

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

JEDNODUCHÉ REAKCE LUPANOVÝCH DERIVÁTŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Anna Váňová

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň 2020

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

V Plzni, 31. července 2020

.....
vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. Za odborné a trpělivé vedení mé práce, a také za jeho cenné rady.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna VÁŇOVÁ**
Osobní číslo: **P17B0016P**
Studijní program: **B1001 Přírodovědná studia**
Studijní obor: **Chemie se zaměřením na vzdělávání**
Téma práce: **Jednoduché reakce lupenových derivátů**
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

Zásady pro vypracování

1. Seznámit se s chemií terpenoidních sloučenin.
2. Seznámit se s chemií lupenových derivátů.
3. Seznámit se s principy semimikrotechniky.
4. Získat a zpracovat extrakt březové kůry.
5. Vytypovat vhodné reakce s použitím TLC a vypracovat metodiku jejich provedení.



Rozsah bakalářské práce: **40 stran**
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Mc Murry J.: Organická chemie. VŠCHT, Praha 2007.
Vašmucius V.: Přehled reakcí triterpenoidních sloučenin. Diplomová práce. FPE ZČU v Plzni, 1995.
Richtř V.: Semimikrotechnika v organické chemii. PF ZČU v Plzni, 1993.
Vybrané články časopisu Collect. Czech. Chem. Commun. (od roku 1959 do konce roku 2006).
Vybrané články časopisu J. Chem. Educ. (od roku 2000 dosud).

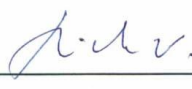
Vedoucí bakalářské práce: **Doc. Mgr. Václav Richtř, CSc.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **31. května 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2020**



RNDr. Miroslav Randa, Ph.D.
děkan





Doc. Mgr. Václav Richtř, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. května 2019

V Plzni dne 24. června 2020
č.j. ZCU-014051/2020/K

Rozhodnutí

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

takto:

Žádosti studentky **Anny VÁŇOVÉ**, (osobní číslo *P17B0016P*) studující v bakalářském studijním programu *Přírodovědná studia*, studijní obor *Chemie se zaměřením na vzdělávání* se vyhovuje a určuje se náhradní termín odevzdání bakalářské práce s názvem „*Jednoduché reakce lupenových derivátů*“ do **31. července 2020**.

Odůvodnění:

Studentka byla povinna odevzdat kvalifikační práci dle jejího zadání nejpozději do 30. června 2020. Studentka, aniž by odevzdala kvalifikační práci, podala k děkanovi fakulty podle čl. 55 odst. 2 studijního a zkušebního řádu žádost o stanovení náhradního termínu odevzdání kvalifikační práce s odůvodněním, že do termínu původně určeného pro odevzdání kvalifikační práce není schopna práci zpracovat z důvodu pandemie Covid-19 (experimentální část).

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

Poučení:

Proti tomuto rozhodnutí není opravného prostředku.

doc. RNDr. Pavel Mentlík, Ph.D.
děkan FPE ZČU v Plzni



v z. Mgr. Jan Krotký, Ph.D.
proděkan pro vzdělávání

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	2
ÚVOD	3
1 TEORETICKÁ ČÁST	6
1.1 ISOPRENOIDY	6
1.1.1 Steroidy.....	6
1.1.2 Terpenoidy.....	6
1.2 SEPARAČNÍ METODY	11
1.2.1 Extrakce	12
1.2.2 Destilace	13
1.2.3 Chromatografie.....	14
1.2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	14
1.2.3.2 Retardační faktor.....	16
1.3 STANOVENÍ TEPLITY TÁNÍ	16
1.4 DEHYDRATACE ALKOHOLŮ	18
1.5 IZOMERACE KRUHU E A DEHYDRATACE KRUHU A MOLEKULY BETULINU	20
1.5.1 Izomerace kruhu E molekuly betulinu	20
1.5.2 Dehydratace kruhu A molekuly betulinu.....	21
1.6 POPIS POSTUPŮ A VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE ŠNAIBERKOVÉ ^[15]	22
1.7 CHEMIKÁLIE - ROZPOUŠTĚDLA	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
2.1 PŘÍPRAVA PLASTINEK PRO TLC	26
2.2 TVORBA KAPILÁR	28
2.3 PROCVIČOVÁNÍ PROVEDENÍ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRAFIE	28
2.4 JEDNOTLIVÉ TAVENÍ VZORKŮ NA BODOTÁVKU	29
2.4.1 Vzorek 1	30
2.4.2 Vzorek 2	30
2.4.3 Vzorek 3	30
2.4.4 Vzorek 4	31
2.4.5 Vzorek 5	31
2.5 TLC VZORKŮ	32
2.5.1 Pokusná TLC.....	32
2.5.2 TLC vzorků 1-5	33
2.5.3 TLC vzorku 4 se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apallobetulinu	35
2.6 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ TLC JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ	37
2.7 PROTOKOLY STUDENTŮ VYTVOŘENÉ V RÁMCI LABORATORNÍCH CVIČENÍ Z ORGANICKÉ CHEMIE	38
2.7.1 Vzorek A.....	39
2.7.2 Vzorek B.....	39
2.7.3 Vzorek C.....	40
2.7.4 Vzorek D.....	40
2.7.5 Vzorek E	40
ZÁVĚR.....	42
RESUMÉ	43
SEZNAM LITERATURY	44
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ	46

SEZNAM ZKRATEK

VŠCHT Vysoká škola chemicko-technologická

TLC tenkovrstvá chromatografie

FPE fakulta pedagogická

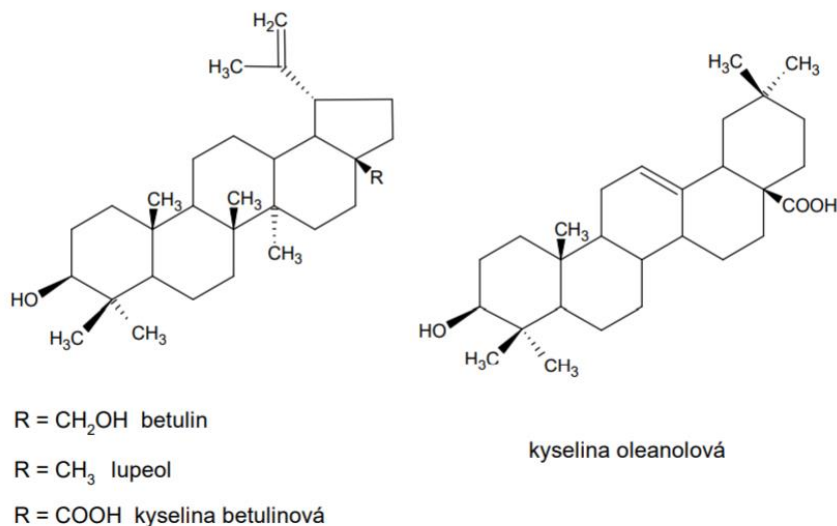
ZČU Západočeská univerzita

Úvod

Tato práce se zabývá jednoduchými reakcemi lupanových derivátů. Lupanové deriváty patří do skupiny triterpenů. Terpeny, které jsou přírodními látkami, jsou velmi obsáhlé téma, a proto se tato práce věnuje pouze jedné její malé části, a to lupanovým derivátům. Jiných kapitol tohoto tématu se dotkne pouze okrajově.

Součástí laboratorních cvičení z organické chemie na katedře chemie Fakulty pedagogické Západočeské univerzity v Plzni je izolace přírodních látek. Jednou z těchto přírodních látek je mimo jiné betulin, který je získávaný z kůry břízy bělokoré (latinsky *betula pendula*). Extrakce břízy bělokoré je popsána ve skriptech ^[1], stručně také v kapitole 1.2.1. níže. Pro tuto práci jsou použity extrakty získané právě touto metodou.

Pomocí tenkovrstvé chromatografie je v této práci zjišťována čistota vzorku, respektive zastoupení betulinu v jednotlivých extraktech. Z předem získaných informací v literatuře ^[2], diplomové práce ^[15] a zkušenosti z laboratorních cvičení z organické chemie je patrné, že se v těchto extraktech nachází i jiné látky - nejvíce již zmiňovaný betulin, ale také lupeol, kyselina betulinová a kyselina oleanolová (obr. 1).



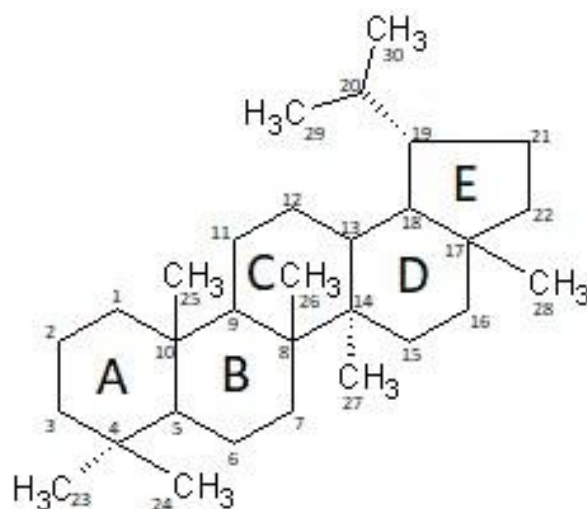
Obrázek 1: betulin, lupeol, kyselina betulinová, kyselina oleanolová, (podle ^[2])

Časopis Collection of Czechoslovak Chemical Communications, který byl založen roku 1929, obsahuje mimo jiného rozsáhlou práci na sérii článků od týmu z katedry organické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a dalších spolupracovníků z jiných pracovišť. Tyto články, které postupně vycházely od roku 1959, měly společné téma

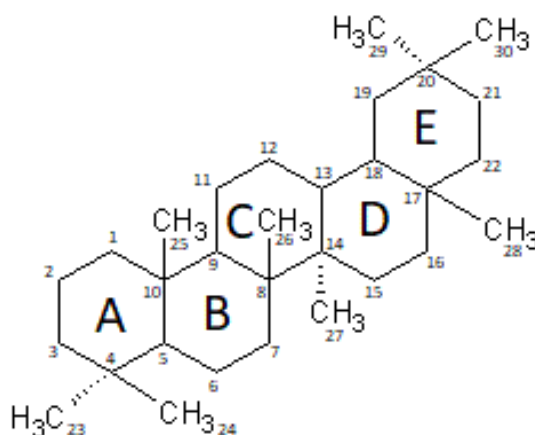
– Triterpeny. Všechny se zabývají identifikací, popisem struktur a přípravou sloučenin, které mají jako základ některý triterpen, nejčastěji oleanan, ursan či lupan.^[3]

Jak uvádí literatura ^[3], do roku 1994 bylo připraveno téměř 1300 sloučenin a právě tato literatura je zaměřena na vytvoření systematického přehledu, kde jsou sloučeniny řazeny dle vybraných předem stanovených hledisek.

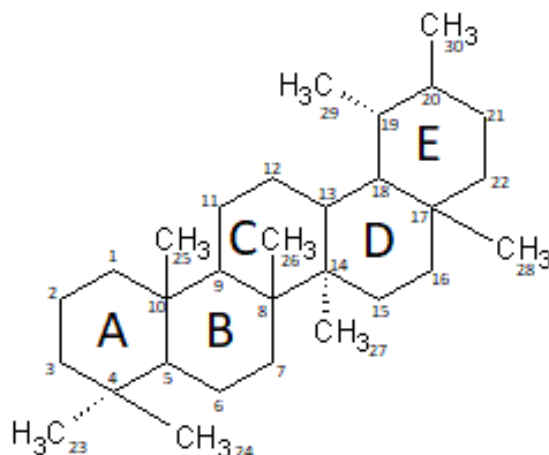
Níže jsou zobrazeny vzorce třech nejčastěji používaných základních skeletů triterpenů – lupan (obr. 2), oleanan (obr. 3) a ursan (obr. 4). Ve skeletech jsou označeny jednotlivé kruhy (písmena A až E) a také uhlíky v nich (čísla 1 až 30), dle literatury ^[3].



Obrázek 2: lupan (vlastní zpracování podle ^[3])



Obrázek 3: oleanan (vlastní zpracování podle ^[3])



Obrázek 4: ursan (vlastní zpracování podle [3])

Vzhledem ke komplikovanosti a vysokému počtu sloučenin se autor rozhodl k jejich rozdělení do menších skupin, které by měly snazší manipulaci, a také by to vedlo k lepší orientaci.

První z dělení bylo už výše uvedeno – dle základního skeletu – na lupany, oleanany a ursany. Dalším krokem bylo určení důležitosti navázaných funkčních skupin. Největší důraz byl kladen na hydroxylovou skupinu a skupiny od ní odvozené, následovala oxoskupina a skupiny od ní odvozené, a poté alkylové skupiny s jejich deriváty.

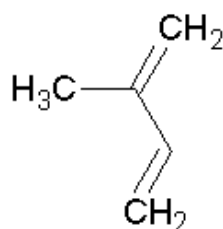
Jako nejvýznamnější byl u sloučenin určen kruh A. Tyto sloučeniny byly následně děleny na uzavřené – ty se nachází na prvním místě – a otevřené (rozštěpené). Sloučeniny s uzavřenými kruhy A se pak dále dělí na pětičlenné, šestičlenné a vícečlenné. Sloučenin s otevřenými kruhy A bylo menší množství, a proto je bylo snazší seřadit.^[3]

Následovalo dělení sloučenin dle samotného uzavřeného, šestičlenného kruhu A. Na ty, které na tomto kruhu A neměly navázaný žádný významný substituent, na ty, které měly jeden významný substituent a na ty, které měly dva významné substituenty. Sloučeniny s navázanými významnými substituenty se dále dělily dle umístění významného substituentu. V případě, že na tomto kruhu A byly navázány nějaké substituenty, které ale nebyly mezi významnými (například halogeny), byly tyto sloučeniny řazeny do skupiny s žádným významným substituentem. Literatura^[3] se zabývá dalším podrobným dělením.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ISOPRENOIDY

Isoprenoidy jsou přírodní látky, které patří mezi látky lipidní. Mohou být původu živočišného i rostlinného. Isoprenoidy jsou odvozené od isoprenu (systematickým názvem 2-methylbuta-1,3-dien)(obr. 5), který je základním stavebním kamenem těchto látek. Dělíme je do dvou skupin – terpenoidy a steroidy. Množství jednotlivých sloučenin je velké, jen terpenoidů bylo separováno více než 35 000 ^[4].



Obrázek 5: 2-methylbuta-1,3-dien

1.1.1 STEROIDY

Jako steroidy jsou označovány skupiny sloučenin, které jsou odvozené od steranu (cyklopentanoperhydrofenanthrenu), v jehož polohách 10 a 13 se nachází methylová skupina a v poloze 17 se nachází zbytek až s 10 uhlíky či skupina charakteristická tím, že obsahuje kyslík. Steroidy jsou krystalické, bezbarvé sloučeniny, které lze dobře rozpouštět v organických rozpouštědlech^[5].

