

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ

STUDIUM OBSAHOVÝCH LÁTEK REZAVCE ŠIKMÉHO
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Matěj Žemlička

Přírodovědná studia obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň, 2022

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

V Plzni, 2022

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval panu doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly při zpracování této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval všem, kteří mi pomohli s překladem nebo gramatickou korekcí.

OBSAH

1. ÚVOD	2
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1 REZAVEC ŠIKMÝ (<i>INONOTUS OBLIQUUS</i>)	3
2.2 TERPENOIDY	3
2.2.1 Betulin	4
2.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ METODY	5
2.3.1 Extrakce	5
2.3.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	6
2.3.3 Destilace	7
2.3.4 Retardační faktor	8
2.4 CHROMATOGRAFICKÁ ROZPOUŠTĚDLA	9
2.4.1 Eluotropní řada	9
2.4.2 Zásady výběru vhodného rozpouštědla	10
2.5 POMŮCKY	11
2.5.1 Balónek	11
2.5.2 Kapiláry	12
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
3.1 POMŮCKY	14
3.1.1 Zhotovení kapiláry	14
3.1.2 Zhotovení balónku	15
3.2 VÝBĚR VHODNÉHO ROZPOUŠTĚDLA PRO EXTRAKCI	16
3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie jednotlivých vzorků	18
3.2.2 Destilace jednotlivých vzorků	21
3.2.3 Zhodnocení výsledků a konečný výběr rozpouštědla	23
3.3 EXTRAKCE LÁTEK	24
3.3.1 Extrakce v Soxhletově extraktoru	24
3.3.2 Destilace extraktů	25
3.3.3 Zmýdelnění vzorku	26
3.4 TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE JEDNOTLIVÝCH PRODUKTŮ	28
3.4.1 TLC extraktu – n-hexan	28
3.4.2 TLC extraktu – ethanol	30
3.4.3 TLC extraktu - methanol	31
3.4.4 Zhodnocení jednotlivých TLC	31
ZÁVĚR	33
RESUMÉ	34
SEZNAM LITERATURY	35
SEZNAM OBRÁZKŮ	36
SEZNAM TABULEK	37

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium obsahových látek rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*), především na provedení orientačních tenkovrstvých chromatografií ve srovnání s betulinem. Rezavec šikmý je stopkovýtrusná dřevokazná houba s vysokým obsahem biologicky aktivních látek. Podle informací z dostupných zdrojů by součástí těchto látek měl být též betulin. Touto triterpenickou látkou se katedra chemie FPE ZČU zabývá dlouhodobě. Izolace betulinu je zařazena do základních laboratorních cvičení z organické chemie. Nabízí se tedy zavedení základních operací, které by mohly přítomnost tohoto triterpenu prokázat.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 REZAVEC ŠIKMÝ (*INONOTUS OBLIQUUS*)

Rezavec šikmý patří mezi stopkovýtrusné dřevokazné houby z čeledi kožovkovitých (Hymenochaetaceae). Vyskytuje se na listnatých stromech, převážně na bříze bělokoré. Rezavec se již po několik staletí používá v tradiční medicíně na léčbu nádorových onemocnění, tuberkulózy, kardiovaskulárních a jaterních onemocnění a dalších infekčních chorob. Z plodnic rezavce bylo izolováno více než 200 biologicky aktivních látek. Mezi nejdůležitější, z hlediska farmakologie, patří polysacharidy, triterpenoidy a polyfenolické látky¹.

V článku ² autoři uvádí, že plodnice se vytváří pod kůrou během rozmnožovací fáze, která nastává úmrtím stromu (nejčastěji břízy bělokoré). Nejčastěji ji lze pozorovat jako houbovitou hmotu, která se vyskytuje jako černý výrůstek na exteriéru stromu.

V posledních letech je o zkoumání obsahových látek a o léčebné účinky rezavce šikmého velký zájem. A také se výzkumy zabývají podobností obsahových látek, a tím i o účinky příbuzných druhů rezavce šikmého².

