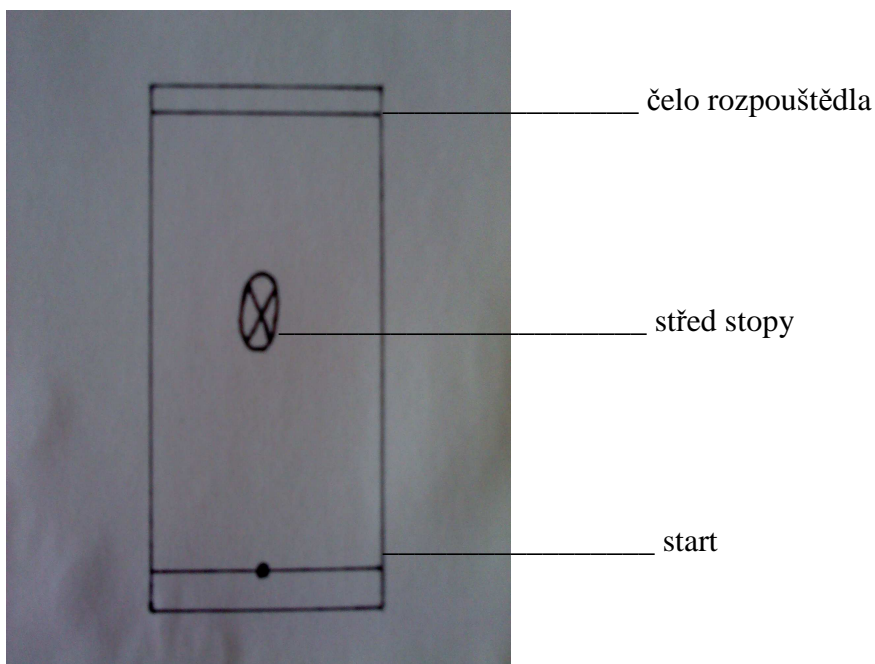
Dále je možné použít Jonesovo činidlo, což je oxid chromový rozpuštěný ve zředěné kyselině sírové. Toto činidlo je poměrně často používáno. Protože se jedná o systém obsahující vodu, je jeho využití v terpenoidní řadě s ohledem na nerozpustnost triterpenů ve vodě problematické (viz. 3.6.3, 3.6.4).

Jako činidlo se také nechá využít měděný prášek, který po homogenizaci s allobetulinem (III), též poskytne vysoký obsah allobetulon (V) (viz. 3.6.5).



2.4 Chromatografie na tenké vrstvě

Tenkovrstvou chromatografií (TLC) sledujeme čistotu látek a průběh reakce. V případě, že pracujeme za přesně definovaných podmínek, to znamená při použití definované vyvíjecí soustavy i chromatografického materiálu, má často pro odlišení nebo charakterizaci sledované sloučeniny, nebo zkoumané reakce význam určení retardačního faktoru (R_f).



Obr. 1 **Retardační faktor**

Retardační faktor určité sloučeniny se vypočítá jako podíl vzdálenosti středu stopy této sloučeniny a vzdálenosti čela rozpouštědel od startu.

$$R_f = \frac{\text{střed stopy}}{\text{čelo} - \text{start}}$$

R_f je tvořeno bezrozměrným číslem v rozmezí 0 (pro látky, které zůstávají na startu) až 1 (pro látky, které postupují s čelem na tenké vrstvě vzlínajícího rozpouštědla).

K tenkovrstvé chromatografii se využívají různé adsorbenty k tomu účelu dodávané specializovanými firmami, které se nanášejí na podložní sklíčka. Využívají se i hotové vrstvy, které mívají velmi dobré chromatografické vlastnosti, ale jsou podstatně dražší. K nejčastěji užívaným adsorbentům patří Silikagel a oxid hlinitý.

V práci je využívána analytická tenkovrstvá chromatografie, používaná především k určování čistoty látek, popřípadě jejich druhu. Dále je tenkovrstvá chromatografie využívána k izolaci a čištění malých množství látek (preparativní tenkovrstvá chromatografie).

2.4.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie

K tomuto účelu se používají sklíčka, která se ještě mokrá naskládají na skleněnou podložku těsně vedle sebe, aby se k podložce přilepila a nepohybovala se při nanášení adsorbentu. Na sklíčka se adsorbent nalévá ve směsi s vodou. Suspenze směsi se umíchá v baňce a vylije na sklíčka. Poté se adsorbent rovnoměrně rozprostře po sklíčkách pomocí skleněné tyčinky, která je na obou krajích opatřena pryžovou hadičkou vymezující tloušťku vrstvy. Tyčinka se vyrábí konkrétně na velikost řady sklíček.

Analytická tenkovrstvá chromatografie se provádí tím způsobem, že se na suché sklíčko se Silikagelem na start nanese vzorek látky skleněnou kapilárou v podobě stopy a destička se poté nechá vyvíjet v rozpouštědle. V našem případě bylo u každé chromatografie použito stejné rozpouštědlo a to n-hexan a ethyl-acetát v poměru 10 : 3. Destička musí být vložena do vyvíjecí nádoby s rozpouštědlem tak, aby start byl těsně nad hladinou rozpouštědla. V případě, že by došlo k přímému smáčení nanesené látky, chromatografie by neproběhla, neboť by se nanesená látka vyluhovala do rozpouštědla.

Poté se vrstva detekuje postřikem 10 % kyseliny sírové a vypálením. Následkem vypálení se objeví hnědé stopy, které charakterizují zuhelnatělou organickou látku.

2.4.2 Tenkovrstvá preparativní chromatografie

Princip využití tenkovrstvé chromatografie pro preparativní účely spočívá ve vhodné detekci, sejmutí příslušné části vrstvy do chromatografické trubice k eluci vhodným, obvykle polárním rozpouštědlem⁶.

Preparativní provedení tenkovrstvé chromatografie se od analytického liší především v rozměrech chromatografických desek. Obvykle se používají desky o velikosti 20 x 20 cm, ale mohou být i větší, přičemž tloušťka vrstvy bývá maximálně 3 mm. Vrstva bývá často litá, kdy potřebné množství adsorbentu ve směsi s vodou vlijeme na desku. Po hrubém rozprostření například hrdlem skleněné baňky, ve které byla suspenze promíchána, dosáhneme vytvoření souvislé hladké vrstvy mírným poklepením prsty na spodní část desky při jejím současném naklánění ve všech směrech⁶.

Další rozdíl od analytického provedení spočívá v tom, že koncentrovaný roztok látky určené k chromatografii nanášíme na start v souvislém proužku přímo z balonku,

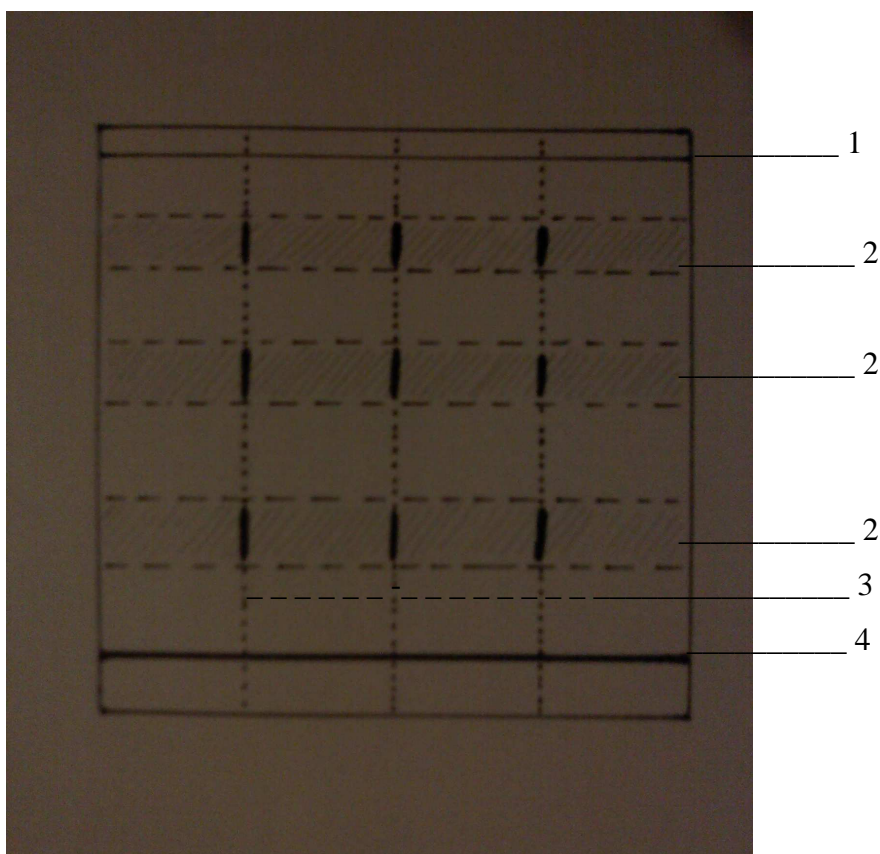
tak aby vznikl 2 až 3 mm široký tento proužek. Dodržení šířky a linearit proužku je nutné pro zachování účinnosti chromatografie. Množství nanášené látky je nutno určit experimentálně, je závislé na složení dělené směsi⁶ (viz. kap. 3.7.5 a 3.7.7).