1.1.2 TERPENOIDY

Terpenoidy, včetně terpenů (základních uhlovodíků), jsou klasifikovány dle počtu isoprenových jednotek na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny – viz Tabulka 1. Spojování isoprenových jednotek probíhá dle pravidla „hlava“ a „pata“, jsou tedy 3 kombinace, které mohou nastat: hlava – pata, hlava – hlava a pata – pata. Terpenoidy mohou být uhlovodíky, ale také alkoholy, karboxylovými kyselinami, ketony nebo aldehydy.

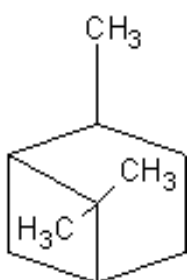
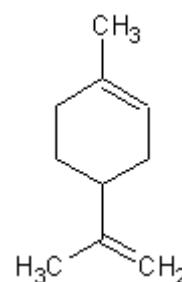
Tabulka 1: Přehled jednotlivých typů terpenů^[5]

Název	Počet isoprenových jednotek	Celkový počet atomů uhlíku
Monoterpeny	2	10
Seskviterpeny	3	15
Diterpeny	4	20
Triterpeny	6	30
Tetraterpeny	8	40
Polyterpeny	n	$5n^*$

- Kde n je velké kladné číslo

1.1.2.1 Monoterpeny

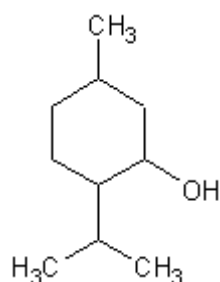
Monoterpeny obsahují 2 isoprenové jednotky, tj. 10 atomů uhlíku. Jedná se o látky kapalné a příjemně vonící. Jsou to těkavé složky rostlinných silic, které se získávají destilací^[4]. Mezi nejrozšířenější a nejvýznamnější monoterpeny patří α -pinen (obr. 6), získávaný z borové silice – terpentýnu, který se používá jako rozpouštědlo a při výrobě nátěrových hmot^[5]. α -pinen je uhlovodík, systematickým názvem 2,6,6-trimethylbicyklo-[3,1,1]-heptan.

Obrázek 6: α -pinen

Obrázek 7: limonen

Dalším zajímavým monoterpenem je limonen (obr. 7), který se nachází v citronové a pomerančové silici získávaný z těchto plodů. Limonen je uhlovodík, systematickým názvem 1-methyl-4-(prop-1-en-2-yl)cyklohexan.

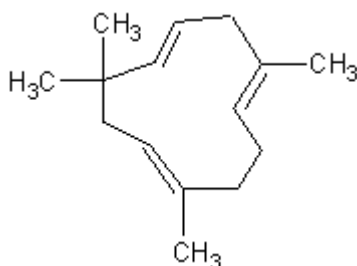
Mezi další monoterpeny patří i menthol (obr. 8), nacházející se v mátové silici, obsažené v mátě. Menthol je alkohol, systematickým názvem 5-methyl-2-(propan-2-yl)cyklohexanol.



Obrázek 8: menthol

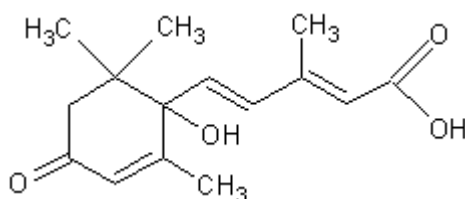
1.1.2.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou složeny z 3 isoprenových jednotek, dohromady obsahujících 15 atomů uhlíku. Stejně jako monoterpeny, jsou seskviterpeny obsažené v silicích, ačkoli v menším zastoupení. Jsou to látky kapalné a příjemně voní. Jedním ze známých seskviterpenů je humulen (obr. 9) – zodpovědný za hořkou chuť v chmelu.



Obrázek 9: humulen

Dalším seskviterpenem je například kyselina abscisová (obr. 10), která má sice složitější strukturu, ale je velmi důležitá – je obsažena v rostlinách, kde je zodpovědná za stárnutí a opadávání listů^[5].

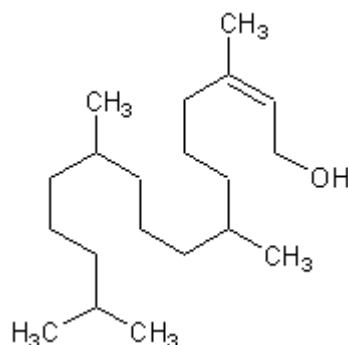


Obrázek 10: kyselina abscisová

1.1.2.3 Diterpeny

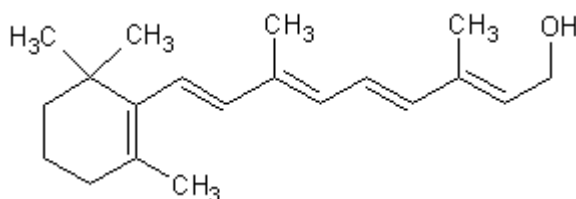
Diterpeny se skládají ze 4 isoprenových jednotek, jejich řetězec je tvořený 20 atomy uhlíku. Mezi důležité diterpeny se řadí fytol (obr. 11), který je obsažený v chlorofylu, kde je

důležitou složkou. Fytol je acyklický, nenasycený alkohol, který je v chlorofylu vázán esterově^[5].



Obrázek 11: fytol

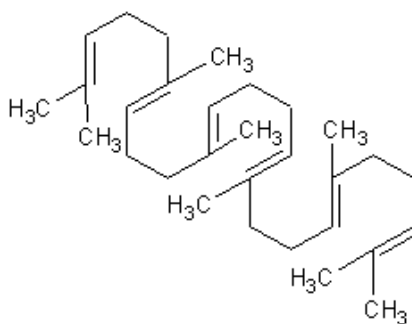
Dalším, neméně důležitým, je vitamin A (obr. 12), neboli retinol. Vitamin A je stejně jako ostatní vitaminy esenciální látkou pro člověka, což znamená, že si ho tělo nedokáže samo vytvářet, a proto ho musí přijímat v potravě. Zároveň je jedním ze 4 vitaminů, které jsou rozpustné v tucích – společně s ním ještě vitamin D, E a K. Jedná se o nenasycený alkohol.



Obrázek 12: vitamin A

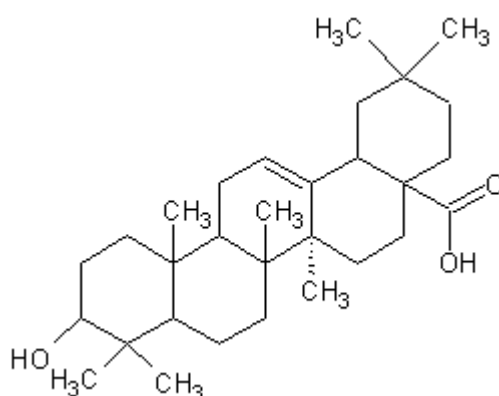
1.1.2.4 Triterpeny

Triterpeny se skládají z 6 isoprenových jednotek, to znamená z 30 atomů uhlíku. Obvykle se jedná o pevné látky, které jsou v přírodě zastoupeny buď volně, nebo jako vázané ve formě glykosidů nebo esterů^[7]. Nejznámější triterpeny jsou nejčastěji tetracyklické nebo pentacyklické a byl u nich prokázán vznik z acyklického skvalenu^[6] (obr. 13). Skvalen je zařazen mezi lineární triterpeny a je potřebný k důležitým funkcím lidského organismu. Má silné antioxidační účinky, podporuje činnost ledvin a jater, a také se používá jako látka zabraňující vedlejším účinkům při chemoterapii^[8]. Zároveň je obsažen ve velké množství v játrech žraloků, v menším množství v rostlinných olejích^[5] či olivách nebo obilných klíčcích^[8].



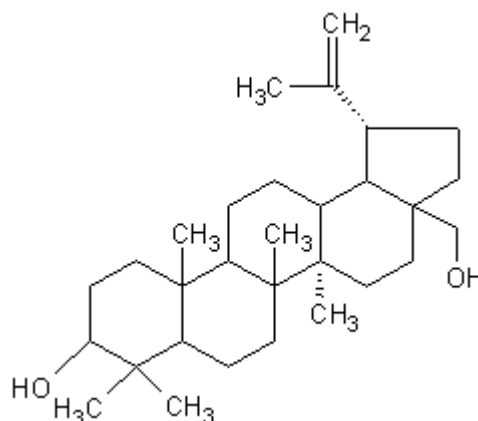
Obrázek 13: Skvalen

Kyselina oleanolová (obr. 14), vznikající zacyklením skvalenu, je ve velkém množství obsažena v cukrové řepě^{[5],[6]}.



Obrázek 14: kyselina oleanolová

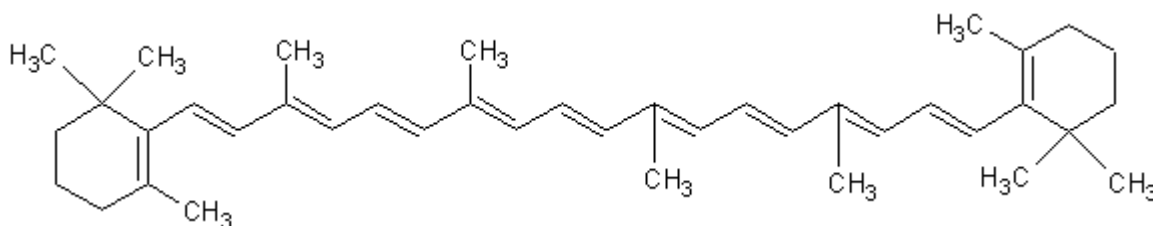
Pentacyklickým triterpenem je betulin (obr. 15), který je velmi výrazně obsažen v březové kůře, ale i jinde v přírodě. Mezi zajímavé vlastnosti betulinu patří jeho antibakteriální a antimykotické působení. Díky tomu právě březová kůra nikdy neplesniví ani nehnije^[7]. Důležitou roli hraje betulin a jeho deriváty i v lékařství, protože byl prokázán jeho anti-HIV a protivirový či protizánětlivý účinek^[9].



Obrázek 15: betulin

1.1.2.5 Tetraterpeny

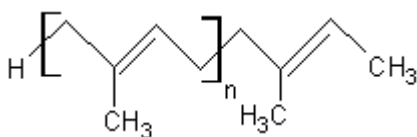
Tetraterpeny jsou složeny z 8 isoprenových jednotek, tj. 40 atomů uhlíku. Z tetraterpenů jsou nejdůležitější karotenoidy, mezi které patří karoteny, které nemají kyslíkové skupiny na koncových kruzích, a xanthofyly, které kyslíkové skupiny na koncových kruzích mají^[5]. Nejznámějším karotenoidem je β -karoten (obr. 16). β -karoten je polyenové barvivo, obsažené nejvíce ve špenátu, mrkvi a jiném ovoci a zelenině nebo vaječném žloutku. Je to provitamin vitamínu A. Také je antioxidantem.



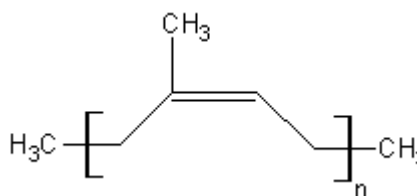
Obrázek 16: β -karoten

1.1.2.6 Polyterpeny

Polyterpeny jsou makromolekulárními látkami, tvoří je velké množství isoprenových jednotek. Například gutaperča (obr. 17) nebo kaučuk (obr. 18). Kaučuk je znám jako surovina, ze které se vyrábí pryž takzvanou vulkanizací. Na rozdíl od gutaperči je kaučuk elastický^[5].



Obrázek 17: gutaperča



Obrázek 18: kaučuk

1.2 SEPARAČNÍ METODY

SeparáčnÍ metody jsou využívány k rozdělení vícesložkového vzorku na několik částí s různým složením. V ideálním případě je v platnosti to, že každá část obsahuje právě jednu složku. Separovat můžeme při jedné operaci od dvou (příkladem je extrakce) až po několik desítek (příkladem je plynová chromatografie) složek^[10].

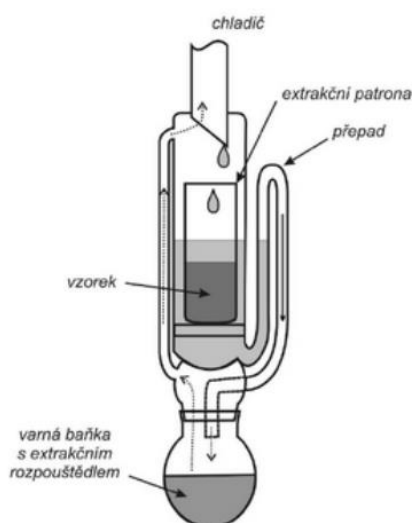
Dělení separáčnÍch metod dle rozdílů v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze je uvedeno v tabulce 2 (cit. ^[10]).

Tabulka 2: Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze^[10]

Plyn – kapalina	Plyn – tuhá fáze	Kapalina – kapalina	Kapalina – tuhá fáze
Plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	Plynová adsorpční chromatografie (GSC)	Extrakce	Kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
Destilace	Sublimace	Kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	Iontově výměnná chromatografie (IEC)
Plynové dělení	Molekulová síta	Gelová permeační chromatografie (GPC)	Molekulová síta
			Srážení
			Zonální tavení
			Frakční krystalizace

1.2.1 EXTRAKCE

Jednou z metod, využívaných k izolaci látek, je extrakce. Principem extrakce je přechod jedné složky mezi dvěma kapalinami, které spolu nejsou mísitelné nebo mezi pevnou fází a kapalinou^[10]. Extrakci je možné provádět jak za horka, tak i za studena a je možné extrahovat malá i větší množství látek^[11]. Jedním z velmi účinných extraktorů je Soxhletův aparát. Ten se používá pro extrakci pevné látky do kapalné a pracuje kontinuálně^{[10] [11]}. Princip Soxhletova extraktoru je znázorněn na obrázku 19 (cit. ^[10]).

Obrázek 19: Soxhletův extraktor (převzato z ^[10])

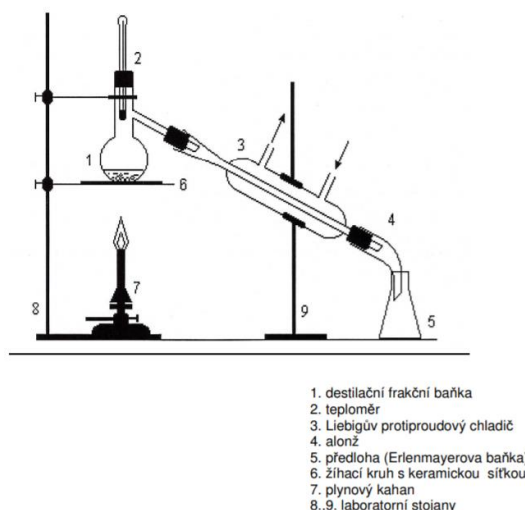
V obrázku 19 je naznačený směr toku par – směrem vzhůru stoupají páry čistého rozpouštědla.