2.2 TERPENOIDY

Terpenoidy jsou organické sloučeniny, které jsou nejčastěji získávány z rostlinných materiálů pomocí destilace s vodní parou. Vonné kapalné směsi se nazývají silice (esenciální oleje). Jedná se o malé organické molekuly s velmi vysokou strukturní rozmanitostí. V dnešní době je známo na 35000 různých terpenoidů. Terpenoidy můžeme dělit podle struktury na cyklické či alifatické uhlovodíky. Uhlovodíkové terpenoidy, které jsou známé jako terpeny, jsou charakteristické tím, že obsahují vždy dvojně vazby³.

Všechny terpenoidy jsou strukturně příbuzné i přesto, že mají patrné strukturní rozdíly. Terpeny vznikly spojením isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu) jako pětiuhlíkaté strukturní jednotky podle isoprenového pravidla. Atom uhlíku C1 nazýváme začátkem jednotky („hlava“) a atom uhlíku C4 nazýváme koncem jednotky („pata“)³.

Terpeny (a terpenoidy), které tvoří molekulu, se dělí podle počtu isoprenových jednotek (viz tab. č. 1). Monoterpeny a seskviterpeny jsou obsaženy především v rostlinách. Vyšší terpeny jsou obsaženy v rostlinách i v živočiších a většina má významnou biologickou roli. Například lanosterol (triterpen) je prekurzorem (sloučenina účastnící se chemické reakce za vzniku jiné sloučeniny) všech steroidních hormonů³.

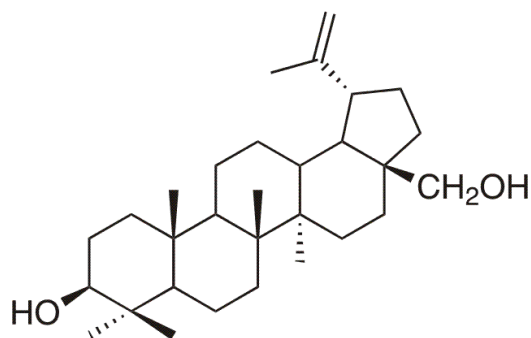
Tabulka 1: Dělení terpenů podle počtu isoprenových jednotek (převzato z ³)

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

2.2.1 BETULIN

Betulin (lup-20(29)-en-3 β ,28-diol) je přírodní triterpenický dvojsytný alkohol. Jedná se o látku, která je obsažena převážně v kůře břízy bělokoré (*Betula pendula*), odtud je odvozený jeho název. Získává se například extrakcí březové kůry s chloroformem za varu⁴.

Březová kůra má díky betulinu specifické vlastnosti, nikdy neshnije ani neplesniví, což je způsobeno právě protiplísňovými a antibakteriálními vlastnostmi betulinu. Betulin a jeho deriváty disponují zajímavými biologickými účinky, např. protizánětlivými, protivirovými, anti-HIV⁴.



Obrázek 1: Strukturální vzorec Betulinu (Wikipedie)

2.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ METODY

2.3.1 EXTRAKCE

Extrakce se řadí mezi separační metody. Při extrakci přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Jedná se o velmi výhodnou metodu pro stabilizaci tepelně nestálých látek, tedy extrahovat můžeme i za laboratorní teploty či chladu. Obecně platí, že opakovaná extrakce několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jediná extrakce celým množstvím rozpouštědla⁵.

Při této práci bylo využito pouze extrakce pevné fáze do kapalně fáze.

Nejjednodušší extrakce, při níž se tuhá fáze rozmíchá s rozpouštědlem a poté se zfiltruje, se nazývá macerace. Látka je dokonale vyloučena tehdy, když několik kapek posledního podílu extrakční kapaliny po odpaření na hodinovém skle nezanechává zbytek. Pokud se musí látka extrahovat vícekrát, tedy je omezeně rozpustná v daném rozpouštědle, tak využíváme kontinuální extrakci v Soxhletově extraktoru⁵.