Po úplném odpaření rozpouštědla ze stopy na startu přistoupíme k vyvíjení chromatogramu. Jako chromatografická nádoba nejlépe poslouží akvárium vhodných rozměrů, zakryté tak, aby nemohlo docházet k odpařování rozpouštědla. Zakrytí můžeme provést například alobalem převrstveným slabým molitanem a na molitan položit skleněnou desku, kterou je vhodné ještě zatížit. Na těsnosti zařízení závisí úspěch celé chromatografie, neboť je nutné, aby čelo rozpouštědla postupovalo rovnoměrně v celé šířce desky.

Soustavu rozpouštědel užitých k chromatografii je vhodné předem vyzkoušet například na analytickém sklíčku se stejným adsorbentem⁶. V této práci se nejlépe osvědčil n-hexan a ethyl-acetát v poměru 10 : 3. V kapitole 3.7.7 byla možnost zvolit jiný poměr rozpouštědel např. 2 : 1, jelikož stopy látek vystoupaly pouze kousek od startu a bylo tedy vhodné použít více polární rozpouštědlo. Ale jako výhodnější postup se již dříve ukázalo, nechat preparativní desku vzlínat několikrát. Před opětovným vložení desky do akvária s rozpouštědlem musí být rozpouštědla po předchozí chromatografii zcela odpařena. Tímto způsobem se jednotlivé stopy po předchozí chromatografii stávají startem pro chromatografii následnou.

Pokud je látka bezbarvá jako v našem případě máme několik různých možností detekce. Máme-li k dispozici vhodný zdroj UV záření, můžeme využít při použití vhodného UV indikátoru, který je součástí tenké vrstvy nebo častěji jeho roztokem vrstvu před ozáření postříkneme. Pokud vhodnou UV lampu k dispozici nemáme, můžeme preparativní desku ve směru od startu k čelu rozdělit na řadu stejných dílků a špachtlí postupně odebereme vzorky adsorbentu na vhodnou podložku (např. hliníkovou fólii). Ke vzorku adsorbentu přikápneme rozpouštědlo a nasajeme do skleněné kapiláry, dále pak postupujeme jako při běžné analytické tenkovrstvé chromatografii. Z analytické chromatografie potom můžeme získat dobrý přehled o složení jednotlivých proužků vrstvy a přistoupit k extrakci v chromatografické trubici. Postupně proužky adsorbentu sejmem a rozmělníme na prášek např. v přeloženém archu křídového papíru. Adsorbent vsypeme do chromatografické trubice nad smotek vaty a trubicí poklepeme o desku stolu, aby se prášek co nejvíce sklepal. Trubicí následně prolijeme nadměrným množstvím polárního rozpouštědla⁶ (např. n-hexan a ethyl-acetát 1 : 1).

V našem případě se k detekci látek osvědčila metoda elektricky žhaveného odporového drátu, kdy se preparativní deskou například na třech místech ve směru start – čelo dotkneme elektricky žhaveným odporovým drátem. V místech, kde jsou obsaženy složky dělené směsi, dochází ke zhnědnutí v důsledku zuhelnatění organické látky. Tato místa si označíme a před sejmutím jednotlivých částí adsorbentu z desky do trubice k eluci musíme zuhelnatělou dráhu po žhavém drátu odstranit např. seškrábnutím špachtlí, aby nedošlo k znehodnocení izolované látky rozkladnými produkty. Označené pruhy potom sejmeme z preparativní desky a opět vsypeme do označených chromatografických trubic nad kousek vaty a prolijeme rozpouštědlem⁶.



Obr. 2 Preparativní tenká vrstva po detekci žhaveným odporovým drátem

- 1 – čelo
- 2 – pruhy, ve kterých došlo ke karbonizaci a které budou po seškrábnutí zuhelnatělých částí odebrány k eluci
- 3 – dráhy vzniklé po vypálení žhavým odporovým drátem
- 4 – start

2.5 Elektrooxidace organických látek

Veškeré elektrochemické reakce, tedy i elektrochemické přeměny organických sloučenin se řídí Faradayovými zákony, ve kterých se uplatňuje prošlý chemický náboj Q , který lze vyjádřit jako součin proudu I a doby t , po kterou proud roztokem prochází, tedy $Q = I \cdot t$.

Vlastnosti roztoků organických sloučenin ve vodných i organických rozpouštědlech jsou často podobné s vlastnostmi vodných roztoků anorganických solí. Jejich vodivost je však obvykle nižší a proto se musí používat vhodný elektrolyt. Neboť průchod elektrického proudu je závislý na vodivosti látek a na přítomnosti látek iontové povahy⁷.

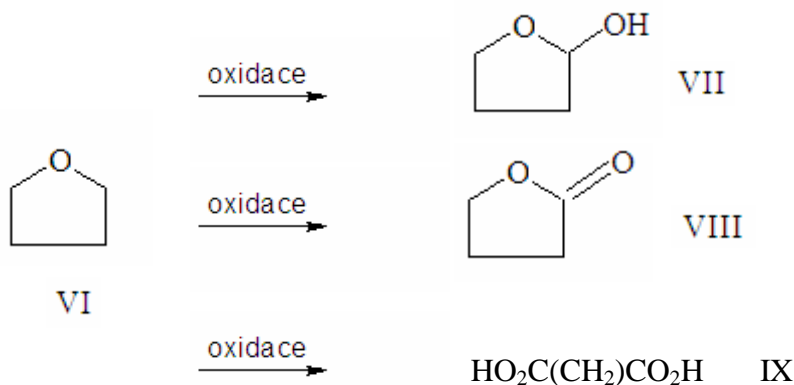
2.6 Elektrooxidace allobetulinu na allobetulon

Literatura⁷ se zabývá elektrooxidací tetrahydrofuranu (VI). Tato reakce byla využita i Kořuhou⁸ při vyvíjení vhodného elektrolyzéro a ověřování jeho činnosti v laboratoři KCH FPE ZČU v Plzni. Protože se ukázalo, že v literatuře uváděný průběh reakcí (viz. kap. 2.6.1) je realizovatelný a v minulosti byla provedena reakce s betulinem (I), nabízí se rozšíření reakcí i na jiné terpenoidní sloučeniny.

Ze vzorce allobetulinu (III) je zřejmé, že vedle hydroxylové skupiny v poloze 3 může z elektrochemického hlediska být zajímavý i pětičlenný E kruh, který je možno vnímat jako substituovaný tetrahydrofuran (VI), jehož elektrooxidace vede k produktům VII, VIII a IX.

2.6.1 Elektrooxidace tetrahydrofuranu

Tato bezbarvá kapalina se používá hlavně jako rozpouštědlo v organické chemii. Při elektrochemické oxidaci⁸ tetrahydrofuranu (VI) vzniká α -hydroxytetrahydrofuran (VII) nebo γ -butyrolakton (VIII), popřípadě kyselina jantarová (IX).