Zahříváním obsahu varné baňky dochází k výparu rozpouštědla, které ve formě par jde širokou trubicí až do chladiče, kde páry kondenzují. Zkondenzované páry následně kapou do těla extraktoru, kde se na uzavřeném dně nachází extrakční patrona, ve které je extrahovaný materiál. Patrona je vyrobena z materiálu, který je porézní, obvykle z papíru. Právě zde dochází k extrakci. Jakmile se dostane množství extraktu do vrcholu U-trubice (přepad extraktoru), odchází postupně extrakt zpět do varné baňky, odkud se proces opakuje znovu. Následně je po ukončení extrakce možné oddestilovat extrakční činidlo a získat tak extrahovanou látku ^[10] ^[11].

1.2.2 DESTILACE

Další ze separačních metod je destilace. Ta se používá k oddělování různých částí směsi na základě rozdílného bodu varu. Jedná se o často využívanou separační metodu právě v organické chemii^[12]. Destilací je několik druhů, pro příklad: prostá destilace, frakční destilace, destilace vodní parou či destilace za sníženého tlaku.

Prostá destilace (obr. 20) se používá v případech, kdy od sebe oddělujeme dvě látky, které mají výrazně odlišnou teplotu varu. Při frakční destilaci naopak oddělujeme látky, které mají teplotu varu málo odlišnou. Zde je možné také použití destilačních kolon. Destilace vodní parou se používá u látek, které jsou málo těkavé a jsou málo nebo vůbec rozpustné ve vodě. Jako poslední uvedená destilace je destilace za sníženého tlaku. Ta se používá v případě, že destilujeme látky, které při standardním tlaku a při varu podstupují nějakou nežádoucí chemickou změnu^[12].

Obrázek 20: Prostá destilace. (převzato z^[17])

1.2.3 CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je jednou z často využívaných separačních metod. Byla objevena roku 1903, kdy ruský botanik M. S. Cvět tuto metodu využil při zkoumání absorpce barviv. Původ názvu chromatografie je v řečtině a napovídá, že by se měla zabývat barevností látek, ale není tomu vždy tak^[2]. U chromatografie nezáleží ani tak na tom, jakou barvu látka má, ale principem je pohyb složek směsi v systému. Systém se skládá ze dvou fází. Z fáze stacionární, tedy nepohyblivé, která může být tvořena pevným nebo kapalným materiálem, a fáze mobilní, tedy pohyblivé, která může být tvořena kapalinou (v tom případě se jedná o chromatografii kapalinovou) nebo může být tvořena plynem (v tom případě se jedná o chromatografii plynovou).^[10]

1.2.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Jedním z typů chromatografií je tenkovrstvá chromatografie nebo také chromatografie na tenké vrstvě. Jedná se o metodu, která je díky své rychlosti, nízké ceně a celkem jednoduchému postupu používána i jako didaktická pomůcka k názorné ukázce principu chromatografie například na středních či vysokých školách při laboratorních cvičeních.

Pro provedení tenkovrstvé chromatografie je potřeba si nejprve připravit vhodný podklad. Nejčastěji je používána destička zhotovená z hliníku, skla či plastové folie. Tato destička může mít různé rozměry. V analytické chemii jsou používány destičky o menších velikostech, například o rozměru 5 x 5 cm až 20 x 20 cm. V preparativním provedení mohou být destičky větší, například 20 x 50 cm.^[10] Na tuto destičku se poté nanáší stacionární fáze,

kteřá může být buď v sypké, nebo fixní formě. V případě použití sypké formy, je sorbent sypaný na destičku a pak skleněnou tyčinkou s gumovými konci rovnoměrně rozvrstven do tenké vrstvy, která pokrývá celou destičku. Na něj se pak nanáší vzorky a spodek destičky, asi 1 cm, se ponoří pod nízkým sklonem tak, aby se stacionární fáze nesesypala do fáze mobilní. V případě použití fixní formy sorbentu (jako pojivo se používá například sádra či škrob), se na destičku nalije tekutá směs, opět se opatrně rozprostře do tenké vrstvy a nechá se na destičce zaschnout. Nejčastěji používanou stacionární fází bývá silikagel nebo oxid hlinitý. Konkrétní postup je popsán v experimentální části práce v kapitole 2.1 níže. Vhodná mobilní fáze je zjišťována experimentálně, současně je pro zjištění vhodné mobilní fáze použit výpočet retardačního faktoru (viz kapitola 1.2.3.2). Zároveň je také možné pro zjednodušení a urychlení postupu při chromatografii stacionární fází, tedy destičky pokryté stacionární fází, zakoupit již hotové a tudíž nám odpadne postup její tvorby.

Samotný postup při tenkovrstvé chromatografii je snadný. Pro zahájení chromatografie je potřeba na destičku se stacionární fází udělat tenkou rýhu, například za použití malé špachtle nebo nože, ve vzdálenosti asi 0,5 až 1 cm od okraje. Tato rýha značí start a právě sem se budou za pomoci předem připravené skleněné kapiláry nanášet malá množství vzorků a standardů. Mezi jednotlivými vzorky je třeba dělat mezery, aby se nám vzorky nespojily dohromady, protože by pak došlo ke zkreslení výsledků. Rozmezí je vhodné přibližně 5 mm. Poté, co jsou naneseny vzorky na start stacionární fáze, si připravíme směs mobilní fáze. Tu připravujeme do nádoby (chromatografické kyvety), kterou je možno po vložení destičky se stacionární fází a vzorky uzavřít, aby nedocházelo k úniku par mobilní fáze, která je těkavá. Jakmile máme připravenou mobilní fází, můžeme vložit destičku se vzorky do chromatografické komory. Destičku ponoříme tak, aby byla rýha, do které jsme nanesli vzorky, nad hladinou. Ihned po vložení destičky nádobu uzavřeme, aby mohla mobilní fáze vzlínat rovnoměrně po celé šířce fáze stacionární. V momentě, kdy mobilní fáze dosáhne téměř horního okraje destičky (cca 0,5 cm pod hranou destičky), vyjmeme destičku a označíme čelo rozpouštědla. Destičku necháme uschnout a poté můžeme detekovat jednotlivé složky. Pokud jsou složky zbarvené, je detekce jednoduchá – proběhne vizuálně. Pokud jsou složky bezbarvé, je potřeba použít činidlo, které zbarvení vyvolá (například 10% H_2SO_4 či I_2 jakožto činidla neselektivní nebo činidla selektivní, jako je ninhydrin pro aminy) ^[10] Po postříkání destičky 10% kyselinou sírovou destičku necháme

lehce zaschnout a pak ji položíme na elektrický vaříč, který následně zapneme. Stopy jednotlivých vzorků se vybarví tak, že organické látky zuhelnatí (zhnědnou). Pokud máme možnost použití vhodného zdroje UV záření, je možné použití stacionární fáze, která obsahuje příměs fluorescenčního indikátoru. Vzorky pak pod UV lampou buď změní barvu fluorescence, anebo ji zhasnou. Toto však vyžaduje možnost zatemnění místnosti.

1.2.3.2 Retardační faktor

Pro výpočet hodnoty retardačního faktoru je potřeba znát vzdálenost, kterou složka urazí od startu (značíme a) a vzdálenost čela rozpouštědla od startu (značíme b). Potom je možné použití vzorce pro výpočet R_F .^[10]

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

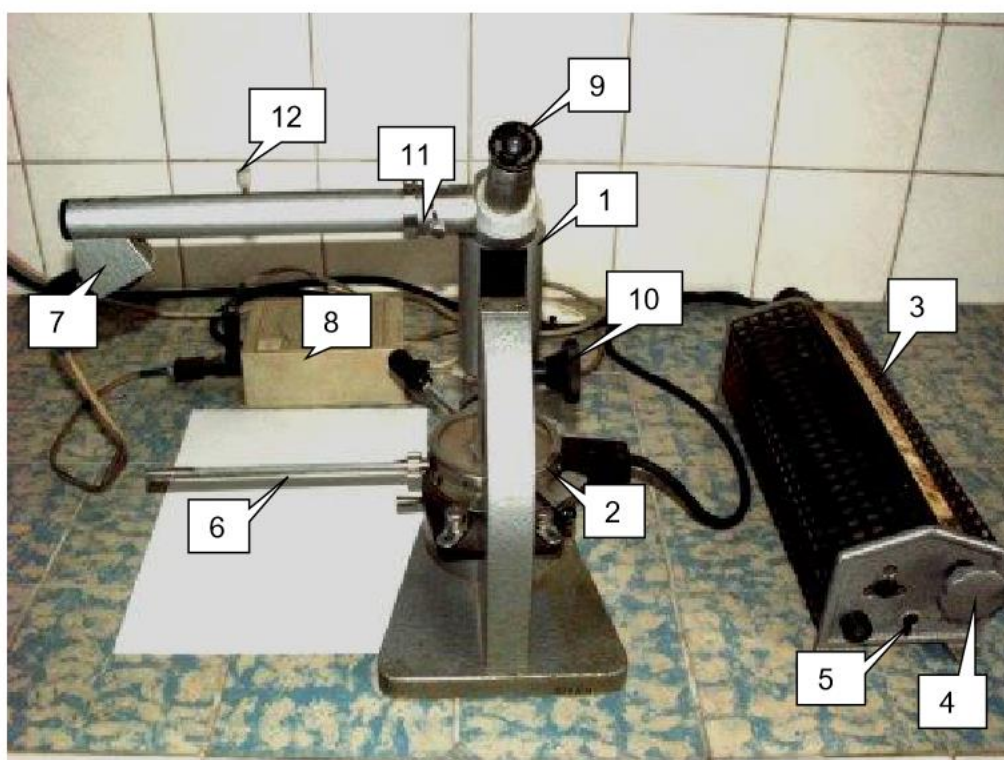
Hodnota retardačního faktoru se pohybuje v intervalu $< 0;1 >$ a jde o bezrozměrnou veličinu. Ideální hodnota R_F je přibližně mezi 0,2 a 0,8.^[10] Pokud je hodnota R_F rovna 0, je potřeba zvolit mobilní fázi, která bude více polární, a naopak.^[2]

1.3 STANOVENÍ TEPLoty TÁNÍ

Teplota tání je jednou ze základních fyzikálních vlastností látky. Každá látka má svoji experimentálně zjištěnou hodnotu teploty tání. Ta se udává jako interval, jeho spodní mez značí teplotu, při které začnou tát první krystalky látky, a horní mez značí teplotu, při které dojde k úplnému roztavení vzorku^[13]. Díky tomu lze také stanovení teploty tání využít jako jednu z variant určení neznámé látky. Další z užitečných funkcí stanovení teploty tání je zjištění, zda je látka čistá nebo znečištěná, protože znečištěné látky mají bod tání nižší, než látka čistá. Také čisté látky mají interval teploty tání velmi úzký, oproti nim látky znečištěné mají rozsah teplot tání větší.

K určení bodu tání látky je možné využít několika postupů. Jednou z prvních možností, která byla objevena, je varianta s použitím tenké kapiláry, která je naplněná vzorkem a propojená s teploměrem. Ta se vloží do vhodné lázně, která dobře vede teplo. Další možností je využití přístroje, který se nazývá bodotávek. Těch existuje vícero druhů, například Thieleho blok. Obecně tyto bodotávky fungují na principu kovového bloku, který je zahříván a na něj se pokládá vzorek. Pro potřeby mikroměřítka tuto funkci dobře plní

Koflerův blok (obr. 21). Jde vlastně o mikroskop, který má stolek napojený na reostat, kterým se ovládá teplota. Na tento stolek je vložen krystal vzorku na podložním skle přikrytý krycím sklem. Na přikrytý vzorek se ještě položí krycí skleněná poklička, která zabraňuje úniku tepla. Zároveň při pohledu do okuláru mikroskopu je vidět na preparát a zároveň na rtuťový teploměr zobrazující teplotu, kterou má vyhříváný stolek. Poté je možné na reostatu postupně pomalu přidávat teplotu. Celou dobu je potřeba postupovat pomalu a opatrně, protože teplota se zvyšuje s určitou setrvačností, takže bychom mohli teplotu tání rychle přesáhnout a měření by bylo nepřesné. Jak už bylo popsáno výše, je třeba si zapsat hodnotu na teploměru, jakmile se začnou hroutit první krystaly, a pak teplotu, kdy roztaje celý vzorek.



Obrázek 21: Bodotávek s mikroskopem – 1. mikroskop, 2. elektricky vyhříváný kovový blok, 3. reostat, 4. klička pro regulaci teploty, 5. vypínač vyhřívání kovového bloku, 6. teploměr, 7. osvětlení teploměru, 8. trafo k napájení osvětlovacích žárovek, 9. okulár, 10. šroub k zaostření mikroskopu, 11. zaostření zobrazení stupnice teploměru, 12. nastavení sledování části stupnice teploměru (převzato z ^[13])

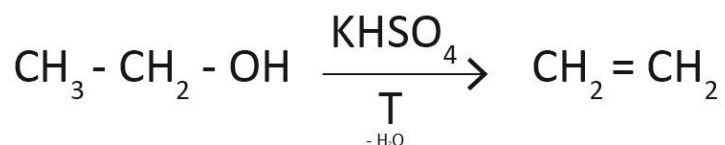
1.4 DEHYDRATACE ALKOHOLŮ

Obecně dehydratace patří mezi eliminační reakce, také mezi kondenzační reakce a znamená zbavení se či snížení obsahu vody. Zároveň tímto procesem vzniká mezi atomy uhlíku násobná vazba. Dehydratační reakce se také dá definovat jako chemická reakce, probíhající mezi dvěma sloučeninami, kdy je jedním z produktů voda. Opakem dehydratace je pak hydratace – reakce s vodou.

K dehydrataci může dojít buď fyzikálně – sušením, anebo chemicky – například koncentrovanou kyselinou sírovou, koncentrovanou kyselinou fosforečnou nebo oxidem hlinitým.

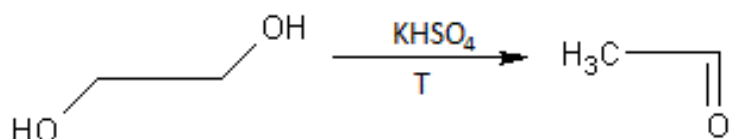
Alkoholy dehydratují na ethery ($2 \text{ R-OH} \rightarrow \text{ROR} + \text{H}_2\text{O}$) nebo na alkeny ($\text{R-CH}_2\text{-CHOH-R} \rightarrow \text{R-CH=CH-R} + \text{H}_2\text{O}$). Alkeny vznikají z alkoholů nejčastěji zahřátím na vyšší teplotu a působením silných kyselin. Tato eliminační reakce probíhá dle Zajcevova pravidla (Zajcevovo pravidlo říká, že při reakci se odštěpuje vodík z atomu uhlíku, který jich má méně a vzniká termodynamicky nejstálější alken). Zároveň může mít dva mechanismy průběhu – E1 a E2, a to v závislosti na tom, o jaký typ alkoholu se jedná. Terciární alkoholy dehydratují dle mechanismu E1 (například terc-butylalkohol, jakožto představitel tohoto typu). Mechanismus E1 má tři kroky. Prvním krokem je protonace hydroxylové skupiny, druhým krokem je odštěpení molekuly vody a vznik karbokationtu a posledním krokem je odštěpení protonu ze sousedícího atomu uhlíku. U mechanismu E2 dochází ke sloučení druhého a třetího kroku, čímž se předejde vzniku celkem nestálého primárního karbokationtu. Snadnost dehydratace je klesající v tomto pořadí: terciární – sekundární – primární. Dehydratace alkoholů tedy začínají u mechanismu E1 i u mechanismu E2 protonací hydroxylové skupiny (to znamená, že se alkoholy chovají jako báze).^[6]

Příkladem dehydratace alkoholů může být tvorba ethenu z ethanolu (obr. 22), acetaldehydu z ethylenglykolu (obr. 23) nebo akroleinu z glycerolu (obr. 24).