Soxhletův extraktor se řadí mezi nejčastěji používané přístroje pro extrakci pevných látek těkavými rozpouštědly. Na extrahovaný materiál, který se nachází v patroně nebo může být vložen přímo do „těla“ extraktoru tak, aby bylo zabráněno úniku drobných součástí do varné baňky, stéká kondenzát ze zpětného chladiče. Do zpětného chladiče odchází páry rozpouštědla z varné baňky bočním ramenem extraktoru. Extrakce v Soxhletově extraktoru se periodicky opakuje, když hladina v extrakčním prostoru dosáhne výšky ohybu násosky, extrakt samovolně přeteče zpět do varné baňky⁶ (viz obr. č. 2).

Soxhletově extraktoru můžeme malým objemem rozpouštědla extrahovat velké množství tuhé látky. Při této metodě se rozpouštědlo neustále recykluje, tedy stále extrahujeme čistým rozpouštědlem⁵.



Obrázek 2: Soxhletův extraktor

2.3.2 CHROMATOGRRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ (TLC)

Chromatografie patří mezi jednu z nejvýznamnějších fyzikálně-chemických separačních metod v chemické laboratoři. Ze slova chroma můžeme hledat spojitost

metody s barevností látek, ale podstata metody s barevností nemá nic společného. Chromatografie se převážně využívá k rozdělení bezbarvých látek⁷.

Chromatografie se používá k analytickým i preparativním účelům. K rozdělení směsi dochází na základě rozdílné migrace složek v systému dvou fází, nepohyblivé (stacionární) a pohyblivé (mobilní). Stacionární fázi může tvořit pevná látka nebo kapalina zachycená v pevném porézním materiálu (nosiči). Mobilní fázi tvoří kapalina (kapalinová chromatografie), nebo plyn (plynová chromatografie)⁷.

TLC představuje velmi účinnou a jednoduchou chromatografickou metodu. Její podstatou je rozdělení jednotlivých složek směsi na základě jejich odlišné interakce se sorbentem, který je nanesen v tenké vrstvě na pevnou podložku. Pohyblivou fází je v tomto případě organické rozpouštědlo o vhodné polaritě. Volba nejvhodnějšího sorbentu (stacionární fáze), detekčního činidla a zejména pak rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel za účelem co nejlepšího rozdělení jednotlivých složek reakční směsi, vyžaduje zpravidla značnou dávku trpělivosti a zkušeností. Pomocí metody TLC sledujeme průběh reakce a čistotu produktů⁷.

Tenká vrstva stacionární fáze je tvořena buď volně sypaným sorbentem nebo připravena jako fixovaná s použitím vhodného pojiva (škrob, sádra), které však nejen ovlivňuje dělicí schopnosti zhotovené vrstvy, ale i možnosti detekce chromatogramu⁷.

2.3.3 DESTILACE

Destilace kapalin patří mezi základní čistící operace. Látka nebo směs látek se pomocí ohřevu převedou na plynou fázi, která se následně ochladí v chladiči a zpátky zkapalní. Takto zkapalněná látka se shromažďuje v jímací baňce⁶.

Destilaci lze provádět v několika různých aparaturách, jako jsou například destilace za sníženého tlaku, vodní parou, jednoduchá destilace.

Rozdíl teplot varu destilovaných kapalin se nazývá dělicí efekt destilace, který je přímo úměrný. Tato metoda využívá různé těkavosti kapalných či zkapalněných látek, které mají rozdílnou teplotu varu. Pokud se jedná o takovéto látky, mohou být touto metodou dělitelné⁸.