2.6.2 Elektrochemická reakce allobetulinu

Podle tohoto tedy předpokládáme, za určitých podmínek, oxidaci hydroxyskupiny allobetulinu (III) na ketoskupinu allobetulon (V).

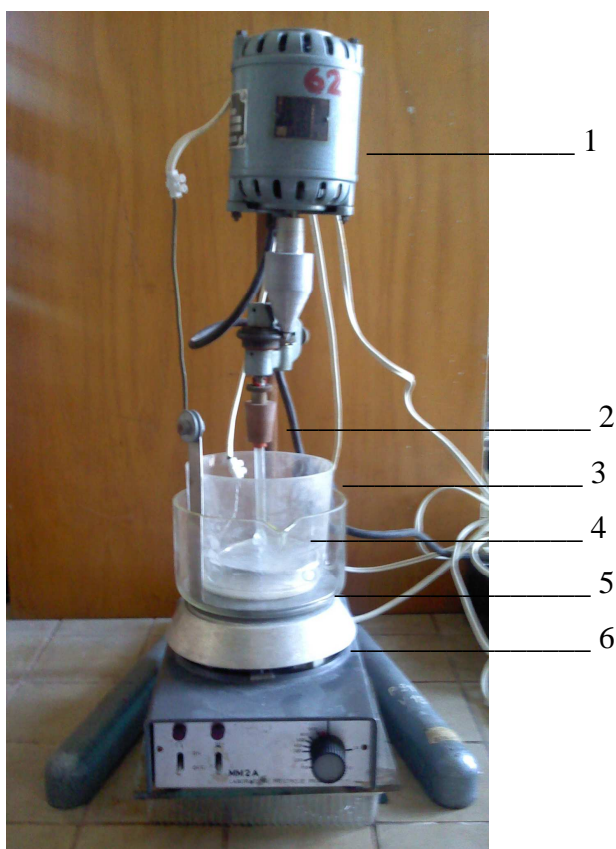
Dále lze předpokládat, že vniklý produkt nebude pouze čistý allobetulon (V), ale že v něm bude několik příměsí. Což se nakonec potvrdilo (viz. 3.7).

2.7 Použitý typ elektrolyzéry

Kořuha⁹ se ve své práci zabýval vývojem vhodného zařízení pro provádění elektreakcí. Postupně se dopracoval až k elektrolyzérovi, který v běžných podmínkách umožňuje obecnější využití, a proto byl použit i pro reakce prováděné s allobetulinem (III). Elektrolyzér se skládá ze skleněné nádoby o objemu 750 ml, nerezové katody a platinové anody.

Nerezová katoda byla umístěna na dně krystalizační misky. Na tuto katodu byla položena skleněná frit, pod kterou vznikl prostor pro pohyb míchadélka elektromagnetické míchačky. Vytvořený katodový prostor byl později naplněn elektrolytem bez přídavku triterpenu. Na fritu byla vložena platinová anoda, která byla ještě podložena několika skleněnými trubičkami kvůli využití celé její plochy. Prostor anody byl míchán stojanovou míchačkou. Jako zdroj napětí byl použit zdroj stabilizovaného napětí typu HY3003D. Tento zdroj může poskytnout napětí od 0 do 30 V, proud až 3 A a to s přesností na 0,01 V a 0,01 A⁹.

Po zapojení elektrolyzáru při napětí 29 V se proud postupně snižoval a náhle opět zvýšil. Tento jev je závislý na aktivní ploše katody i anody. Při průchodu proudem dochází totiž k rozkladu vody za vzniku bublinek, které se díky nedokonalému míchání usazují na elektrodách, tím zmenšují jejich aktivní plochu a proud se tak snižuje. Po spojení a uvolnění se několika bublinek se aktivní plocha elektrod zvětší a proud opět vzroste.



Obr. 3 Použitý elektrolyzáru

- 1 – stojanová míchačka
- 2 – míchadlo stojanové míchačky
- 3 – skleněná frita (dno skleněné frity je vypouklé, díky tomu pod ním může být míchadélko od elektromagnetické míchačky a katodový prostor tak může být míchán)
- 4 – platinová anoda umístěná na skleněných trubičkách
- 5 – nerezová katoda na dně krystalizační misky
- 6 – elektromagnetická míchačka



a

b

Obr. 4 Detail použitých elektrod

a – nerezová katoda

b – platinová anoda

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

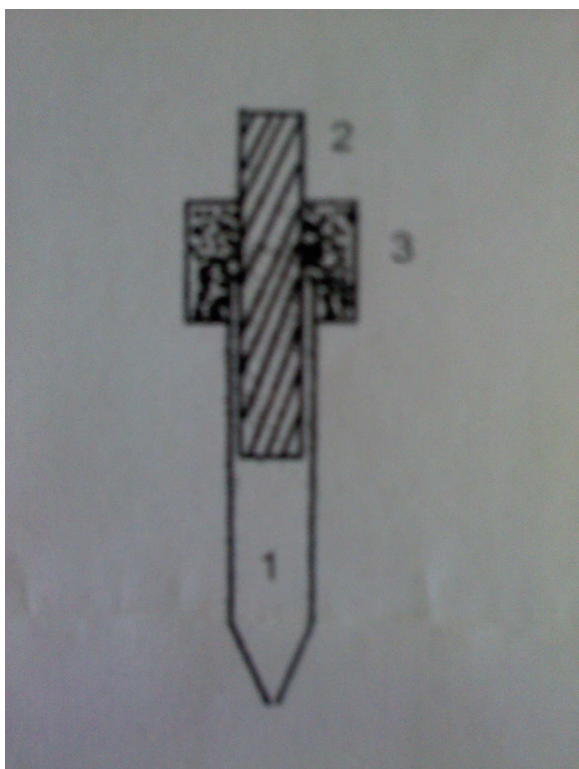
Při práci bylo využíváno běžné vybavení laboratoře. Použité chemikálie byly, není-li uvedeno jinak, v běžných čistotách (p. a. nebo čisté). Pod pojmem voda je míněna voda destilovaná. Body tání byly stanoveny na bodotávku s mikroskopem.

3.1 Zhotovení a funkce balonku

V experimentální části práce jsou uvedeny pracovní postupy, ve kterých byly uplatněny, ale nejsou zdůvodňovány zásady práce v organické laboratoři, především pak v semimikroměřítku. Velmi často bývá využívána balonková technika, která je založena na změně tlaku plynu v prostoru balonku v závislosti na teplotě. Snížení teploty způsobuje snížení tlaku a umožňuje sání, zatímco zvýšení teploty způsobí zvýšení tlaku a pokud byla do balonku v předchozí fázi kapalina nasáta, nyní je z balonku vytlačována. V případě, že se otevřená kapilára balonku opatří vatou, ve fázi sání balonek působí jako filtrační zařízení. Kapalina (filtrát) vstupuje do balonku, zatímco pevný podíl zůstává v nádobce, např. baňce či lékovce. Toto se dá velmi dobře využít i při opakovaných krystalizacích, kdy se postupně odsávají filtráty a v baňce zůstává krystalizací čištěná látka. Balonek umožňuje také uchovávání kapalin, přemísťování kapalin z méně přístupných částí aparatur a oddělování vzájemně nemísitelných kapalin. Významnou roli má balonek při nanášení chromatografovaných směsí na start preparativních tuhých vrstev.