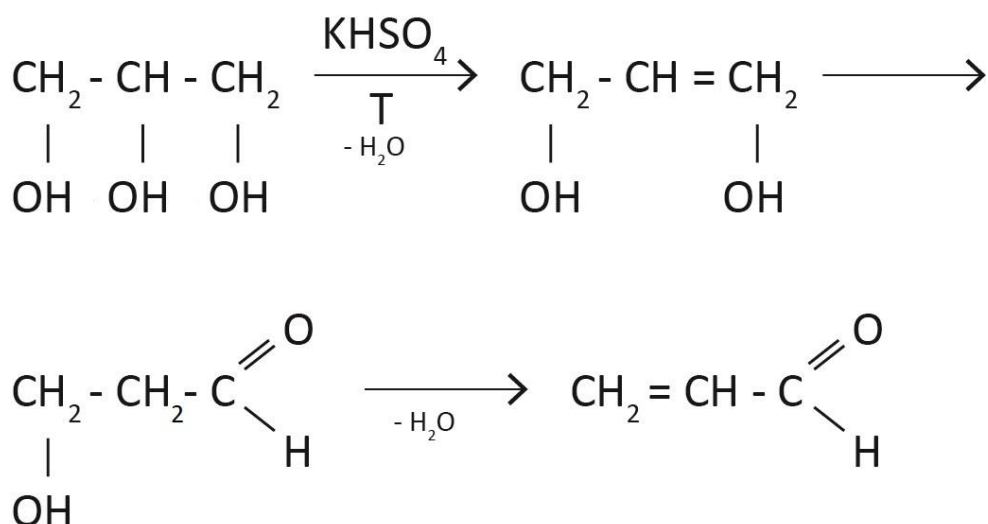
Obrázek 22: Dehydratace ethanolu na ethen

U dehydratace ethanolu dochází k odštěpení jedné molekuly vody za působení KHSO_4 jako katalyzátoru a zároveň za působení zvýšené teploty, kdy z ethanolu rovnou vzniká ethen. Ethen je hořlavý plyn bez barvy s nasládlou vůní. Ethen je možné polymerovat a také použít k výrobě například styrenu.



Obrázek 23: dehydratace ethylenglykolu na acetaldehyd

Dehydratací ethylenglykolu dochází za působení KHSO_4 jako katalyzátoru a zároveň působením zvýšené teploty k odštěpení jedné molekuly vody, čímž vzniká acetaldehyd. Acetaldehyd, jinak také nazývaný aldehyd kyseliny octové nebo ethanal, je látka kapalná, bez barvy, těkává a má štiplavý zápach.



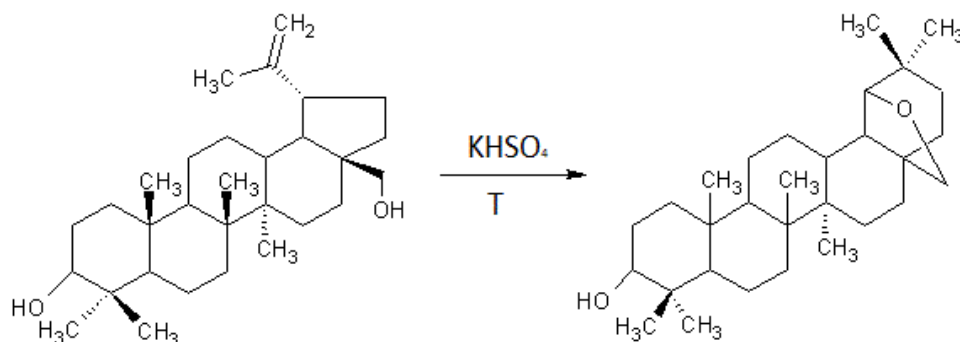
Obrázek 24: Dehydratace glycerolu na akrolein

U dehydratace glycerolu dochází k odštěpení dvou molekul vody za působení KHSO_4 jako katalyzátoru a zároveň za působení zvýšené teploty. Na rozdíl od výše zmíněného ethanolu a ethylenglykolu ale k přeměně nedochází přímo. Při přeměně glycerolu na akrolein dochází k tvorbě dvou meziproduktů. Následně se pak tvoří akrolein, což je bezbarvá až nažloutlá kapalina, která má štiplavý zápach. Je velmi hořlavý a je možné ho polymerovat.

1.5 IZOMERACE KRUHU E A DEHYDRATACE KRUHU A MOLEKULY BETULINU

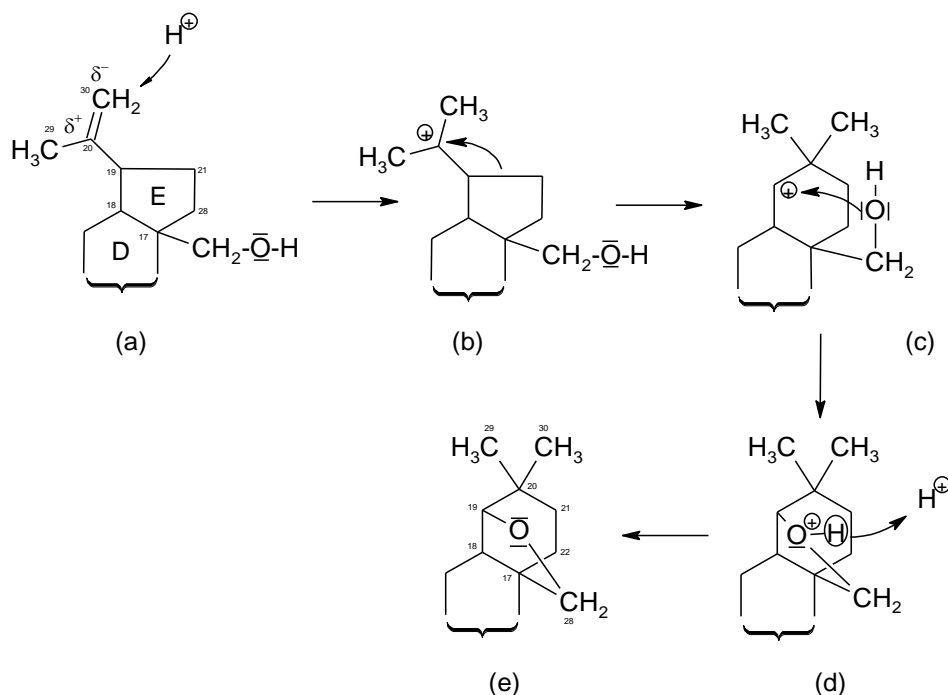
1.5.1 IZOMERACE KRUHU E MOLEKULY BETULINU

Při zahřívání betulinu za nižší teploty v kyselém prostředí dochází k izomeraci kruhu E. Probíhá změna sloučeniny lupeolového typu na sloučeninu oleananového typu. V tomto případě betulin izomeruje na allobetulin (obr. 25).



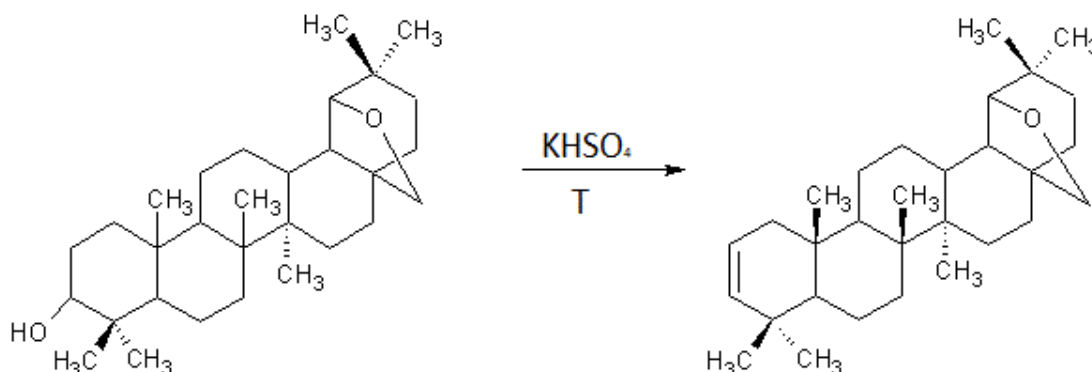
Obrázek 25: Izomerace betulinu na allobetulin

Ve schématu níže (obr. 26) je znázorněn tento detailní postup izomerace: Reakci zahajuje proton, který atakuje atom uhlíku se zvýšenou hustotou elektronů (a), poté následuje tvorba kationtu (b), který izomeruje na kation (c). Ten se stabilizuje tím, že vytvoří vazbu s atomem kyslíku hydroxylové skupiny vázané na uhlík C₂₈ (d) a následným odštěpením protonu, kdy vzniká 19 β ,28 epoxyderivát (e).^[14]

Obrázek 26: Vysvětlení izomerace kruhu E u molekuly betulinu. (Nezkreslená, při reakci nemění se, část molekuly betulinu je zobrazena složenou závorkou) (převzato z ^[14])

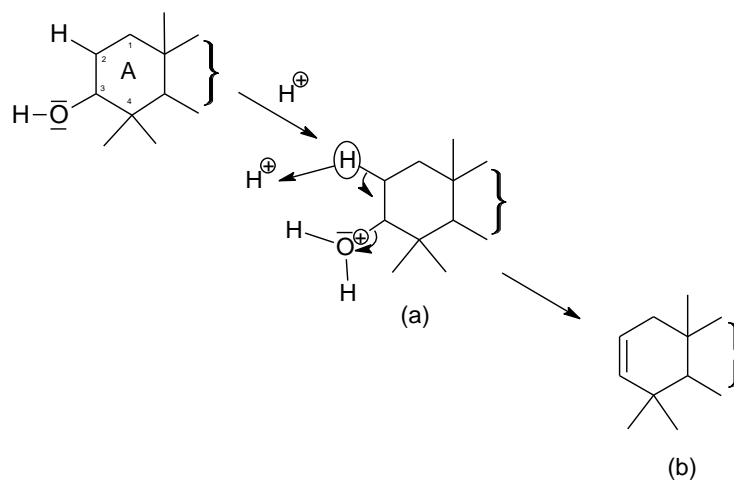
1.5.2 DEHYDRATACE KRUHU A MOLEKULY BETULINU

Při zahřívání betulinu na vyšší teplotu v kyselém prostředí dochází také k dehydrataci kruhu A, jejímž produktem je nenasycená sloučenina – γ -apoallobetulin. Na obr. 27 je zobrazen přechod už z allobetulinu.



Obrázek 27: dehydratace allobetulinu – vznik γ -apoallobetulinu

V tomto prostředí tedy probíhá dehydratace allobetulinu na γ -apoallobetulin takto (obr. 28): Protonizací hydroxylové skupiny, která je vázána na uhlík C₃, vzniká kation (a), který po odštěpení vody a vodíku vázaného na uhlík C₂ ve formě protonu přechází na 2,3 nenasycený systém (b).^[14]



Obrázek 28: Dehydrogenace kruhu A u molekuly allobetulinu. (Nezkreslená, při reakci neměnicí se, část molekuly allobetulinu je zobrazena složenou závorkou) (převzato z ^[14])

Jako vhodné reakční činidlo byl užit hydrogensíran draselný, jelikož se jedná o látku s kyselými a zároveň dehydratačními vlastnostmi. Současně je jeho teplota tání jen o málo nižší než teplota tání čistého betulinu, tudíž lze předpokládat, že se uplatní i jako rozpouštědlo. (t. t. KHSO₄ je 210°C).^[14]

K zahřívání a průběhu reakce – izomerace a dehydratace – byl použit bodotávek Boetius s mikroskopem. Jeho používání a popis je v kapitole 1.3 výše. Samozřejmě je dle možností je možné použití jiného bodotávku. Bylo využíváno komerčních chromatografických desek (dále používán hovorový výraz plastinky) pro provedení tenkovrstvé chromatografie typu DC-Alufolien Kiesselgel 60₂₅₄ od firmy Merck, a také vyrobených přímo v laboratoři litím – viz kapitola 1.2.3.1 výše nebo také kapitola 2.1 níže. K samotné eluci vzorků na plastinkách byl používán n-hexan ve směsi s ethyl-acetátem v různém poměru. Pro detekci pak byla použita 10% kyselina sírová a následně byla plastinka zahřívána na elektrické plotýnce.

Autorka diplomové práce ^[15] Šnaiberková ve své práci prováděla experiment s reakcemi betulinu s KHSO₄. Smyslem experimentů bylo určit vhodné reakční podmínky (konkrétně teplota, poměr a čas zahřívání) pro izomeraci a dehydrataci molekuly betulinu v kyselém prostředí za vzniku γ -apoallobetulinu.

Právě zkoušení a procvičování těchto metod a postupů je obsahem experimentální části této práce (viz kapitola 2).