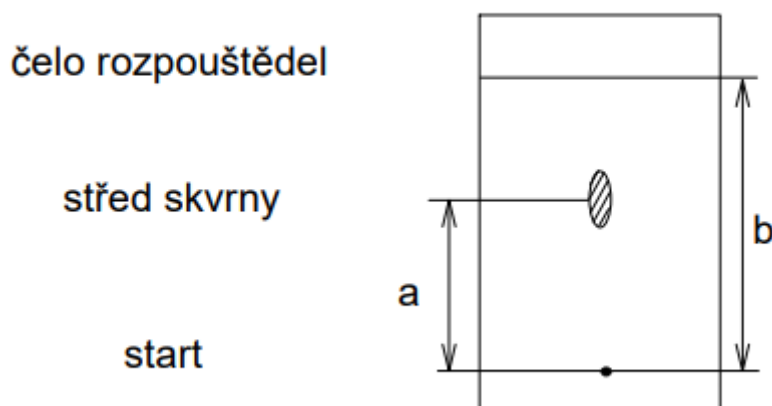
2.3.4 RETARDAČNÍ FAKTOR

Retardační faktor je bezrozměrná veličina, která nabývá hodnot 0 až 1. Látkám, které zůstávají na startu přiřadíme hodnotu $R_F = 0$ a látkám, které postupují s čelem rozpouštědla přiřadíme hodnotu $R_F = 1$. Skvrna při analýze na tenké vrstvě urazí určitou vzdálenost, ta závisí jak na polaritě látky, tak i na polaritě rozpouštědla⁷.

Polárními skupinami silikagelu či jiné stacionární fáze jsou polárnější látky více zadržovány. Oproti tomu při použití rozpouštědla o vyšší polaritě urazí látka o dané polaritě větší vzdálenost a dochází také k jejímu rozmývání. Rozpustnost látky v mobilní fázi může ovlivnit tvar a vzdálenost skvrny⁷.

Retardačním faktorem rozumíme uraženou vzdálenost látky na dané destičce a v daném rozpouštědle, která je nepřímo úměrná její polaritě. Značíme R_F a definujeme rovnicí⁶:

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



Obrázek 3: Vyhodnocení chromatogramu R_F (převzato z 7)

2.4 CHROMATOGRAFICKÁ ROZPOUŠTĚDLA

Pro chromatografická rozpouštědla platí, že jsou závislá na své polaritě. Tedy čím je rozpouštědlo polárnější, tím se pevněji váže na sorbent. Dochází k tzv. konkurenční adsorpci rozpouštědla a látek, která se mají dělit⁹.

Pokud by bylo použito rozpouštědlo o vysoké polaritě vzhledem k polaritě dělených látek, látka by nemohla „soutěžit“ s rozpouštědlem v adsorpci, a tím by byla unášena s čelem rozpouštědla. Naopak při mnohem menší polaritě rozpouštědla proti děleným látkám, zůstává látka na startu chromatografické destičky (v případě TLC)⁹.

Měřitko pro polaritu je dipólový moment, respektive elektrická permitivita, proto podle těchto konstant jsou chromatografická rozpouštědla seřazena do tzv. eluotropních řad⁹.

Při chromatografii se častěji využívají směsi dvou a více rozpouštědel. Žádaný stupeň polaritě pak vzniká různým poměrem mísení. Avšak platí zásada, že vzniklá směs by neměla obsahovat více než 30 % polárnější složky⁹.

2.4.1 ELUOTROPNÍ ŘADA

Nejvhodnější rozpouštědlový systém pro danou směs látek je většinou zjišťován experimentálně na základě zkušeností a je zaznamenáván jako součást pracovního protokolu. Při volbě rozpouštědel se vychází z tzv. eluotropické řady. V této řadě jsou rozpouštědla řazena podle klesající relativní permitivity v pořadí (viz tabulka č. 2)⁷.

Rozpouštědla stojící v eluotropické řadě nejvýše jsou vhodná pro vymytí složek směsí s vysokou polaritou. Mezi ně patří též pyridin a kyselina octová. Jejich účinnost je způsobena tím, že pyridin uvolňuje i chemicky vázané báze a současně je dobře rozpouští; podobně kyselina octová ruší chemisorpci fenolů a organických kyselin. Nejnížší členy eluotropické řady nebo jejich směsi jsou naopak rozpouštědly vhodnými k jemnějšímu dělení směsí⁷.

Tabulka 2: Eluotropní řada rozpouštědel pro TLC (převzato z ⁷)

Rozpouštědlo:	Pořadí:
Voda	1
Methanol	2
Ethanol	3
Propan-1-ol	4
Aceton	5
Ethyl-acetát	6
Diethylether	7
Chloroform	8
Benzen	9
Toluen	10
Chlorid uhličitý	11
Cyklohexan	12
Hexan	13

2.4.2 ZÁSADY VÝBĚRU VHODNÉHO ROZPOUŠTĚDLA

Pro volbu nejideálnějšího chromatografického rozpouštědla platí dvě zásady.