3.1.1 Přenášení, oddělování a uchovávání kapalin

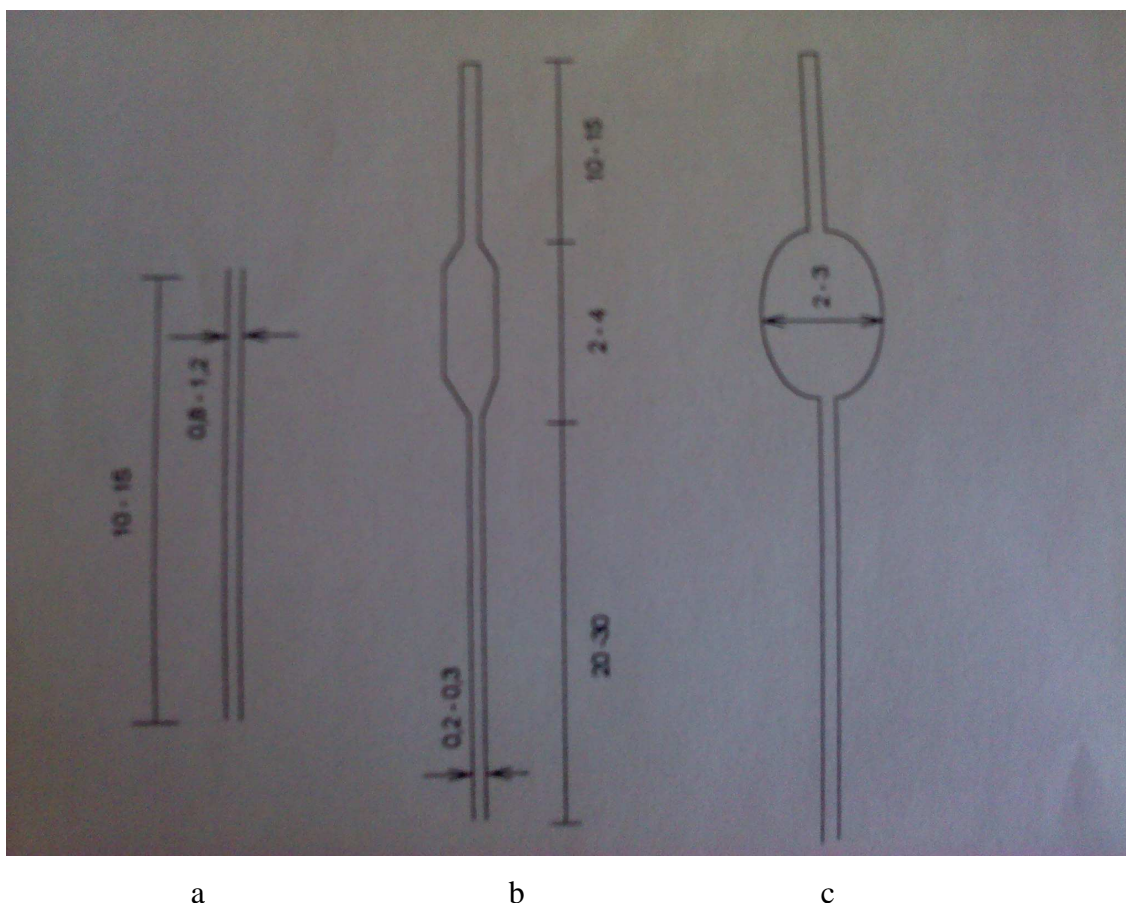
K oddělování a přenášení kapalin můžeme použít různé pipetky a kapátka vlastní výroby. Praktické kapátko snadno zhotovíme ze skleněné trubičky na jedné straně vytažené do špičky a skleněné tyčinky takového průměru, aby se mohla těsně, ale bez odporu pohybovat uvnitř této trubičky. Po spojení obou skleněných dílů gumovou hadičkou tyčinka uvnitř trubičky plní funkci pístu⁶.



Obr. 5 **Kapátko**

- 1 – skleněná trubička
- 2 – tyčinka
- 3 – těsnící kroužek zhotovený z pryžové hadičky

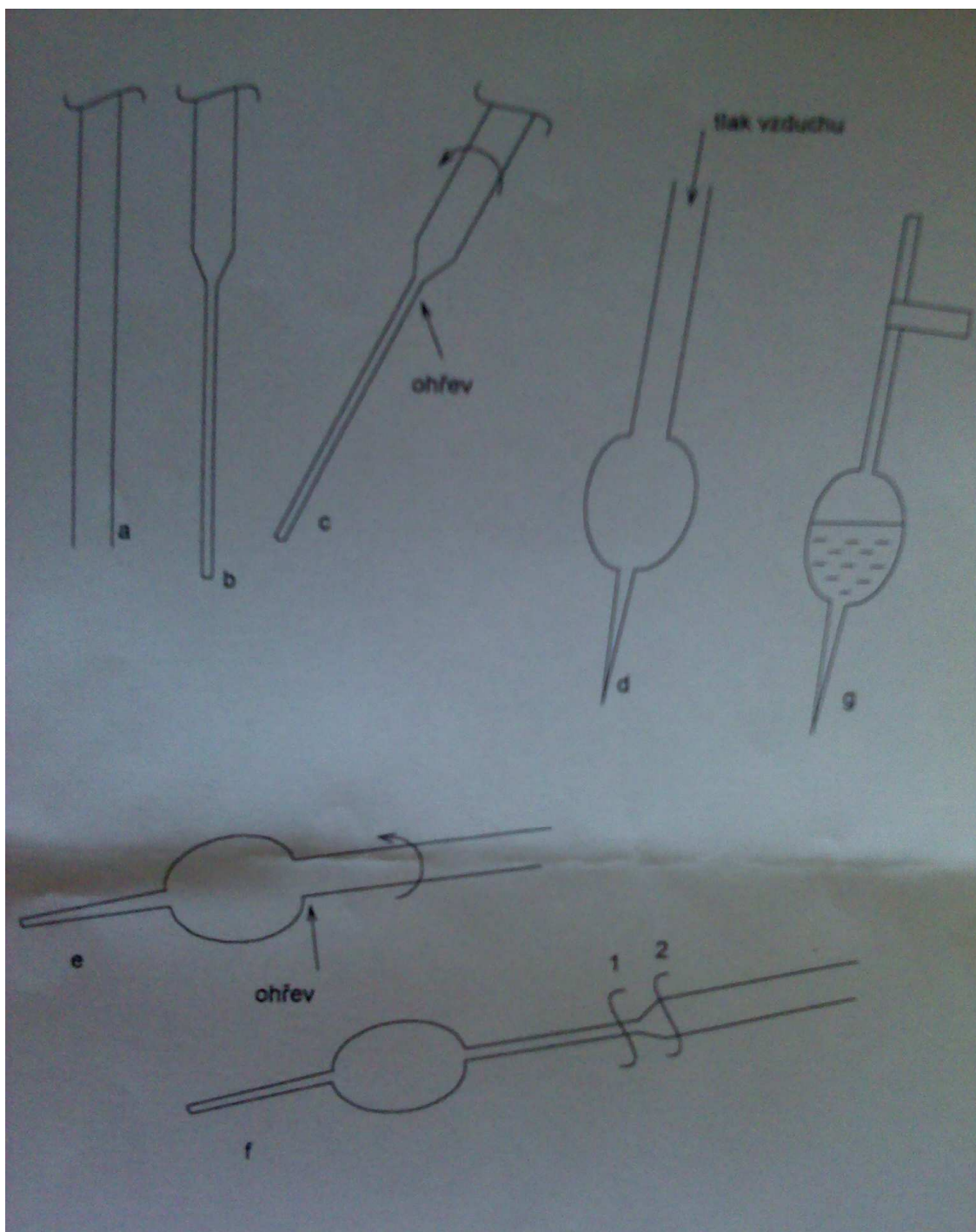
Velmi účelným zařízením pro manipulaci s kapalinami jsou skleněné balonky⁶, které zhotovujeme z trubic vhodného průměru (nejčastěji 8 – 12 mm). Volíme raději trubice se silnější stěnou, aby zhotovený balonek nebyl příliš tenkostěnný. Nejčastěji doporučovaný postup výroby balonku spočívá ve vytažení trubice (viz. obr. 6 a) do kapilár průměru kolem 2 mm (b). Potom následuje zatavení jedné kapiláry a prohřátí střední do kapiláry nevytažené části. Nakonec mírným fouknutím do otevřené kapiláry za současného mírného tahu dosáhneme vydutí střední části do mírně protáhlého tvaru (c).