1.6 POPIS POSTUPŮ A VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE ŠNAIBERKOVÉ^[15]

V prvním experimentu byl použit betulin a hydrogensíran draselný v poměru 1:1. Tato směs byla zkoumána na bodotávku, ve kterém při teplotě 230 – 240°C došlo k úplnému roztátí tohoto vzorku. Ihned po roztátí vzorku byl bodotávek vypnut a směs nechána vychladnout. Vzorek byl označen písmenem K₁. Následovala analytická TLC, směs n-hexanu a ethyl-acetátu byla použita v poměru 5:3. Z chromatogramu, na kterém byl porovnáván vzorek s betulinem a allobetulinem, bylo patrné, že vzorek obsahuje jak betulin, tak allobetulin a zároveň další více pohyblivé látky. ^{[14], [15]}

Druhý experiment pracoval opět se směsí betulinu a KHSO₄ v poměru 1:1. Směs byla na bodotávku zahřívána na 210°C, kdy došlo k roztátí hydrogensíranu draselného a poté i rozpuštění betulinu v roztátém KHSO₄. Následně byla tato směs po dobu 15 minut udržována při teplotě 210 – 215°C. Vzorek byl označen písmenem K₂. Následovala analytická TLC, kde byl opět betulin, allobetulin, vzorek K₁ a vzorek K₂. Směs n-hexanu a ethyl-acetátu byla použita v poměru 5:3. Z chromatogramu bylo zřejmé, že ve vzorku K₂ je

obsažen jak betulin, tak allobetulin, ale v menším množství, než v chromatografii první. Také se znovu ukázalo, že zde byly obsaženy další, více pohyblivé látky. ^{[14], [15]}

Ve třetím experimentu byly podmínky obdobné jako v experimentu druhém, jen s rozdílem, že byla teplota na bodotávku udržována po dobu nikoli 15, ale 25 minut. Vzorek byl označen písmenem K₃. Analytická TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 5:3. Z výsledku bylo zřejmé, že ve vzorku K₃ je obsažen betulin, allobetulin a v největším množství také více pohyblivé látky. ^{[14], [15]}

Následoval pokus číslo 4, kdy ke směsi betulinu a hydrogensíranu draselného používaného ve třech experimentech výše (poměr 1:1), bylo přidáno stejné množství KHSO₄ (tedy poměr 1:2). Tato směs byla opět zahřívána na bodotávku, tentokrát na teplotu 240°C a následně nechána k vychladnutí. Vzorek byl označen písmenem K₄. Pak byla provedena analytická TLC ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 5:3. Z výsledku bylo patrné, že vzorek K₄ obsahoval už pouze látky více pohyblivé než je betulin a allobetulin. ^{[14], [15]}

V pátém experimentu byl porovnáván na analytické TLC, kde byla směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10:3, vzorek K₁, betulin, allobetulin a vzorek K₄. Z chromatografie bylo zřejmé, že se výsledky téměř nelišily, když byl poměr n-hexanu a ethyl-acetátu 5:3. Tedy, ve vzorku K₁ byl obsažen betulin, allobetulin a další více pohyblivá látka a ve vzorku K₄ byly obsaženy pouze více pohyblivé látky, jen ve větším množství, než při poměru 5:3. ^{[14], [15]}

Následně byl vzorek K₄ porovnán s γ -apoallobetulinem. Při TLC byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10:3. Z výsledku bylo zjevné, že vzorek K₄ obsahuje γ -apoallobetulin a další pohyblivější látky – tudíž že všechen obsažený betulin zreagoval. ^{[14], [15]}

Také při srovnání vzorku K₁ a vzorku K₄ bylo vidět, že u vzorku K₄ došlo díky navýšení množství KHSO₄ ve směsi k vyššímu zreagování betulinu a vzniku jeho produktů. ^{[14], [15]}

Dále byla provedena TLC vzorku K₂ a γ -apoallobetulinu, při poměru n-hexanu a ethyl-acetátu 10:3, kdy bylo zjištěno, že se γ -apoallobetulin vyskytuje také v tomto vzorku jako jedna z pohyblivějších látek. ^{[14], [15]}

Nakonec byly na TLC porovnány vzorky K₃ a K₄ spolu s γ -apoallobetulinem a to v poměru n-hexanu a ethyl-acetátu 5:1. Výsledkem bylo zjištění, že v obou vzorcích se

nacházel γ -apoallobetulin, pouze v jiném množství, a také další více pohyblivé látky. Zároveň ve vzorku K_3 byl kromě toho obsažen ještě betulin a allobetulin. ^{[14], [15]}

Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že na reakci betulinu v kyselém prostředí za vyšší teploty má vliv více faktorů:

Množství $KHSO_4$ – v experimentech, kde byl vyšší obsah $KHSO_4$ (poměr 1:2), bylo dosaženo lepších výsledků, než tomu bylo u poměru 1:1.

Čas reakce – bylo zjištěno, že s delším časem došlo k oběma reakcím – izomeraci i dehydrataci betulinu při reakci na bodotávku.

Teplota při reakci – také bylo zjištěno, že je zde vliv teploty na zreagování betulinu v $KHSO_4$. V případě vyšší teploty docházelo oběma reakcím – izomeraci i dehydrataci betulinu.

Poměr n-hexanu a ethyl-acetátu – vyšší výtěžnost produktů při přeměně betulinu.

1.7 CHEMIKÁLIE - ROZPOUŠTĚDLA

Pro správně provedenou chromatografii je potřeba zvolit vhodné rozpouštědlo. Rozpouštědlo je voleno buď experimentální cestou, k tomu jsou ale potřeba zkušenosti laboranta, anebo je možné použít takzvanou eluotropickou řadu.^[2] Rozpouštědla jsou v této řadě uspořádána dle klesající relativní permitivity, a to v tomto pořadí uvedeném v tabulce 3: ^[2]

Rozpouštědlo	Voda	Methanol	Ethanol	Propan-1-ol	Aceton	Ethyl-acetát
pořadí	1	2	3	4	5	6

Diethylester	Chloroform	Benzen	Toluen	Chlorid uhličitý	cyklohexan	Hexan
7	8	9	10	11	12	13

Tabulka 3: eluotropická řada rozpouštědel

Nejvýše uvedená rozpouštědla (voda, methanol,..) jsou používány k vymývání těch složek směsí, které mají vysokou polaritu. Obráceně rozpouštědla uvedená nejnižší (hexan, cyklohexan,..) jsou používány k vymývání méně polárních složek směsí a jsou tedy vhodné k jemnějšímu dělení směsí ^[2].

Rozpouštědla se dělí na ta, která rozpouští polární látky, a na ta, která rozpouští nepolární látky. Použití rozpouštědla je závislé také na selektivitě^[16]. Autor ^[16] také uvádí poučku: Podobné se rozpouští v podobném. Znamená to tedy, že se polarity rozpouštěných látek musí podobat polaritě rozpouštědla. Pokud by byla podobnost velmi malá, hrozí, že se chromatografie nepovede dle předpokladů, protože fáze nebude se vzorkem vzlínat.

Vliv na dobrý průběh chromatografie má taktéž výše (kapitola 1.2.3.2) zmiňovaný retardační faktor R_F ^[16].

Vhodným rozpouštědlem je tedy takové rozpouštědlo, ve kterém je směs, kterou chceme dělit, rozpustná. Zároveň je ale potřeba, aby byl vhodně zvolen také absorbent, protože je nutné, aby na tento absorbent nebyly složky směsi vázány příliš silně, ale ani příliš málo. V případě příliš silného vázání složek směsi by nedocházelo ke vzlínání a složky směsi by zůstaly na startu. Naopak v případě příliš malého vázání by nedošlo k dělení a směs složek by prostupovala v čele rozpouštědel. Nejprospěšnější je tedy případ, kdy jsou složky směsi vázány středně pevně a mohou se tak vhodně uplatnit rozdíly v jejich R_F .^[2]

V této práci je použita jako rozpouštědlo směs n-hexanu s ethyl-acetátem v poměru 10:3, tedy 1 ml n-hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu. Toto množství bylo zvoleno na základě velikosti chromatografické kyvety a velikosti plastinek.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části této práce je popsán postup přípravy plastinek, postup při práci s bodotávkem, postup při chromatografii a výsledky chromatografií produktů tavení vzorků o různém složení a čistotě (vzorky obsahují nejčastěji betulin, allobetulin a γ -apoallobetulin) a jejich interpretace.

Experimentální část této práce sloužila především k procvičování a osvojení si postupů semimikrotechniky při práci v laboratoři a seznámení se s reakcemi a postupy při práci s lupanovými deriváty.

2.1 PŘÍPRAVA PLASTINEK PRO TLC

Jako první bylo nutné si připravit plastinky, které jsou nezbytné pro provedení tenkovrstvé chromatografie. Abych si vše vyzkoušela, nalila jsem nejprve směs připravenou z 20 g silikagelu a asi 48 g destilované vody na velkou skleněnou desku o velikosti 20 x 20 cm. Po nalití kašovité směsi, které probíhalo od středu krouživými pohyby až ke krajům a do rohů, bylo třeba směs rozprostřít po celé ploše desky. To se nejjednodušeji provádí hrdlem baňky, kterou jsem použila na rozmíchání silikagelu ve vodě a jeho nalití na desku. Po tomto rozprostření jsem na desku lehce zespodu poklepala bříšký prstů, aby bylo rozprostření rovnoměrné, odložila jsem desku na rovnou plochu (stůl v laboratoři) a nechala schnout do druhého dne. Nalitá směs na skleněné desce je zobrazena na obrázku 29.



Obrázek 29: plastinka 20 x 20 cm



Obrázek 30: vyrovnaná sklíčka pro nalití směsi



Obrázek 31: plastinky 7,6 x 2,6 cm s nalitou vrstvou silikagelu)

Pro potřeby analytické chromatografie je vhodné zvolit jako stacionární fázi silikagel se sádrou rozmíchaný v destilované vodě rovnoměrně rozprostřený na malých skleněných destičkách o rozměrech 76 x 26 mm v tenké vrstvě. Nejprve jsem si tedy připravila desku skla, na kterou jsem těsně vedle sebe vyskládala skleněná sklíčka omytá destilovanou vodou (obr. 30). Směs jsem následně jako při postupu výše rozmíchala s vodou v baňce. Pro 20 těchto skleněných destiček naskládaných těsně vedle sebe bylo potřeba stejné množství silikagelu, tedy 20 g, jako pro desku 20 x 20 cm. Následně jsem směs opatrně nalila na připravená sklíčka. Poté jsem vrstvu upravila rozprostřením skleněnou tyčinkou s gumovou hadičkou na obou koncích, tím jsem docílila rovnoměrného rozprostření směsi na sklíčkách (obr. 31). Další postupy přípravy stacionární fáze TLC jsou popsány výše v kapitole 1.2.3.1. nebo v literatuře [2].

Protože tato kašovitá směs silikagelu s vodou, i přes to, že je v tenké vrstvě, nějakou dobu schne (v řádu hodin), nechala jsem nalité plastinky položené na stole v laboratoři na vzduchu schnout do druhého dne.

Výhodou vlastní přípravy plastinek je jejich nízká cena, která je zajištěna také tím, že po použití je možné litou vrstvu se vzorky ze sklíčka nebo skleněné desky smýt vodou a připravit si plastinky nové a tento postup opakovat dle potřeby.

Já jsem ale prováděla pokusy v malém počtu a v malém opakování, proto pro moje potřeby byly dostačující hliníkové desky pokryté silikagelem se škrobem od firmy Merck, konkrétně typ DC-Alufohlen Kieselgel 60 F₂₅₄ o rozměrech 20 x 20 cm, ze kterých jsem si mohla odstříhnout nůžkami libovolně velké části podle potřeby.

2.2 TVORBA KAPILÁR

Pro provedení tenkovrstvé chromatografie je potřeba si vytvořit tenké kapiláry ze skleněné trubice. Práce se sklem je jednou z laboratorních prací při předmětu chemické laboratorní metody na katedře chemie fakulty pedagogické v Plzni. Protože zhotovení kapilár není obtížné, je možné jejich přípravu provádět se studenty v laboratoři.

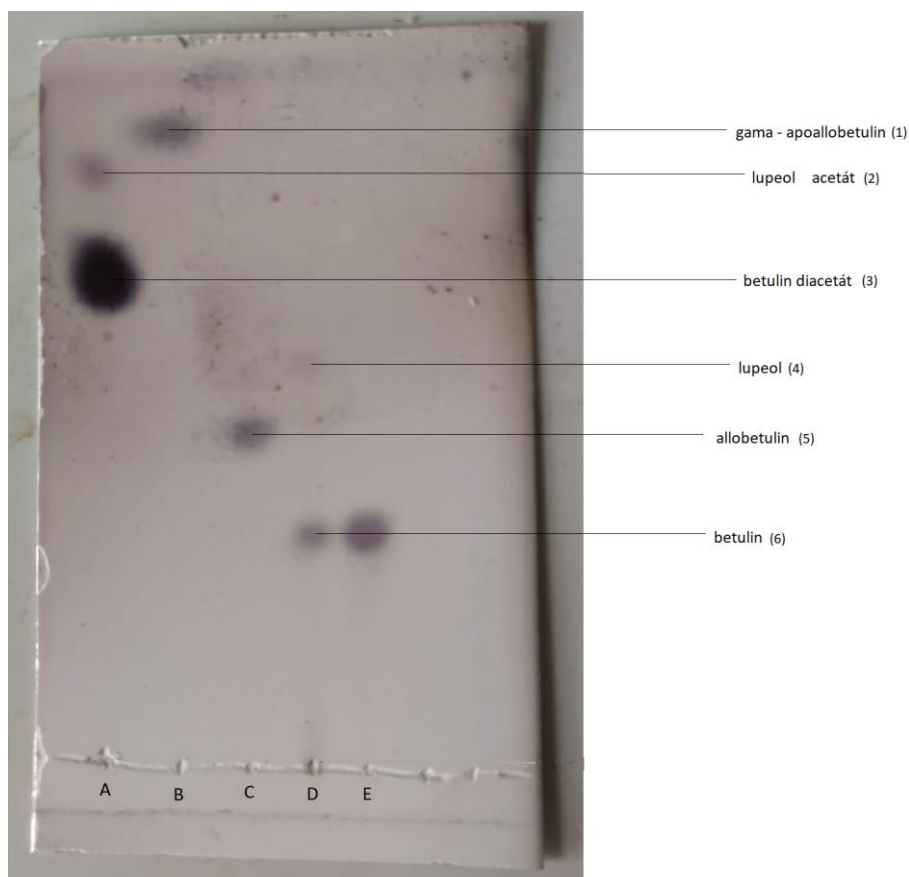
Při výrobě skleněné kapiláry je potřeba pouze plynový kahan a širší skleněná trubice (lze také využít místo skleněné trubice zkumavku). Skleněnou trubici zahříváme v nesvítivé části plamene kahanu a zároveň s trubicí opatrně pozvolna otáčíme, aby se prohřívalo sklo trubice rovnoměrně. Rovnoměrné vyhřátí trubice je důležité pro správné a funkční vytažení kapiláry. Jakmile začne sklo měknout a povrch skleněné trubice je svítivý, vytáhneme trubicí z plamene a provedeme rovnoměrné roztažení v kapiláru. Místa, kde se kapilára rozšiřuje, nařízneme nožkem a odломíme. Takto vytvořené kapiláry lze používat například k nanášení vzorků při tenkovrstvé chromatografii. ^[1]

Obdobným způsobem lze také vytvořit skleněný balónek, který je vhodný k přenášení malého množství kapalin nebo k uchování malého množství kapalin. V případě uchování je potřeba oba konce balónku zatavit. Pro tvorbu skleněného balónku už je ale potřeba větší zručnosti laboranta. Je důležité odhadnout, jak moc sklo vyfouknout, aby stěny nebyly moc tenké a balónek moc křehký. Pevnost balónku je možné vyzkoušet poklepem o desku stolu. Pokud je balónek dobře vytvořený, nepraskne a nerozbije se ^[1].

2.3 PROCVIČOVÁNÍ PROVEDENÍ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRAFIE

Před chromatografií samotných vzorků jsem si pro osvojení a procvičení vyzkoušela chromatografii standardů betulin diacetátu, čistého γ -apoallobetulinu, čistého allobetulinu, surového betulinu a čistého betulinu (obr. 32). Tuto chromatografii jsem provedla několikrát, abych si postup vyzkoušela, ale hlavně proto, abych věděla, jak která látka postupuje rychle či pomalu. To mi následně ulehčilo identifikaci látek obsažených ve vzorcích 1-5 po tavení na bodotávku a po provedení TLC vzorků. Na obrázku 29 je uvedena ona pokusná chromatografie výše popsaných látek. Po provedení této chromatografie jsem zjistila, že vzorek označený jako betulin diacetát obsahuje zároveň další, více pohyblivou látku, pravděpodobně lupeol acetát. Čistý γ -apoallobetulin obsahoval pouze tuto látku. Vzorek allobetulinu byl také zcela čistý. Naopak ve vzorku surového betulinu získaného extrakcí kůry břízy bělokoré ethanolem v Soxhletově extraktoru, u kterého byl předpoklad,

že je znečištěný, se objevily stopy látky pohyblivější, než samotný betulín, pravděpodobně lupeolu a zároveň látek velmi málo pohyblivých. Poslední vzorek obsahující betulín byl čistý.