Prvním požadavkem je, aby v použitém rozpouštědle byla dělená směs látek rozpustná, zpravidla je nejvýhodnější to rozpouštědlo, v němž se všechny složky směsi ještě rozpouštějí⁷.

Druhým požadavkem je, aby dělené látky nebyly na zvoleném adsorbentu poutány ani příliš pevně, ani příliš málo. V prvním případě směs zůstává na startu, v druhém případě směs látek bez rozdělení postupuje v čele rozpouštědel. Obě mezní možnosti ukazují, že nejvýhodnější je případ dělení směsi za podmínek, kdy jsou její složky adsorbovány středně pevně a mohou se uplatnit rozdíly v jejich retenčním faktoru⁷.

2.5 POMŮCKY

2.5.1 BALÓNEK

Tvar balónku vyhotovený ze skleněné trubičky (viz obr. č. 4).

Pro manipulaci s kapalinami je balónek velice účinná pomůcka. Balónek je zhotovován ze skleněné trubice o vhodném průměru. Za nejideálnější průměr skleněné trubice se považuje 6–8 mm, tento průměr umožňuje jednoduché zhotovení balónku. Tento průměr byl zjištěn během několikaleté praxe na naší fakultě. Skleněnou trubici je vhodnější volit se silnější stěnou, díky tomu zamezíme případnému prasknutí nebo eliminujeme přehnanou křehkost materiálu⁸.

Balónek lze využít v semimikrotechnice k uchovávání kapalin. Funkce balónku je dána změnou tlaku plynu, který je obsažen uvnitř. Tato změna závisí na vnitřní i vnější teplotě. K nasávání kapaliny do balónku dochází při snižování teploty, tedy dochází k snížení tlaku uvnitř balónku. Naopak k vyprázdňení nasáté kapaliny z balónku dochází při zvyšování teploty, tedy dochází ke zvýšení tlaku uvnitř balónku⁸.



Obrázek 4: Tvar kapiláry a balónku

2.5.2 KAPILÁRY

Velmi tenká skleněná trubička (řádově desetiny mm). Výška hladiny kapaliny v kapiláře je způsobena kapilárním tlakem, který vzniká zakřivením povrchu. Těsně pod dutým povrchem kapiláry je vnitřní tlak menší než těsně pod rovinným povrchem kapaliny v okolí kapiláry. Proto kapalina vystoupí v kapiláře do takové výšky, aby hydrostatický tlak odpovídající tomuto sloupci kapaliny vyrovnal rozdíl vnitřních tlaků. U kapilární deprese je tomu opačně¹⁰.

O kapilární elevaci hovoříme, pokud jsou oba konce kapiláry otevřené a jeden konec kapiláry je ponořen do kapaliny, ve které jsou molekulové interakce mezi molekulami stěny kapiláry mnohem silnější než molekulové interakce mezi molekulami samostatné kapaliny. Potom kapalina vzlíná kapilárou. Tedy hladina kapaliny v kapiláře je vyšší než hladina kapaliny kolem kapiláry¹¹.

O kapilární depresi hovoříme, pokud jsou oba konce kapiláry otevřené a jeden konec kapiláry je ponořen do kapaliny, ve které jsou molekulové interakce mezi molekulami stěny mnohem slabší než mezi molekulami kapaliny. Potom hladina v kapiláře klesne pod úroveň hladiny okolo kapiláry¹¹.