Obr. 6 Klasický způsob zhotovení balonku s udáním rozměrů v cm

- a – použitá trubice
- b – trubice vytažené do kapilár
- c – hotový balonek

Balonek můžeme zhotovit i jiným postupem⁶, který nevyžaduje tak citlivé zacházení, neboť se trubice nezahřívá mezi dvěma kapilárami, ale pracuje se téměř do konce s mechanicky pevnou trubicí, do které se také fouká při zhotovování baničky balonku. Po oddělení vhodné trubice (viz. obr. 7 a) vytáhneme na jedné straně trubici do kapiláry, kterou hned zatavíme (b). Pro úspěšné zhotovení balonku je důležité rovnoměrné prohřátí trubice v blízkosti kapilárního vytažení až na teplotu měknutí skla. Z toho důvodu musíme trubicí držet šikmo k desce stolu a za rovnoměrného otáčení nasadit plamen ve vyznačeném místě (c). Hned po vyjmutí trubice z plamene uchopíme trubicí za studenou část a při přidržování druhou rukou za zatavenou kapiláru při mírném tahu rukou od sebe vyfoukneme mírně protáhlý tvar (d).



Obr. 7 Jiný postup zhotovení balonku

a – skleněná trubice vhodných rozměrů

b, c, d, e, f – postup zhotovení balonku

g – balonek naplněný kapalinou a označený praporkem s nápisem

Zdá-li se nám, že zhotovený balonek není dokonalý (tenké stěny, nevhodné rozměry), můžeme tvar (d) opatrně zahřívát za rovnoměrného otáčení trubcí v šikmém postavení trubice k desce stolu tak dlouho, až dosáhneme zpět tvaru (c). V tomto případě z horní části trubice skla část skloviny do místa budoucího balonku a při opakovaném vyfouknutí již získáme baničku se silnějšími stěnami. Při dokončení balonku nasadíme plamen hned za rozšířením (e) a po prohřátí na teplotu měknutí skla vytáhneme kapiláru. Oddělení zbytku skla provedeme v místě 1 nebo 2 (f) podle zamýšleného využití balonku. Protože při manipulaci s balonkem mohou uvnitř balonku vznikat značné rozdíly tlaků, je výhodné se o pevnosti stěn přesvědčit mírným poklepem balonku o dřevěnou desku stolu. Manipulace s balonky je založena na principu tepelné roztažnosti plynů a jejich kontrakci ochlazením. Vsuneme-li otevřenou kapiláru zahřátého balonku pod hladinu kapaliny, dochází při jeho ochlazení k nasátí kapaliny. Pro zvýšení účinku je výhodné po vpravení části kapaliny do balonku tuto zahřátím odpařit. Tím dojde k vypuzení větší části vzduchu parami rozpouštědla. Při ochlazení balonku páry rozpouštědla kondenzují a sací efekt balonku se výrazně zvýší. Podle používaného rozpouštědla můžeme k ohřevu užít dlaň ruky (v případě etheru) nebo jiný zdroj tepla. Při plnění balonku těkavými kapalinami sací efekt zvýšíme přiložením smotku vaty namočené v etheru k jeho povrchu. Při odpařování etheru z vaty se balonek výrazně ochladí. Chceme-li kapalinu v balonku uchovat, zatavíme otevřenou kapiláru a balonek opatříme praporkem s nápisem (g). Takto označený balonek ukládáme do kádinky nebo jiného vhodného obalu. S výhodou můžeme také označený balonek zapíchnout do polystyrenového bloku.

3.2 Tenkovrstvá chromatografie

V této práci byl jak pro analytickou, tak preparativní TLC používán silikagel s příměsí sádry firmy MERCK (Kieselgel 60 G). Pro analýzu byly užívány také hotové vrstvy firmy MERCK (Kieselgel 60 F₂₅₄).

3.2.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie

Před vlastním zahájením TLC byly připraveny lité desky silikagelu MERCK, který byl v množství 36 g suspendován v 83 ml vody. Vzniklá suspenze byla

rozprostřena na 36 podložních mikroskopických sklíčkách rozměrů 75 x 26 mm narovnaných na skleněnou podložku. Suspenze byla rozetřena a urovňána k tomu účelu zvlášť upravenou tyčinkou (viz. kap. 2.4.1).

3.2.2 Tenkovrstvá preparativní chromatografie

25 g silikagelu Kieselgel 60 G bylo rozmícháno s 55 ml vody. Vzniklá suspenze byla nalita na skleněnou desku rozměrů 20 x 20 cm, hrdlem baňky rozprostřena po celé ploše a poklepem prsty urovňána do souvislé plochy. Po jejím úplném vysušení byla použita (viz. kap. 3.7.5 a 3.7.7).

3.3 Extrakce březové kůry

11,30 g březové kůry bylo extrahováno ethanolem po dobu osmi hodin v Soxhletově přístroji. Získaný extrakt (150 ml) byl zahuštěn ke krystalizaci oddestilováním 100 ml ethanolu a zchlazen pod tekoucí vodou. Krystalický podíl byl odsát a vysušen. Hmotnost suchého produktu byla 1,1344 g (t. t. 247 – 252 °C).

Filtrát byl znovu zahuštěn oddestilováním 25 ml a zchlazen. Krystalický podíl byl odsát a vysušen. Jeho hmotnost činila 0,4801 g (t.t. 247 – 251 °C).

Zbýlý filtrát byl oddestilován do sucha. Hmotnost odparku činila 1,5519 g. Podle teploty tání (215 – 220 °C) i TLC byl tento betulin (I) velmi znečištěn dalšími látkami.

Celkem bylo získáno 3,1664 g produktu I (28 % vztaženo na hmotnost extrahované kůry).



1 2 3 4

Obr. 8 TLC frakcí krystalizace extraktu březové kůry ve srovnání s čistým betulinem

- 1 čistý betulin
- 2 odparek surového extraktu
- 3 první krystalický podíl
- 4 odparek filtrátu po 1. a 2. destilaci

Jako vyvolávací směs byl v tomto i ve všech ostatních případech použit bezvodý roztok n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10 : 3.

3.4 Příprava allobetulin-formiátu

2,50 g betulinu (I) bylo zahříváno s 35 ml 85% kyseliny mravenčí pod zpětným chladičem šest hodin. Druhý den po vykrystalování byl pevný podíl odsát a promyt ethanolem. Potom byl tento podíl povařen s 30 ml ethanolu po dobu jedné hodiny. Pevný podíl byl odsát, promyt ethanolem a vysušen.

Bylo získáno 1,15 g produktu II (43,2 %, t. t. 300 – 302 °C).

3.5 Allobetulin

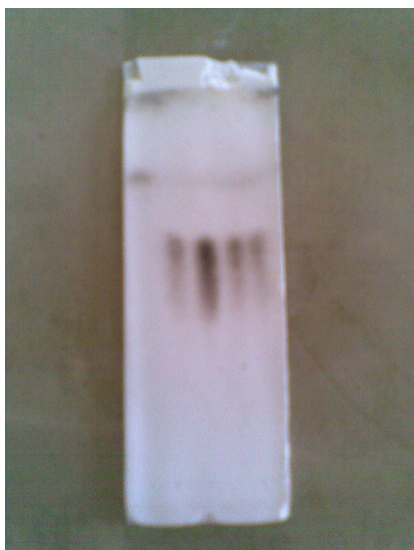
1,15 g allobetulin-formiátu (II) bylo rozpuštěno ve 25 ml benzenu. Ke směsi byl přidán roztok 2 g KOH v 15 ml ethanolu. Tato směs byla zahřívána po čtyři a půl

hodiny pod zpětným chladičem. Dále byl přilít roztok 0,2 g KOH ve 20 ml ethanolu. Roztok byl zahuštěn ke krystalizaci oddestilováním 40 ml rozpouštědla a ponechán pět hodin v klidu. Krystalický podíl III byl odfiltrován a vysušen. Jeho hmotnost činila 0,4 g (t. t. 262 – 263 °C).