Obrázek 32: vzorek A: lupeol acetát a betulín diacetát, vzorek B: γ -apoallobetulin, vzorek C: allobetulin, vzorek D: surový extrakt březové kůry, vzorek E: betulín

2.4 JEDNOTLIVÉ TAVENÍ VZORKŮ NA BODOTÁVKU

Cílem tohoto tavení je zjistit, při jakých teplotách a časech tavení dochází k izomeraci kruhu E molekuly betulínu v kyselém prostředí, při jakých teplotách a časech dochází zároveň také k dehydrataci kruhu A molekuly betulínu v kyselém prostředí a za jakých podmínek případně nedochází k reakci molekuly betulínu v kyselém prostředí.

Před samotným tavením vzorku na bodotávku bylo potřeba připravit si směs betulínu a KHSO_4 . Tato směs byla připravována v poměru 1:2, tedy jeden díl betulínu a dva díly hydrogensíranu draselného. KHSO_4 byl použit na základě experimentálního postupu provedeného již dříve ^[14].

Na analytických vahách jsem tedy navážila 50 mg betulínu a 100 mg hydrogensíranu draselného. Protože tato směs nebyla homogenní, bylo potřeba ji rozetřít. Třecí misku jsem použila achátovou. Po rozetření jsem směs přesypala do skleněné lékovky, která byla dobře

uzavíratelná, protože toto množství směsi nebylo spotřebováno všechno pro tuto práci, ale část byla připravena také pro studenty, kteří se účastnili laboratorního cvičení z organické chemie, jehož jedním z úkolů je právě tavení betulinu s KHSO_4 . Takto připravenou směs bylo tedy možno použít k následujícímu zpracování na bodotávku. Obrázek 33 zobrazuje již vzorky po tavení.

2.4.1 VZOREK 1

Pro vzorek číslo 1 byly stanoveny podmínky tavení na bodotávku na 220°C a při dosažení této teploty byl bodotávek vypnut.

Na malé mikroskopické krycí sklíčko byl nanesen špičkou špachtličky předem připravený vzorek směsi, viz výše (2.4). Tato směs byla překryta druhým sklíčkem a vložena na vyhřívaný stolek mikroskopu. Poté byla nastavena teplota na reostatu na 250°C , přičemž byl vzorek kontrolován mikroskopem, společně s růstem teploty. Jakmile teplota dosáhla hodnoty 200°C , na reostatu byla snížena teplota na požadovaných 220°C a po dosažení požadované teploty byl reostat vypnut. Vzorek 1 byl ponechán na bodotávku a chladl, dokud teplota neklesla na 180°C a poté byl sejmout a označen.

2.4.2 VZOREK 2

Pro vzorek číslo 2 byly stanoveny podmínky tavení na bodotávku na 250°C a při dosažení této teploty byl bodotávek vypnut.

Na malé mikroskopické krycí sklíčko byl nanesen špičkou špachtličky předem připravený vzorek směsi, viz výše (2.4). Tato směs byla překryta druhým sklíčkem a vložena na vyhřívaný stolek mikroskopu. Poté byla nastavena teplota na reostatu na 280°C , přičemž byl vzorek kontrolován mikroskopem, společně s růstem teploty. Jakmile teplota dosáhla hodnoty 230°C , na reostatu byla snížena teplota na požadovaných 250°C a po dosažení požadované teploty byl reostat vypnut. Vzorek 2 byl ponechán na bodotávku a chladl, dokud teplota neklesla na 180°C a poté byl sejmout a označen.

2.4.3 VZOREK 3

Pro vzorek číslo 3 byly stanoveny podmínky tavení na bodotávku na 280°C a při dosažení této teploty byl bodotávek vypnut.

Na malé mikroskopické krycí sklíčko byl nanesen špičkou špachtličky předem připravený vzorek směsi, viz výše (2.4). Tato směs byla překryta druhým sklíčkem a vložena

na vyhřívaný stolek mikroskopu. Poté byla nastavena teplota na reostatu na 310°C, přičemž byl vzorek kontrolován mikroskopem, společně s růstem teploty. Jakmile teplota dosáhla hodnoty 260°C, na reostatu byla snížena teplota na požadovaných 280°C a po dosažení požadované teploty byl reostat vypnut. Vzorek 3 byl ponechán na bodotávku a chladl, dokud teplota neklesla na 180°C a poté byl sejmут a označen.

2.4.4 VZOREK 4

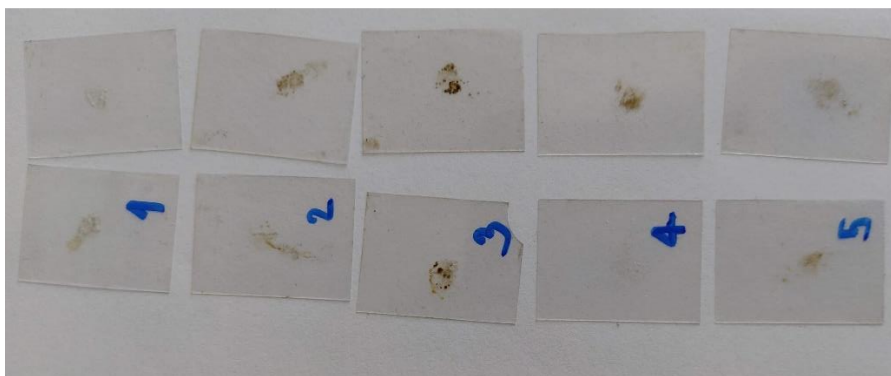
Pro vzorek číslo 4 byly stanoveny podmínky tavení na bodotávku na 190°C a teplota byla udržována v intervalu 188°C – 192°C po dobu 5 minut. Po dosažení této doby tavení v tomto teplotním intervalu byl bodotávek vypnut.

Na malé mikroskopické krycí sklíčko byl nanesen špičkou špachtličky předem připravený vzorek směsi, viz výše (2.4). Tato směs byla překryta druhým sklíčkem a vložena na vyhřívaný stolek mikroskopu. Poté byla nastavena teplota na reostatu na 200°C, přičemž byl vzorek kontrolován mikroskopem, společně s růstem teploty. Jakmile teplota dosáhla hodnoty 170°C, na reostatu byla snížena teplota na požadovaných 190°C a po dosažení požadované teploty byl reostat střídavě vypínán a zapínán po dobu 5 minut a teplota byla udržována v teplotním intervalu od 188°C do 192°C. Vzorek 4 byl ponechán na bodotávku a chladl, dokud teplota neklesla na 180°C a poté byl sejmут a označen.

2.4.5 VZOREK 5

Pro vzorek číslo 5 byly stanoveny podmínky tavení na bodotávku na 210°C a teplota byla udržována v intervalu 208°C – 212°C po dobu 5 minut. Po dosažení této doby tavení v tomto teplotním intervalu byl bodotávek vypnut.

Na malé mikroskopické krycí sklíčko byl nanesen špičkou špachtličky předem připravený vzorek směsi, viz výše (2.4). Tato směs byla překryta druhým sklíčkem a vložena na vyhřívaný stolek mikroskopu. Poté byla nastavena teplota na reostatu na 220°C, přičemž byl vzorek kontrolován mikroskopem, společně s růstem teploty. Jakmile teplota dosáhla hodnoty 190°C, na reostatu byla snížena teplota na požadovaných 210°C a po dosažení požadované teploty byl reostat střídavě vypínán a zapínán po dobu 5 minut a teplota byla udržována v teplotním intervalu od 208°C do 212°C. Vzorek 5 byl ponechán na bodotávku a chladl, dokud teplota neklesla na 180°C a poté byl sejmут a označen.



Obrázek 33: Sklíčka s tavenými vzorky 1-5 po sejmutí z bodotávku

2.5 TLC VZORKŮ

K provedení TLC je předem nutné si připravit kyvetu o vhodné velikosti. Pro potřeby této práce byla využita kyveta o velikosti cca 10 x 5 x 3 cm a jako víčko bylo použito mikroskopické sklo o rozměru 7,6 x 2,6 cm.

Také je potřeba přípravy dostatečného množství kapilár, viz kapitola 2.2 výše. Kapiláry se po použití nevyhazují celé, ale zalomí se kus nad vystoupaním hladiny vzorku v kapiláře. Po zalomení je možné kapiláru znovu používat, je ale nutné si dát pozor na rovnost zalomení, protože když by kraj kapiláry byl příliš nerovný, nemuselo by se nasátí a nanesení vzorku podařit.

Dále je důležité mít vhodná rozpouštědla. Pro tuto práci bylo experimentálně zvoleno jako vhodné rozpouštědlo vzorků pro přenos kapilárou chloroform a jako eluční rozpouštědla byl zvolen n-hexan a ethyl-acetát v poměru 10:3, tedy 1 ml n-hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu. Více viz kapitola 1.8 výše.

Protože se jedná o chromatografii bezbarvých látek, je nezbytné si připravit také 10% roztok kyseliny sírové, kterou je pomocí rozprašovače postříkána chromatografická plastinka, aby se následně při vypálení na elektrickém vaříči zobrazily díky zuhelnatění stopy organických látek. Je tedy potřeba mít také elektrický vaříč, na kterém je po eluci a postříkání plastinky možné vzorek vypálit.

2.5.1 POKUSNÁ TLC

Před provedením chromatografie se získanými vzorky jsem si nejprve vyzkoušela chromatografii na vzorku čistého betulin diacetátu, čistého γ -apoallobetulinu, čistého allobetulinu, surového betulinu a čistého betulinu, abych si nacvičila potřebnou techniku a pokud možno nezkazila chromatografii vzorků po tavení. Více v kapitole 2.3 výše.

2.5.2 TLC VZORKŮ 1-5

Po zkoušce TLC se vzorky standardů bylo možné přistoupit k samotné chromatografii mých vzorků, které jsem získala postupem, který je popsán v kapitole 2.4.

Když jsem oddělila sklíčka, mezi kterými byly vzorky taveny v bodotávku, tak jsem si je seřadila vedle sebe očíslované na papír (obr. 30). Vybrala jsem vždy to sklíčko ze dvou, na kterém bylo roztaveného vzorku více, aby byla chromatografie úspěšná, a z toho jsem pak odebírala vzorek pro chromatografii.

Když jsem měla takto připravená sklíčka se vzorky, ustříhla jsem si z velké desky požadovanou velikost plastinky tak, aby se vešla do kyvety a kyvetu bylo možné přikrýt mikroskopickým sklem. Plastinky byly tedy o velikosti přibližně 3,5 x 6,5 cm. Takto ustřiženou plastinku jsem pomocí hrotu na špachtli připravila pro nanášení vzorků. Ostrým hrotem jsem ve vzdálenosti asi 0,5 cm od okraje udělala rýhu, která ovšem nebyla proříznuta až na hliníkovou fólii, ale pouze mírně zaříznuta do silikagelu. Na této rýze jsem vytvořila přibližně stejně daleko od sebe vrypy dle počtu vzorků, tedy 5 (obr 34).



Obrázek 34: vrypy na rýze v plastince k chromatografii

Následně jsem si otevřela láhev s chloroformem a připravila jsem si do ní označenou dělenou pipetu o objemu 1 ml. Z té jsem nechala jednou rukou vykat téměř všechny chloroform tak, aby se mi dobře nanášela pouze malá kapka na sklíčko prvního vzorku. V momentě, kdy jsem na sklíčko kápla kapku chloroformu, jsem připravenou kapilárou v druhé ruce nasála rozpuštěný vzorek v rozpouštědle. Takto nasátý vzorek jsem přenesla na plastinku do první rýhy a nanasla obsah kapiláry. Stejně jsem postupovala také se zbylými 4 vzorky.

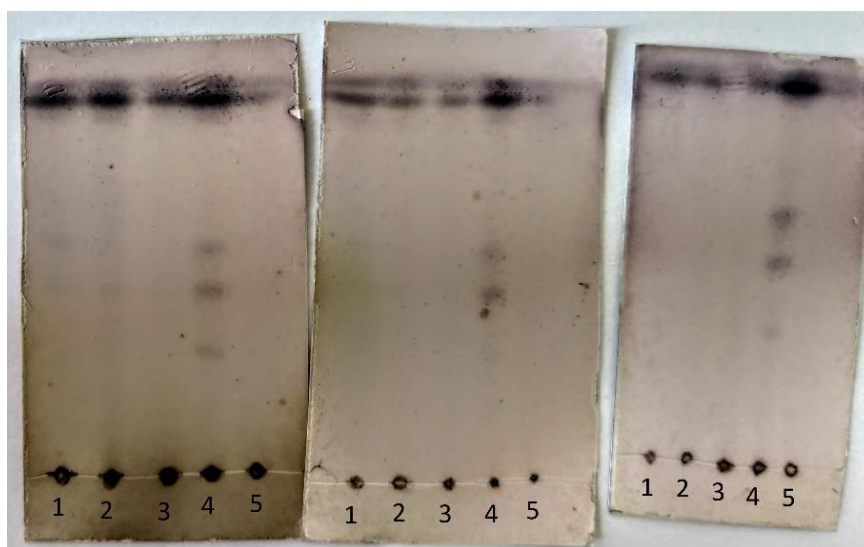
Poté jsem si do kyvety připravila směs rozpouštědel. Opět jsem si do zásobních lahví vložila označené dělené pipety, do n-hexanu 2 ml pipetu a do ethyl-acetátu 1 ml pipetu. Těmito pipetami jsem přenesla do kyvety rozpouštědla, 1 ml n-hexanu a 0,3 ml ethyl-

acetátu. Do této směsi jsem po promíchání ihned vložila plastinku s nanesenými vzorky a přikryla jsem kyvetu mikroskopickým sklem (obr. 35).



Obrázek 35: kyveta s plastinkou a eluce rozpouštědla

Jakmile bylo čelo rozpouštědla asi 0,5 cm pod okrajem plastinky, vyjmula jsem ji a ihned jsem ji přenesla do digestoře, kde jsem ji rovnoměrně postříkala 10% kyselinou sírovou. Je důležité, aby byla plastinka pokryta důkladně celá roztokem kyseliny, ale je potřeba odhadnout přiměřené množství. V případě velkého množství kyseliny následně při vypalování může dojít k popraskání silikagelu. Po rovnoměrném postříkání plastinky jsem ji přenesla pomocí pinzety na elektrický vaříč, který byl studený, a zapnula jsem vyhřívání. Za malou chvíli se začaly objevovat stopy jednotlivých vzorků (obr. 36). Zde je také potřeba včas sejmout plastinku z vaříče, jinak může dojít k jejímu zčernání a chromatografie by byla nečitelná a tím pádem neúspěšná.



Obrázek 36: chromatografie vzorků 1-5

Chromatografii jednotlivých vzorků jsem provedla 3x, protože první pokus, který se nachází uprostřed obrázku 36, se mi zdál málo čitelný. U druhého pokusu (vpravo na obrázku 36) už jsem byla více spokojená a pro jistotu jsem provedla ještě třetí pokus (vlevo na obrázku 36), který se mi zdál nejlépe čitelný a proto byl použit ve srovnávání v kapitole 2.5.3 níže.

Z těchto chromatografií mých pěti vzorků je patrné, že ve všech případech jsou nejvíce zastoupeny více pohyblivé látky. Ze získaných znalostí^[11] jsem očekávala, že jde o γ -apoallobetulin. Dále je ve vzorku 4 možné zaznamenat obsah tří méně pohyblivých látek. Dle získaných znalostí^[11] je pravděpodobné, že se jedná o betulin, allobetulin a další pohyblivější látku. Také ve vzorku 1 a 2 je lehce patrná stopa méně pohyblivých látek.

Pro zjištění o jaké látce se jedná, byl použit vzorek číslo 4, protože v něm je dobře patrné, že obsahuje více různě pohyblivých látek. Proto byla v kapitole 2.5.3 níže provedena chromatografie vzorku 4 společně se standardy betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu.

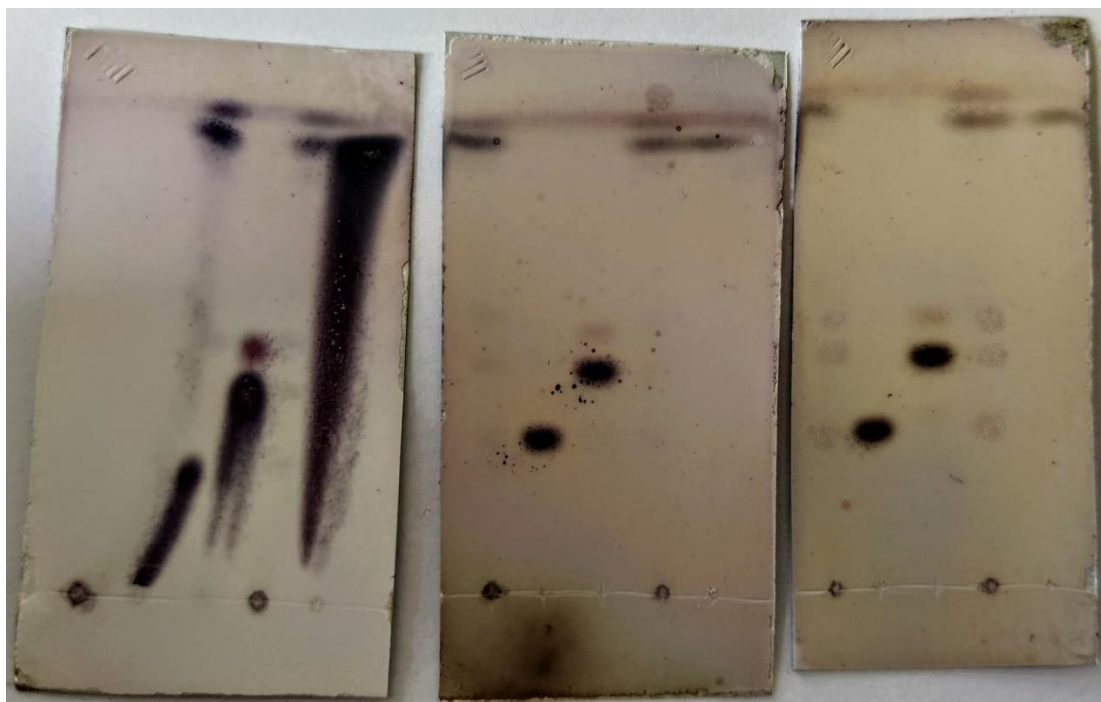
2.5.3 TLC VZORKU 4 SE STANDARDY BETULINU, ALLOBETULINU A γ -APOALLOBETULINU

Po provedení chromatografií všech pěti získaných vzorků a po výběru vzorku, na kterém je hezky viditelná stopa více různě pohyblivých látek, jsem přistoupila k chromatografii se standardy látek betulinu, allobetulinu a γ -apoallobetulinu.

Podrobný postup přípravy kyvety s rozpouštědly, přípravy vrypů na plastince a postup nanášení vzorků pomocí kapilár je popsán v kapitole 2.5.2 výše. Tento postup jsem použila také u TLC vzorku 4 společně se standardy.

Nejprve jsem si nanesla na první místo na plastince vzorek 4, další byl standard betulinu, poté standard allobetulinu, pak jsem nanesla opět vzorek 4, aby se dal lépe porovnávat se standardy, a nakonec standard γ -apoallobetulinu.

Takto připravenou plastinku jsem opět přesunula do připravené kyvety s rozpouštědly, přikryla jsem kyvetu mikroskopickým sklem a nechala vyvíjet. Jakmile bylo čelo rozpouštědla asi 0,5 cm pod okrajem plástěnky, vyjmula jsem ji a hned jsem ji pomocí pinzety přenesla do digestoře k postříkání 10% kyselinou sírovou. Po postříkání kyselinou jsem plastinku přenesla na elektrický vařič a vypálila jsem ji. Organické látky zuhelnatěly, a tak byly jejich stopy viditelné.



Obrázek 37: TLC 1- vzorek 4, 2 – standard betulinu, 3 – standard allobetulinu, 4 – vzorek 4, 5 – standard γ -apoallobetulinu

Z obrázku 37 je vidět, že při prvním pokusu (vlevo) o provedení TLC vzorků došlo k nerovnoměrnému vzlínání rozpouštědla a vzorky se jakoby svezly k jedné straně. Tento pokus byl zároveň špatně proveden z toho důvodu, že bylo nanášeno moc velké množství standardních látek, takže došlo k jejich zuhelnatění při vypalování velmi brzy a vzorek 4 nestihl dostatečně ztmavnout. I přes tyto chyby je ale na první plastince vlevo vidět, že ve vzorku 4 je obsažen betulin (standard betulinu se nachází na 2. místě), allobetulin (standard allobetulinu se nachází na 3. místě) γ -apoallobetulin (standard γ -apoallobetulinu se nachází na 5. místě) a také látka, která je na 3. místě spolu s allobetulinem, ale je více pohyblivá. (Tato látka se nachází také ve vzorku 4.) Také je vidět, že se ve vzorku nachází látky, které jsou velmi málo pohyblivé a zůstaly na startu (pravděpodobně jde o kyselinu betulinovou a kyselinu oleanolovou). Při druhém pokusu (uprostřed) už byl výsledek lepší – nanášené standardy jsou v nižší koncentraci, tudíž uhelnatěly látky na plastince podobným tempem. I přes to jsou zde ale chyby - plastinka byla ponechána na vařiči déle, a tak začala na spodu černat. Zároveň jsou na plastince drobné tečky způsobené zřejmě špatným pokrytím roztokem kyseliny sírové. Byl tedy proveden ještě třetí pokus (vpravo), který vyšel nejlépe, a proto byl použit v porovnání a zhodnocení v kapitole 2.6 níže. Jsou zde dobře vidět stopy vzorku 4, a také jsou nanášeny standardy ve vhodné koncentraci, takže všechny vzorky uhelnatěly podobným tempem.

2.6 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ TLC JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ

Dle výsledků tenkovrstvé chromatografie je možné zhodnotit, při jakých podmínkách dochází k izomeraci kruhu E a kdy dochází zároveň i dehydrataci kruhu A.

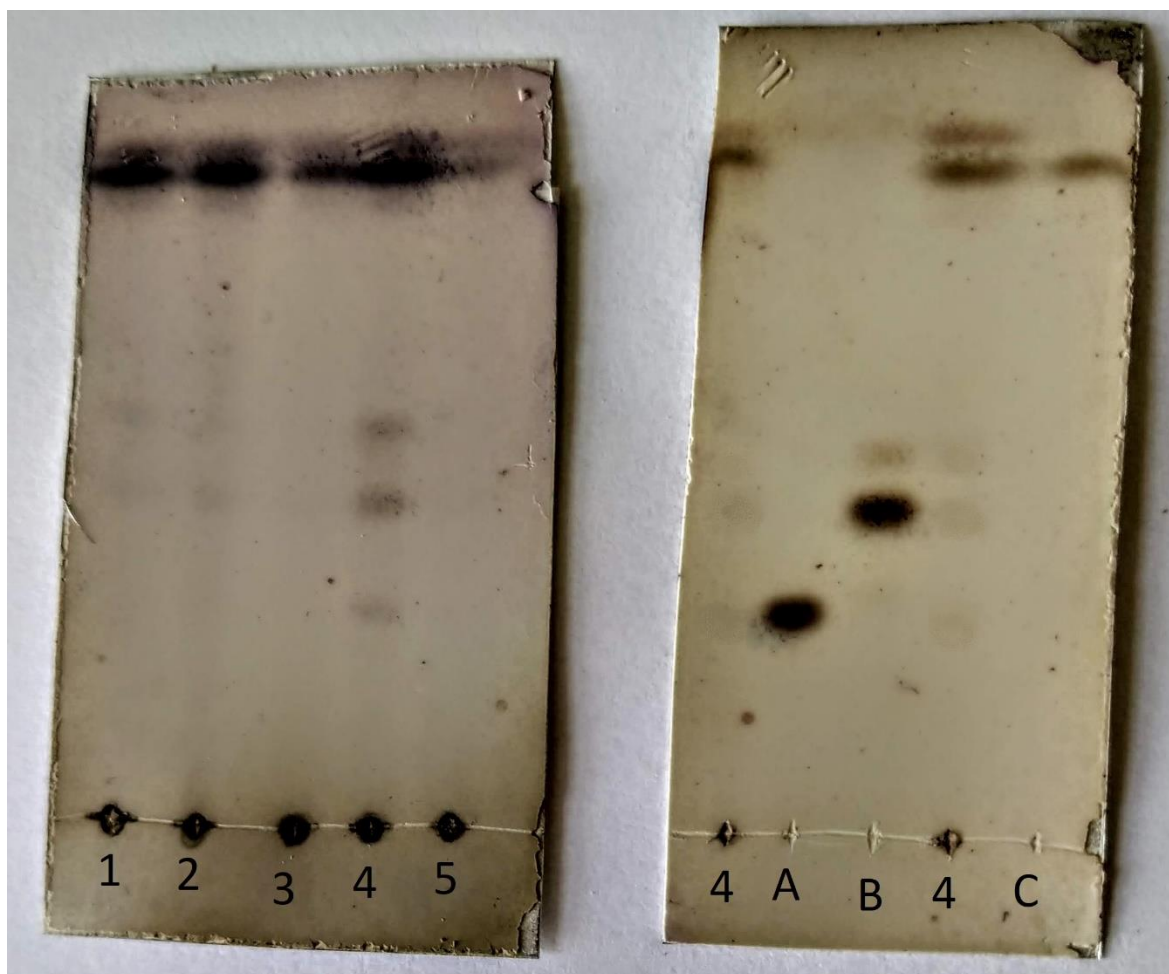
V případě prvního vzorku, který byl taven při 220°C, a poté byl bodotávek hned vypnut, došlo u většiny vzorku k izomeraci kruhu E a zároveň k dehydrataci kruhu A molekuly betulinu, tedy, že se přeměnil betulin na γ -apoallobetulin. Zároveň ale vzorek 1 obsahuje malý podíl allobetulinu, to znamená, že došlo pouze k izomeraci kruhu E. Také se zde objevuje látka pohyblivější než allobetulin, pravděpodobně lupeol. Betulin, který byl obsažen ve vzorku před začátkem tavení, se ve vzorku 1 dle chromatografie nevyskytuje vůbec.

U vzorku 2, který byl taven při 250°C, a poté byl bodotávek hned vypnut, nastaly změny velmi podobné, jako u vzorku 1. Rozdílem bylo pouze to, že allobetulin a lupeol byly zastoupeny ve vzorku 2 méně, než tomu bylo u vzorku 1 a betulin se zde opět nevyskytoval.

Vzorek 3 byl taven při teplotě 280°C a poté byl bodotávek hned vypnut. Zde už byla teplota tak vysoká, že i přes to, že byl vzorek zahříván krátce, došlo jak k izomeraci kruhu E, tak k dehydrataci kruhu A dle chromatografie všeho obsaženého betulinu ve vzorku na γ -apoallobetulin.

Vzorek 4 byl pro tuto práci nejzajímavější, protože se v něm vyskytovaly dobře viditelně všechny zkoumané látky. Tento vzorek byl zahříván na teplotu 190°C, ale tato teplota byla udržována v intervalu od 188°C do 192°C po dobu 5 minut. Jak je vidět z chromatografie, došlo zde jak k izomeraci kruhu E, tak k dehydrataci kruhu A, tudíž k vzniku γ -apoallobetulinu, ovšem ne z celého vzorku. Je tu tedy obsažen allobetulin, který vzniká pouze izomerací kruhu E, lupeol a také betulin, který byl obsažen v počáteční směsi jako výchozí látka.

U vzorku číslo 5 byla teplota stanovena na 210°C a tato teplota, stejně jako u vzorku 4, byla udržována také po dobu 5 minut v intervalu od 208°C do 212°C. Z chromatografie lze vidět, že u vzorku 5 došlo k izomeraci kruhu E a k dehydrataci kruhu A u celého vzorku, tedy, že se všechny betulin, jakožto výchozí látka, přeměnil na γ -apoallobetulin.



Obrázek 38: Plastinka vpravo: 1 – vzorek 1, 2 – vzorek 2, 3 – vzorek 3, 4 – vzorek 4, 5 – vzorek 5; plastinka vlevo: 4 – vzorek 4, A – standard betulinu, B – standard allobetulinu, 4 – vzorek 4, C – standard γ -apoallobetulinu

Na obrázku 38 jsou vedle sebe zobrazeny dvě plastinky. Na plastince vlevo jsou chromatografie jednotlivých vzorků 1 - 5, které jsem tavila spolu s KHSO_4 na bodotávku. Na plastince vpravo jsou zleva: 4 – vzorek 4, který byl dle mého úsudku nejzajímavější, protože obsahoval více různě pohyblivých látek, dále A – standard betulinu, B – standard allobetulinu, opět 4, pro lepší čitelnost – vzorek 4 a C – standard γ -apoallobetulinu.

2.7 PROTOKOLY STUDENTŮ VYTVOŘENÉ V RÁMCI LABORATORNÍCH CVIČENÍ Z ORGANICKÉ CHEMIE

Jak jsem již uvedla, při laboratorních cvičeních z organické chemie se na katedře chemie fakulty pedagogické věnuje jeden den cvičení izolaci přírodních látek, tedy i betulinu. Součástí cvičení z důvodu procvičení práce s bodotávkem a chromatografie na tenké vrstvě je zařazena i reakce betulinu s hydrogensíranem draselným včetně chromatografického zhodnocení výsledků experimentu.