K filtrátu bylo přilito 40 ml ethanolu a tato směs byla ponechána znovu krystalizovat. Krystalky byly odsáty a vysušeny. Hmotnost tohoto krystalického podílu III činila 0,1 g (t. t. 275 – 277 °C)

Odfiltrovaný roztok byl zahuštěn asi na 1/3. Vykristaloval další podíl III o hmotnosti 0,45 g (t. t. 261 - 264 °C).

Celkový výtěžek allobetulinu (III) činil 0,86 g (74,8 %).



1 2 3 4

Obr. 9 TLC připraveného allobetulinu v porovnání s čistým allobetulinem

- 1 čistý allobetulin
- 2 první krystalický podíl
- 3 druhý krystalický podíl
- 4 třetí krystalický podíl

3.6 Oxidace allobetulinu na allobetulon

3.6.1 Oxidace oxidem chromovým

0,5 g allobetulinu (III) bylo rozpuštěno za varu v 7,5 ml kyseliny octové. Potom byl roztok za stálého míchání ochlazen pod vodovodem. Ke vzniklé suspenzi byl za intenzivního míchání na elektromagnetické míchačce přikapáván během jedné a půl hodiny roztok 0,0880 g CrO_3 v 0,1 ml vody a 2 ml kyseliny octové¹⁰. Směs byla ponechána v klidu při laboratorní teplotě po 24 hodin. Dále byl přidáván methanol (asi 2 ml) dokud směs jednoznačně nezezelenala. Potom byl roztok zředěn 10 ml vody. Vzniklá sraženina byla odsáta, promyta vodou a vysušena. Bylo získáno 0,4717 g surového allobetulonu (V).

Sraženina byla rozpuštěna za varu ve 2,5 ml 99 % kyseliny octové. Po ochlazení vykristaloval pevný podíl. Filtrát byl odsát balonkem a krystalky vysušeny. Bylo získáno 0,4696 g (94,4 %) allobetulonu (V) (t. t. 225 – 228 °C).

3.6.2 Oxidace dichromanem sodným

K 53,4 mg allobetulinu (III) bylo přidáno 38,7 mg octanu sodného v 10,7 ml kyseliny octové. Za stálého míchání byl přilít roztok 96,9 mg dihydrátu dichromanu sodného ve 3,9 ml kyseliny octové¹¹. Směs byla ponechána 24 hodin v klidu při laboratorní teplotě. Poté byla zředěna 25 ml vody a extrahována v dělicí nálevce třikrát 5 ml chloroformu. Spojené chloroformové podíly byly dvakrát vymyty 20 ml vody, 20 ml nasyceného vodného roztoku NaHCO_3 a vysušeny lžičkou bezvodého síranu sodného. Chloroformový podíl byl opatrně slit do připravené zvažené baňky. Oddestilováním chloroformu do sucha bylo získáno 46,1 mg (86,7 %) pevného podílu V podle TLC jednotného složení a identického s produktem reakce 3.6.1, (t. t. 198 – 205 °C).

3.6.3 Oxidace Jonesovým činidlem za varu

Příprava Jonesova činidla: 2,672 g CrO₃ bylo rozpuštěno ve 2,3 ml 96% kyseliny sírové a následně doplněno vodou do 10 ml v odměrné baňce.

500 mg allobetulinu (III) bylo rozpuštěno ve 28,9 ml kyseliny octové. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce bylo během dvou minut přikapáno 4,8 ml Jonesova činidla. Po dalších třech minutách míchání byl přidán 1 ml methanolu a 19 ml vody. Tato směs byla tři hodiny zahřívána k varu a ještě za varu bylo po částech přilito 48 ml vody tak, aby se var nepřerušil. Roztok byl ponechán v klidu krystalizovat dva týdny. Krystalky byly odsáty, promyty vodou a vysušeny. Bylo získáno 302,4 mg produktu¹².

Surový produkt byl dvakrát překrystalizován. Nejprve byl za horka rozpuštěn v 5,5 ml kyseliny octové. Dále byl roztok přefiltrován balonkem, zahuštěn a ponechán krystalizovat. Filtrát byl odsát balonkem a pevný podíl byl vysušen. Hmotnost produktu činila 198,3 mg (39,8 %) (t. t. 258 – 263 °C). Podle TLC i teploty tání se jednalo především o nezreagovaný allobetulin (III).

3.6.4 Oxidace Jonesovým činidlem za studena

500 mg allobetulinu (III) bylo rozpuštěno ve 28,9 ml kyseliny octové. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce bylo během dvou minut přikapáno 4,8 ml Jonesova činidla. Po dalších třech minutách míchání byl přidán 1 ml methanolu a 19 ml vody. Potom bylo přilito ještě 48 ml vody. Roztok byl ponechán krystalizovat 24 hodin. Pevný podíl byl odsát, promyt vodou a vysušen. Hmotnost surového produktu činila 291,7 mg¹².

Surový produkt byl opět dvakrát překrystalizován. Bylo získáno 173,1 mg (34,8 %) pevného podílu (t. t. 256 – 258 °C). Vzniklý produkt obsahoval podle teploty tání i podle tenkovrstvé chromatografie stejně jako v předešlém postupu převážně allobetulin (III) a jen minimální podíl allobetulonů (V) – vysvětlení viz. kap. 2.3.3.



1 2 3 4

Obr. 10 TLC vzorků z oxidací Jonesovým činidlem v porovnání s čistým allobetulinem a allobetulonem vzniklým oxidací pomocí oxidu chromového

1 čistý allobetulin

2 allobetulon vzniklý oxidací oxidem chromovým

3 překrystalovaný produkt vzniklý oxidací Jonesovým činidlem za varu

4 překrystalovaný produkt vzniklý oxidací Jonesovým činidlem za studena

3.6.5 Dehydrogenace měděným práškem

10 mg allobetulinu (III) a 10 mg práškové mědi bylo zhomogenizováno ve třecí misce. Malé množství této směsi bylo vloženo mezi krycí sklíčka a následně zahříváno na Kofflerově bloku. Teplota bodotávku byla udržována mezi 295 – 305 °C po dobu půl hodiny. Poté byl vzorek ponechán v klidu ke zchladnutí. Odebráním vzorku na TLC byl vedle nezreagovaného allobetulinu (III) zjištěn poměrně vysoký obsah allobetulonů (V).



1 2 3

Obr. 11 TLC allobetulonů vzniklého dehydrogenací allobetulinu Cu-práškem

1 produkt vzniklý dehydrogenací allobetulinu Cu-práškem

2 allobetulin použitý do reakce

3 allobetulon vzniklý oxidací pomocí oxidu chromového

3.7 Elektrooxidace allobetulinu na allobetulon

3.7.1 Příprava vhodného rozpouštědla

10 mg allobetulinu (III) bylo rozpuštěno ve 2 ml koncentrované kyseliny octové. Protože se vše rozpustilo, bylo přidáno ještě jednou 10 mg allobetulinu (III). Tentokrát se všechno nerozpustilo. Kyselina octová byla odsáta balonkem, zbytek allobetulinu (III) byl vysušen a zvážen. Tak bylo zjištěno, že ve 2 ml kyseliny octové se rozpustilo 19,4 mg allobetulinu (III).

Podobným způsobem bylo dokázáno, že ve 2 ml dioxanu se rozpustí 8,3 mg allobetulinu (III). V kyselině octové byl allobetulin (III) rozpustnější. Kyselina je tedy vhodnější jako použité rozpouštědlo.

Rozpustnost allobetulinu (III) byla tedy ještě vyzkoušena se zředěnou kyselinou octovou. 20 mg allobetulinu (III) bylo rozpuštěno ve 2 ml koncentrované kyseliny octové a poté bylo přilito 0,5 ml vody. Po přidání vody se část allobetulinu (III)

vyloučila. Zředěná kyselina byla odsáta balonkem, krystalky byly vysušeny a zváženy. Ve zředěné kyselině se rozpustilo 9,1 g allobetulinu (III).

3.7.2 Elektrooxidace s přidavkem octanu sodného

160 mg allobetulinu (III) bylo rozpuštěno ve 160 ml kyseliny octové. K roztoku bylo přidáno 3,6 g octanu sodného ve 40 ml vody. Potom byl připraven stejný roztok, ale již bez allobetulinu (III).

Roztok obsahující allobetulin (III) byl nalit do prostoru platinové anody, elektrolyt bez allobetulinu do prostoru nerezové katody. Po spuštění elektrolyzéry bylo napětí nastaveno na 30 V a elektrický proud byl 130 mA. Po několika minutách proud klesl a v průběhu elektrolyzy se pohyboval mezi 30 a 90 mA. Reakce probíhala celkově 25 hodin.

3.7.3 Zkouška na zreagovaný allobetulin

Po 3 hodinách a 30 minutách elektrolyzy bylo odebráno 5 ml roztoku jako vzorek pro zkoušku průběhu reakce.

Ke vzorku bylo přidáno 20 ml vody a ten se zakalil. Takto připravený vzorek byl 3x vytřepán 25 ml chloroformu. Všechny tři chloroformové části byly spojeny a promyty 20 ml vody. Potom byla chloroformová část zneutralizována 20 ml vody se lžičkou hydrogenuhličitanu sodného a opět oddělena od vodné části. Nakonec byly přidány 2 lžičky síranu sodného k vysušení. Roztok byl opatrně přelit do připravené baňky a síran byl ještě 3x promyt trochou chloroformu, aby nevznikly ztráty. Směs byla oddestilována k suchu.

Podle tenkovrstvé chromatografie byl patrný zatím pouze náznak zreagování allobetulinu (III).

Po 16 hodinách byla zkouška zopakována stejným způsobem. Tentokrát bylo zreagování látky již dobře viditelné.



1 2 3 4



5 6 7 8

Obr. 12 TLC vzorků elektrooxidace allobetulinu po 3 h 30 min a po 16 h

1, 3, 5, 8 čistý allobetulin

2, 4, 6 vzorek po 3 h a 30 min elektrolýzy

7 vzorek po 16 h elektrolýzy

3.7.4 Zpracování látky po dokončené elektrolýze

K roztoku z prostoru platinové anody bylo přilito 300 ml vody. Směs byla 5x protřepána 25 ml chloroformu. Chloroformové části byly spojeny a přefiltrovány přes vat. Roztok byl nejprve promyt 50 ml vody, potom zneutralizován 50 ml vody se lžičkou sody a nakonec vysušen dvěma lžičky síranu sodného. Tento roztok byl oddestilován do sucha a zvážen.

S odebranými vzorky činila hmotnost zreagované látky 150,4 mg (tj. 94 %).

Podobně byl zpracován vzorek odebraný z prostoru nerezové katody. Tímto způsobem bylo zjištěno, že se do tohoto prostoru dostalo pouze minimální množství allobetulinu (III). Proto mohl být roztok použit pro opakování pokusu.



1 2 3 4 5 6

Obr. 13 TLC látky po dokončené elektrolýze a srovnání s předchozími vzorky

1 čistý allobetulin

2 vzorek po 3h a 30 min elektrolýzy

3 vzorek po 16 h elektrolýzy

4 látka po dokončené elektrolýze

5 vzorek odebraný z prostoru nerezové katody

6 čistý allobetulin

3.7.5 Preparativní TLC chromatografie produktu elektrolýzy

Zreagovaný produkt (150 mg) byl rozpuštěn ve 4 ml chloroformu. Obě již dříve připravené preparativní TLC desky (viz. kap. 3.2.2) byly položeny vedle sebe a na jejich start byl rovným dílem v souvislém pruhu vypuštěn obsah balonku. Do balonku byly nasáty ještě 2 ml chloroformu, který byl po vypláchnutí balonku vypuštěn na dříve vytvořený start obou desek. Tím bylo zajištěno rovnoměrné rozdělení chromatografované směsi na obě desky (75 mg na každé).

Desky byly jednotlivě vyvíjeny ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu (10 : 3). Podle středů stop analytické TLC (viz. obr. 1) byly stanoveny retardační faktory, které byly využity k rozdělení preparativní TLC na jednotlivé pruhy (viz. tabulka 1). Tyto pruhy tenké vrstvy byly postupně odebrány, vsypány do chromatografických trubic nad

smotek vaty a přelity nadměrným množstvím rozpouštědla (ethyl-acetát a n-hexan, 1 : 1). Rozpouštědlo se nechalo prokapat do předem zvážených baněk.

Jednotlivé vzorky byly oddestilovány k suchu a poté dosušeny v sušárně. Nakonec byly zváženy.

Jelikož celkové množství látek bylo pouze 38,1 mg (tj. 54,4 %), nechalo se rozpouštědlo do odpovídajících baněk prokapat ještě jednou. Poté bylo získáno dohromady 46 mg látky (tj. 65,7 %).

Tabulka 1 Hmotnosti jednotlivých částí z první preparativní desky

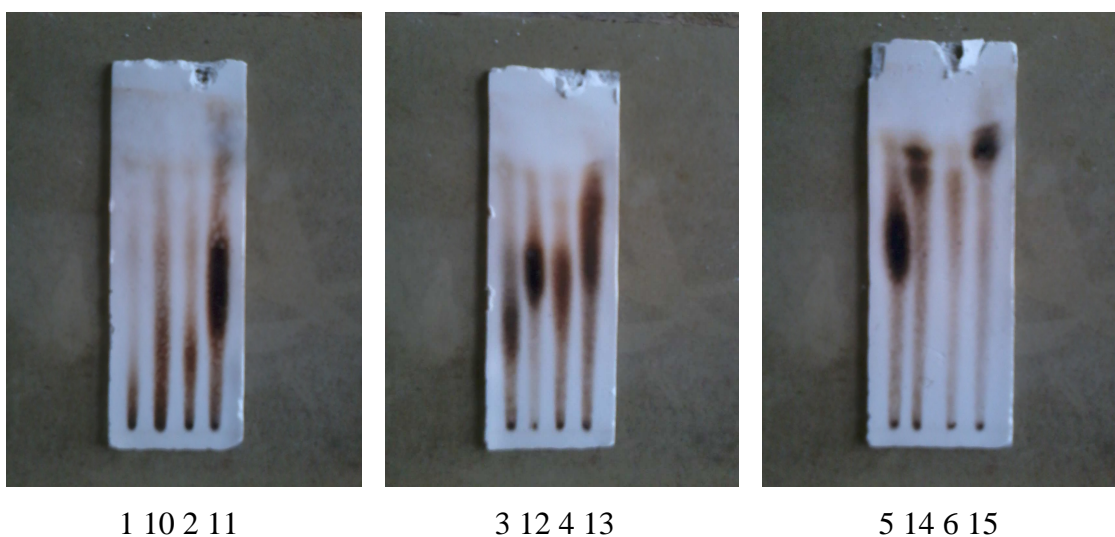
Část	Rf	Střed stopy [cm]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost části I. [mg]	Hmotnost části II. [mg]
1	0,15	2,7	44,9982	9,0	9,0
2	0,26	4,2	42,4658	2,2	2,2
3	0,32	5,9	46,8533	3,0	4,7
4	0,42	7,7	36,6257	5,7	6,2
5	0,52	9,5	46,6416	10,3	12,6
6	0,61	11,3	47,2041	2,9	2,9
7	0,69	12,8	68,3390	1,0	2,1
8	0,79	14,5	61,3911	2,1	3,4
9	1,00	18,4	61,6610	1,9	2,9
Celkem				38,1	46,0

Druhá preparativní deska byla zpracována podobným způsobem. Jelikož v předešlém případě bylo poprvé použito malé množství rozpouštědla, tentokrát byla hmotnost jednotlivých částí zvážena až po dostatečném prolití rozpouštědlem. Zde bylo získáno dohromady 37,2 mg látky (tj. 53 %).