Díky tomu bylo možné získat vypracované protokoly od studentů tohoto předmětu a použít je v této práci jako další vzorky získané postupy popsány výše.

2.7.1 VZOREK A

Z protokolu první studentky jsem zjistila, že podmínky zpracování vzorku byly: Zahřát betulin s KHSO_4 v poměru 1:2 na teplotu 212°C a při dosažení této teploty bodotávek vypnout a při poklesu teploty na 200°C vzorek z bodotávku sejmout.

Po provedení těchto úkonů byla realizována tenkovrstvá chromatografie, jejíž postup je popsán v kapitole 1.2.3 a 2.3 výše. Jako chromatografické rozpouštědlo byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10:3.

Jakmile byla provedena chromatografie a plastinka byla postříkána 10% kyselinou sírovou a vypálena na elektrickém vařiči, bylo možné vyčíst její výsledek.

Dle výsledné chromatografie bylo zjištěno, že takto nastavené podmínky tavení betulinu s KHSO_4 vedly k izomeraci kruhu E molekuly betulinu, ale také k dehydrataci kruhu A molekuly betulinu. Tedy, že se ve vzorku A nachází největší množství γ -apoallobetulinu, který vzniká právě izomerací a dehydratací molekuly betulinu, ale zároveň jsou zde ještě stopy allobetulinu, u kterého došlo pouze k izomeraci kruhu E, a také stopy betulinu, u kterého nedošlo k žádné reakci.

2.7.2 VZOREK B

Podmínky nastavené v protokolu druhého studenta byly následující: Zahřát betulin s KHSO_4 v poměru 1:2 na teplotu $245 - 250^\circ\text{C}$ a tento teplotní interval udržovat po dobu 5 minut. Po uplynutí tohoto času bodotávek vypnout a při poklesu teploty na 220°C vzorek z bodotávku sejmout.

Poté byla chromatografie prováděna jako u vzorku A s chromatografickým rozpouštědlem o stejném poměru stejných látek. Následně byla vypálena po postříkání 10% kyselinou sírovou na elektrickém vařiči.

Dle výsledné chromatografie bylo patrné, že tyto podmínky tavení vedly k izomeraci kruhu E a zároveň k dehydrataci kruhu A molekuly betulinu. Tedy, že se ve vzorku B nachází po tavení již jen γ -apoallobetulin.

2.7.3 VZOREK C

Třetí studentka měla v protokolu podmínky pro tavení betulinu s KHSO_4 stanoveny takto: Zahřívat tuto směs v poměru 1:2 na teplotu 195-200°C po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby bodotávek vypnout a při poklesu teploty na 180°C vzorek z bodotávku sejmout.

Chromatografie byla provedena stejně jako u vzorku A a B s použitím stejných rozpouštědel ve stejném poměru. Následně byla plastinka opět postříkána 10% kyselinou sírovou a vypálena na elektrickém vařiči.

Z výsledku chromatografie bylo patrné, že tyto podmínky tavení vedly opět, obdobně jako u vzorku A, k izomeraci kruhu E i k dehydrataci kruhu A. Látky obsažené v tomto vzorku – γ -apoallobetulin, allobetulin a betulin byly obsaženy v podobném poměru.

2.7.4 VZOREK D

Tato studentka měla ve svém protokolu reakční podmínky stejné, jako jsem měla já u vzorku 2, tedy: Zahřát betulin s KHSO_4 v poměru 1:2 na teplotu 250°C a poté bodotávek vypnout. Poté při poklesu teploty na 180°C vzorek z bodotávku sejmout.

Chromatografie byla opět provedena stejně jako u vzorků výše.

Výsledky této chromatografie byly shodné s výsledky chromatografie, kterou jsem prováděla se vzorkem 2 v kapitole 2.4.2, tedy, že došlo ve většině vzorku k izomeraci kruhu E i k dehydrataci kruhu A molekuly betulinu a vznikl γ -apoallobetulin. V tomto i v mém vzorku se ale objevily slabé stopy méně pohyblivých látek, tedy betulinu a allobetulinu.

2.7.5 VZOREK E

V posledním protokolu měla další studentka podmínky pro tavení betulinu s KHSO_4 v poměru 1:2 tyto: Zahřívat tuto směs na teplotní interval 175 – 180°C po dobu 5 minut. Následně bodotávek vypnout a vzorek sejmout.

Chromatografie byla provedena stejným způsobem jako u vzorků výše.

Takto nastavené reakční podmínky vedly k výsledkům podobným jako v případě mého vzorku 4 v kapitole 2.4.4, protože jsou tyto reakční podmínky téměř stejné. Rozdílem je to, že já jsem směs zahřívala na teplotu o 10°C vyšší než tomu bylo u vzorku E.

Výsledkem této chromatografie bylo, že došlo k izomeraci kruhu E a zároveň k dehydrataci kruhu A molekuly betulinu, tedy vzniku γ -apoallobetulinu a to v množství větším, než dalších méně pohyblivých látek, které byly v tomto vzorku také obsaženy – allobetulinu a betulinu.

ZÁVĚR

Tato práce je tematicky zaměřena na reakce přírodních látek patřících mezi triterpeny. Konkrétně jsem se zabývala tavením betulinu, obsaženého v kůře břízy bělokoré, společně s hydrogensíranem draselným.

V teoretické části jsem se zabývala klasifikací isoprenoidů a stručným popisem jejich vlastností a použití. Zároveň je zde podrobnější popis metod, které byly následně používány v části praktické. Také je zde popsána přeměna, ke které dochází u molekuly betulinu při tavení v kyselém prostředí – izomerace kruhu E a dehydratace kruhu A. Teoretická část také obsahuje výsledky tavení z diplomové práce^[15], která byla vytvořena na katedře chemie fakulty pedagogické Západočeské univerzity. Postup v této práci byl dle literatury prováděn také v této práci v praktické části (kapitola 2).

Stěžejním bodem této práce je bezpochyby chromatografie. Tato metoda je využívána ke zjištění obsahu látek v jednotlivých vzorcích. Vzhledem k tomu, že jde o metodu, která je bezpečná, rychlá a vcelku jednoduchá, je možné ji provádět opakovaně a také je možné ji použít jako pokus při vyučování studentů.

V praktické části je popsán postup provedení tavení vzorků na bodotávku a poté jejich následná chromatografie. Popis a zhodnocení chromatografie je v kapitole 2.5. Také je v praktické části zahrnuto zhodnocení protokolů získaných od studentů oboru chemie na katedře chemie fakulty pedagogické Západočeské univerzity, pro doplnění výsledků.

Jak z mých výsledků zpracování směsi betulinu s KHSO_4 , tak z výsledků této reakce získaných od studentů vyplývá, že za nižší teploty je zachytitelný jak nezreagovaný betulin, tak izomerací vzniklý allobetulin. Ve všech případech je zjišťována i přítomnost γ -apoallobetulinu, jehož množství stoupá se zvyšující se teplotou a prodlužováním reakční doby. Patrné je to u vzorku číslo 2, kde teplota zahřívání způsobuje převážně vznik γ -apoallobetulinu.

V budoucnu by mohla být zajímavá úprava reakce pro preparativní využití.

Tato práce pro mě byla přínosem, protože při studiu pedagogické fakulty je pro mě důležité získávat inspiraci a vědomosti, které pak budu schopna předávat srozumitelně dále v mé budoucí profesi. Vzhledem k tomu, že téma triterpenoidních sloučenin je na katedře chemie FPE ZČU historicky dlouhodobě studováno, je zde prostor pro další rozvíjení v mé případné diplomové práci.

RESUMÉ

Tato práce je rozdělena na dvě části – část teoretickou a část praktickou. V teoretické části práce je stručně popsána klasifikace isoprenoidů. Dále se v této části práce nachází popis použitých laboratorních metod, jako je destilace, extrakce, tenkovrstvá chromatografie či stanovení bodu tání a lití chromatografických desek. Také je zde popis izomerace kruhu E a dehydratace kruhu A molekuly betulinu.

V experimentální části je popsána vlastní práce s betulinem a jeho tavení s KHSO_4 za použití laboratorních metod popsanych v teoretické části. Výsledky tavení jsou zde poté hodnoceny dle vzniklých produktů – tedy allobetulinu a γ -apoallobetulinu.

This thesis is divided into two parts. Theoretical part and experimental part. In theoretical part is briefly described the classification of isoprenoids. This part contains used laboratory methods, as distillation, extraction, thin-layer chromatography, determination of the melting point and pouring of chromatographic plates. Also there is description of isomerization of ring E and dehydration of ring A of the betulin molecule.

In experimental part is description of my own work with betulin and his melting with KHSO_4 . Also there are used laboratory methods described in theoretical part. Melting results are there evaluated according to the products – thus allobetulin and γ -apoallobetulin.

SEZNAM LITERATURY

1. KLINOTOVÁ E., KLINOT J., MÁČA B., TRNKA T., VŠETEČKA V.: *Základní cvičení z organické chemie*. Skripta Přírodovědecké fakulty UK v Praze, Praha 1980.
2. RICHTR V., KRAITR M.: *Tenkvrstvá chromatografie ve výuce*. Sborník katedry chemie ZČU, Plzeň 2004.
3. VAŠMUCIUS V.: *Přehled reakcí triterpenoidních sloučenin*. Plzeň 1995. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni.
4. MCMURRY J.: *Organická chemie*. VUTIUM, Brno 2015. ISBN 978-80-214-4769-1.
5. PACÁK J.: *Stručné základy organické chemie*. SNTL, Praha 1978.
6. TRNKA T.: *Organická chemie pro posluchače nechemických oborů*. Karolinum, Praha 2002. ISBN 80-246-0561-9.
7. *Betulinines: Triterpeny* [online]. [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>
8. *Nutraceutika* [online]. [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~schulzov/Nutraceutika%20a%20FP/NUTRACEUTIKA_ostatni.pdf
9. DZUBAK P., HAJDUCH M., VYDRA D., HUSTOVA A., KVASNICA M., BIEDERMANN D., MARKOVA L., URBAN M., SAREK J.: *Nat. Prod. Rep.* 23, 394 (2006)
10. ZÁRUBA K.: *Analytická chemie*. VŠCHT Praha, Praha 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
11. RICHTR V.: *Semimikrotechnika v organické chemii*. FPE ZČU v Plzni, Plzeň 1993. ISBN 80-7043-066-4.
12. CÍDLOVÁ H.: *Laboratorní technika: Destilace* [online]. [cit. 2020-05-21]. Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, Brno 2008. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/destilace.html>
13. RICHTR V., RAJGLOVÁ J.: *Využití bodotávku s mikroskopem v experimentální výuce katedry chemie FPE ZČU v Plzni*, Sborník prací společné vědeckovýzkumné činnosti studentů a učitelů katedry chemie, FPE ZČU v Plzni, Plzeň 2005. ISBN 80-7020-153-3
14. RICHTR V., ŠTROFOVÁ J., CÍDLOVÁ H., KRAITR M.: Dosud nepublikováno

-
15. ŠNAIBERKOVÁ M.: *Netradiční experimenty z organické chemie v experimentální přípravě učitelů chemie*. Plzeň 2015. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni.
 16. MIKEŠ O. a kol.: *Laboratorní chromatografické metody*. SNTL, Praha 1980.
 17. *Prostá destilace* [online]. [cit. 2020-07-25]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech-old/soubory/ulohy/10destil.pdf>

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obrázek 1: betulin, lupeol, kyselina betulínová, kyselina oleanolová, (podle ^[2]).....	3
Obrázek 2: lupan (vlastní zpracování podle ^[3]).....	4
Obrázek 3: oleanan (vlastní zpracování podle ^[3]).....	4
Obrázek 4: ursan (vlastní zpracování podle ^[3]).....	5
Obrázek 5: 2-methylbuta-1,3-dien.....	6
Obrázek 6: α -pinen Obrázek 7: limonen.....	7
Obrázek 8: menthol	8
Obrázek 9: humulen.....	8
Obrázek 10: kyselina abscisová.....	8
Obrázek 11: fytol.....	9
Obrázek 12: vitamin A	9
Obrázek 13: Skvalen.....	10
Obrázek 14: kyselina oleanolová.....	10
Obrázek 15: betulin	10
Obrázek 16: β -karoten	11
Obrázek 17: gutaperča Obrázek 18: kaučuk	11
Obrázek 19: Soxhletův extraktor (převzato z ^[10])	12
Obrázek 20: Prostá destilace. (převzato z ^[17]).....	14
Obrázek 21: Bodotávek s mikroskopem – 1. mikroskop, 2. elektricky vyhříváný kovový blok, 3. reostat, 4. klička pro regulaci teploty, 5. vypínač vyhřívání kovového bloku, 6. teploměr, 7. osvětlení teploměru, 8. trafo k napájení osvětlovacích žárovek, 9. okulár, 10. šroub k zaostření mikroskopu, 11. zaostření zobrazení stupnice teploměru, 12. nastavení sledování části stupnice teploměru (převzato z ^[13]).....	17
Obrázek 22: Dehydratace ethanolu na ethen	18
Obrázek 23: dehydratace ethylenglykolu na acetaldehyd	19
Obrázek 24: Dehydratace glycerolu na akrolein	19
Obrázek 25: Izomerace betulínu na allobetulin.....	20
Obrázek 26: Vysvětlení izomerace kruhu E u molekuly betulínu. (Nezkreslená, při reakci nemění se, část molekuly betulínu je zobrazena složenou závorkou) (převzato z ^[14]).....	20
Obrázek 27: dehydratace allobetulinu – vznik γ -apoallobetulinu	21
Obrázek 28: Dehydrogenace kruhu A u molekuly allobetulinu. (Nezkreslená, při reakci nemění se, část molekuly allobetulinu je zobrazena složenou závorkou) (převzato z ^[14]).....	21
Obrázek 29: plastinka 20 x 20 cm Obrázek 30: vyrovnaná sklíčka pro nalití směsi	26
Obrázek 31: plastinky 7,6 x 2,6 cm s nalitou vrstvou silikagelu)	27
Obrázek 32: vzorek A: lupeol acetát a betulin diacetát, vzorek B: γ -apoallobetulin, vzorek C: allobetulin, vzorek D: surový extrakt březové kůry, vzorek E: betulin	29
Obrázek 33: Sklíčka s tavenými vzorky 1-5 po sejmutí z bodotávku	32
Obrázek 34: vrypy na rýze v plastince k chromatografii	33
Obrázek 35: kyveta s plastinkou a eluce rozpouštědla	34
Obrázek 36: chromatografie vzorků 1-5.....	34
Obrázek 37: TLC 1- vzorek 4, 2 – standard betulínu, 3 – standard allobetulinu, 4 – vzorek 4, 5 – standard γ -apoallobetulinu.....	36

Obrázek 38: Plastinka vpravo: 1 – vzorek 1, 2 – vzorek 2, 3 – vzorek 3, 4 – vzorek 4, 5 – vzorek 5; plastinka vlevo: 4 – vzorek 4, A – standard betulinu, B – standard allobetulinu, 4 – vzorek 4, C – standard γ -apoallobetulinu 38