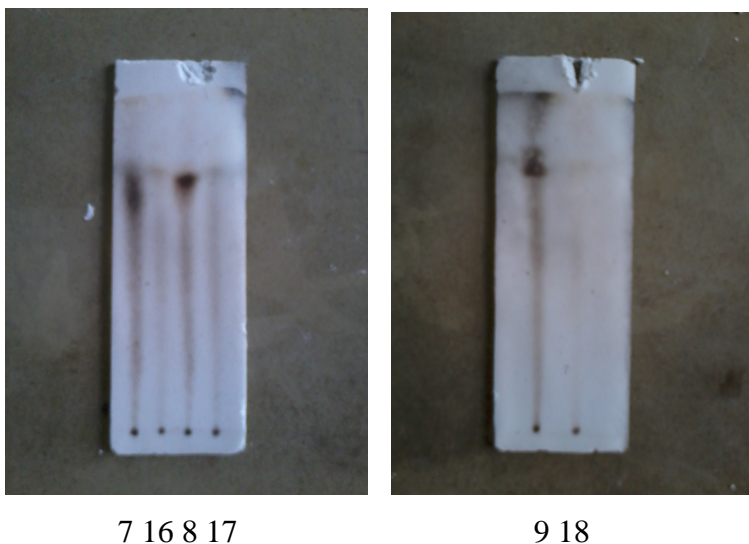
Tabulka 2 Hmotnosti jednotlivých částí z druhé preparativní desky

Část	Rf	Střed stopy [cm]	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost části [mg]
10	0,15	2,7	78,4736	14,0
11	0,26	4,2	108,1356	4,9
12	0,32	5,9	69,7337	10,8
13	0,42	7,7	41,1452	1,6
14	0,52	9,5	72,9009	1,0
15	0,61	11,3	79,8158	1,1
16	0,69	12,8	42,8731	1,2
17	0,79	14,5	37,3110	1,3
18	1,00	18,4	140,6920	1,3
Celkem				37,2

Ze všech osmnácti částí byla udělána tenkovrstvá chromatografie ke zjištění jejich složení. Vždy byly vedle sebe nanášeny dvě odpovídající části z jedné a z druhé desky (číslování dle tabulek).



Obr. 14 TLC všech jednotlivých částí z obou preparativních desek



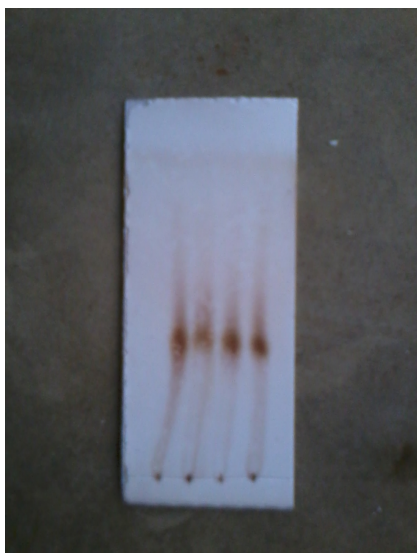
Pokračování obr. 14

Podle TLC (obr. 14) je patrné, že k rozdělení produktu došlo, ale v dělení je na základě podobnosti některých stop třeba pokračovat.

3.7.6 Krystalizace spojených frakcí 5 a 12

Pátá a dvanáctá složka (29,8 mg), podle TLC dosti podobné, byly rozpuštěny v chloroformu a smíchány dohromady do předem zvažené lékovky. K tomuto roztoku byl za horka přikapáván n-hexan, do zahájení krystalizace. Po první krystalizaci vzniklo 13,7 mg vzorku (t. t. 215 – 250 °C), po druhé krystalizaci vzniklo 10,2 mg (t. t. 224 – 250 °C) a po třetí krystalizaci vzniklo 2,1 mg, podle TLC i bodu tání (t. t. 245 – 253 °C), již čistého allobetulinu (III).

Celkový výtěžek činil 26,0 mg (tj. 87 %).



1 2 3 4

Obr. 15 TLC postupné krystalizace látky

1 směs 5. a 12. části látky po elektrolýze

2 první krystalický podíl

3 druhý krystalický podíl

4 třetí krystalický podíl

3.7.7 Zpracování spojených složek 1, 2, 10 a 12

Složky 1, 2, 10 a 12 (29,9 mg) byly rozpuštěny v chloroformu a spojeny. Tento roztok byl oddestilován na minimální množství a balonkem byl nanesen na preparativní desku. Preparativní vrstva byla vyluhována 3 krát směsí n-hexan a ethyl-acetát (10 : 3). Poté byla vypálena drátem.

Po vypálení elektricky žhaveným odporovým drátem byla deska rozdělena na sedm částí. Jednotlivé části byly nasypány do trubic nad smotek vaty a přelity nadbytkem rozpouštědla ethyl-acetát a n-hexan (1 : 1). Po překapání rozpouštědla do předem zvážených baněk z nich bylo rozpouštědlo oddestilováno k suchu a jednotlivé vzorky byly dosušeny v sušárně a zváženy.

Celkový výtěžek činil 20,3 mg (tj. 68 %).

Tabulka 3 Hmotnost jednotlivých částí po dalším dělení

Část	Hmotnost prázdné baňky [g]	Hmotnost části [mg]
1	40,7110	6,1
2	46,5192	4,5
3	44,8631	4,7
4	78,4689	1,0
5	42,4066	2,0
6	56,8183	1,0
7	69,7361	1,0
Celkem		20,3

Ani tímto způsobem nebyla získána v dostatečném množství kromě výchozího allobetulinu (III) žádná složka a proto bude třeba v budoucnu reakci a následné zpracování reakční směsi opakovat.

4 ZÁVĚR

Počátkem této práce byl extrahován betulin (I) z březové kůry, který byl přeměněn na allobetulin (III) přes meziprodukt allobetulin-formiát (II). Allobetulin (III) byl poté oxidován na allobetulon (V) pomocí několika různých činidel a za různých podmínek. Zatím, co klasické metody oxidace s oxidem chromovým i dichromanem sodným vedly k žádanému cíli, ostatní metody vyžadují dopracování. Dehydrogenace allobetulinu (III) měděným práškem byla provedena pouze na bodotávku. Ukázalo se, že allobetulon (V) vzniká, ale reakce dál sledována nebyla. Elektroreakce, která se nabízí z obecného hlediska jako zajímavá, má mnoho nedořešených úskalí a bylo by vhodné se v budoucnu věnovat studiu elektrolytu, který by při vysoké vodivosti rozpouštěl dostatečné množství allobetulinu (III) a sám neposkytoval s allobetulinem (III) sekundární produkty.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Pacák J.: Stručné základy organické chemie. SNTL, Praha 1975
2. Triterpeny, <http://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>, staženo 3. 7. 2013
3. Klinotová E., Klinot J., Máca B., Trnka T., Všetečka V.: Základní cvičení z organické chemie (Skripta Přírodovědecké fakulty UK v Praze). UK Praha 1980
4. Vystrčil A., Klinot J.: Collect. Czech. Chem. Commun., 24, 3273 (1959)
5. Green B., Bentley M. D., Chung B. Y., Lunch N. G., Jensen B. L.: J. Chem. Educ. 84, 1985 (2007)
6. Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii. PF, ZČU Plzeň 1993
7. Mindl J.: Základy elektroorganické chemie. Academia, Praha 2000
8. Kořuha J.: Elektrochemická oxidace triterpenoidních alkenů. Bakalářská práce. ZČU Plzeň 2008
9. Kořuha J.: Elektrochemické reakce organických látek. Diplomová práce. ZČU Plzeň 2011
10. Klinot J., Vystrčil A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 31, 1079 (1966)
11. Klinot J., Richtr V., Vystrčil A.: Collect. Czech. Chem. Commun. 40, 1758 (1975)
12. Dračínský M., Richtr V., Křeček V., Sejbal J., Klinot J., Budyšínský M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 71, 387 (2006)

Summary

This work began with the extraction of the betuline from a birch bark. The betuline was converted to allobetulin using intermediate the allobetulin-formate. Then the allobetuline was oxidized to the allobetulone using with other agents under various conditions. The classical methods of an oxidation with chromium oxide and sodium dichromate led to the desired goals. Other methods require a completion. Dehydrogenation the allobetuline with the copper powder was performed only on the block of Koffler. The allobetulone originated but the reaction wasn't monitored further. Electrochemical reaction has many outstanding a things. This issue will be discussed in the future.