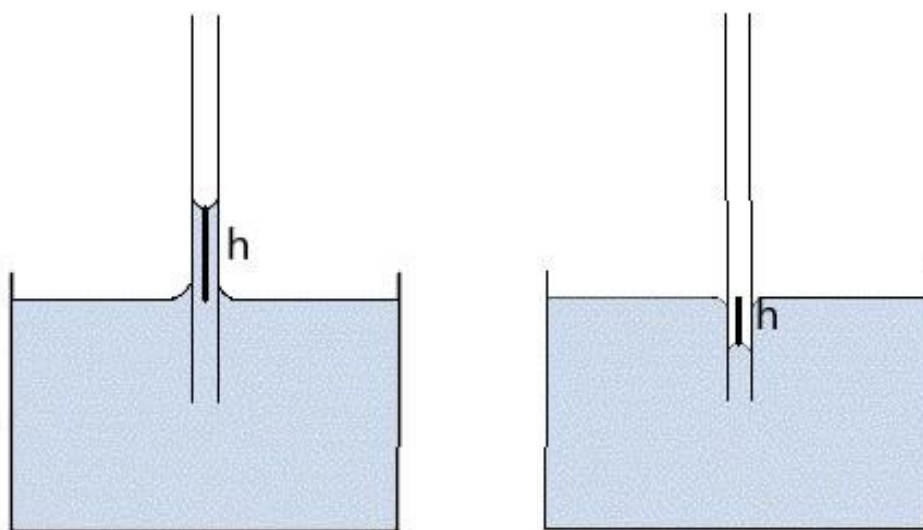
Oba tyto jevy můžeme souhrnně nazvat jako kapilarita¹¹.

Zvýšení hladiny, respektive snížení, můžeme vyjádřit vzorcem

$$h = \frac{2\sigma \cos(\alpha)}{\rho g r}$$

přičemž ρ (v kg/m^3) je hustota kapaliny, r (v m) je poloměr kapiláry, σ (v N/m) je povrchové napětí, α je stykový úhel a g (m/s^2) je tíhové zrychlení. Tento úhel je natolik malý, že ho můžeme zanedbat. A tudíž vycházíme ze vztahu¹¹

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



Obrázek 5: Kapilární elevace (vlevo) a deprese (převzato z ¹⁰)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V průběhu experimentální části této bakalářské práce bylo využíváno pouze dostupného vybavení školní laboratoře. Bylo vždy využíváno chemikálií a pomůcek o běžné čistotě.

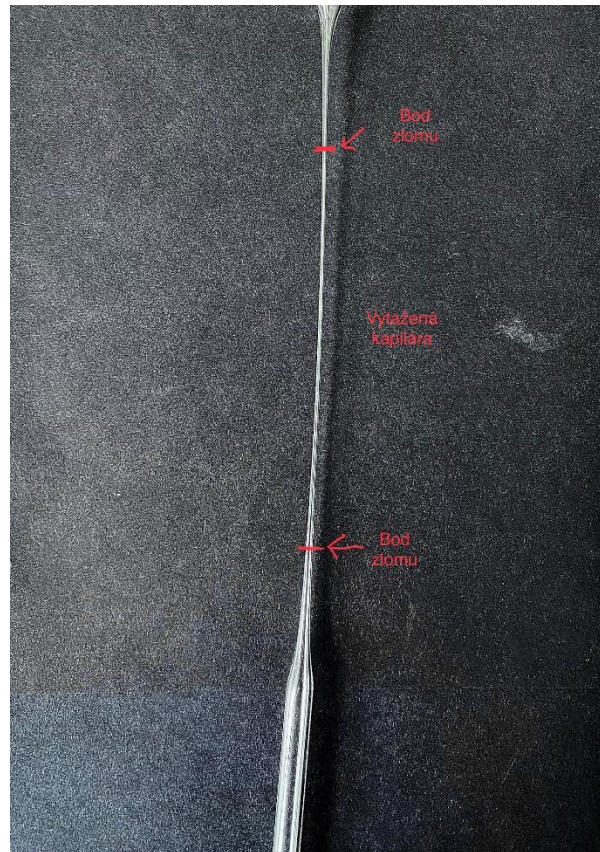
3.1 POMŮCKY

Před začátkem samostatné experimentální části této práce bylo nezbytné si připravit pomůcky, které práci velice usnadní. Především se jedná o kapiláry a balónky, které jsou vhodné k přemísťování kapalin.

3.1.1 ZHOTOVENÍ KAPILÁRY

Ke zhotovení kapiláry bylo potřeba využití kahanu, nože na sklo a vhodné skleněné trubice.

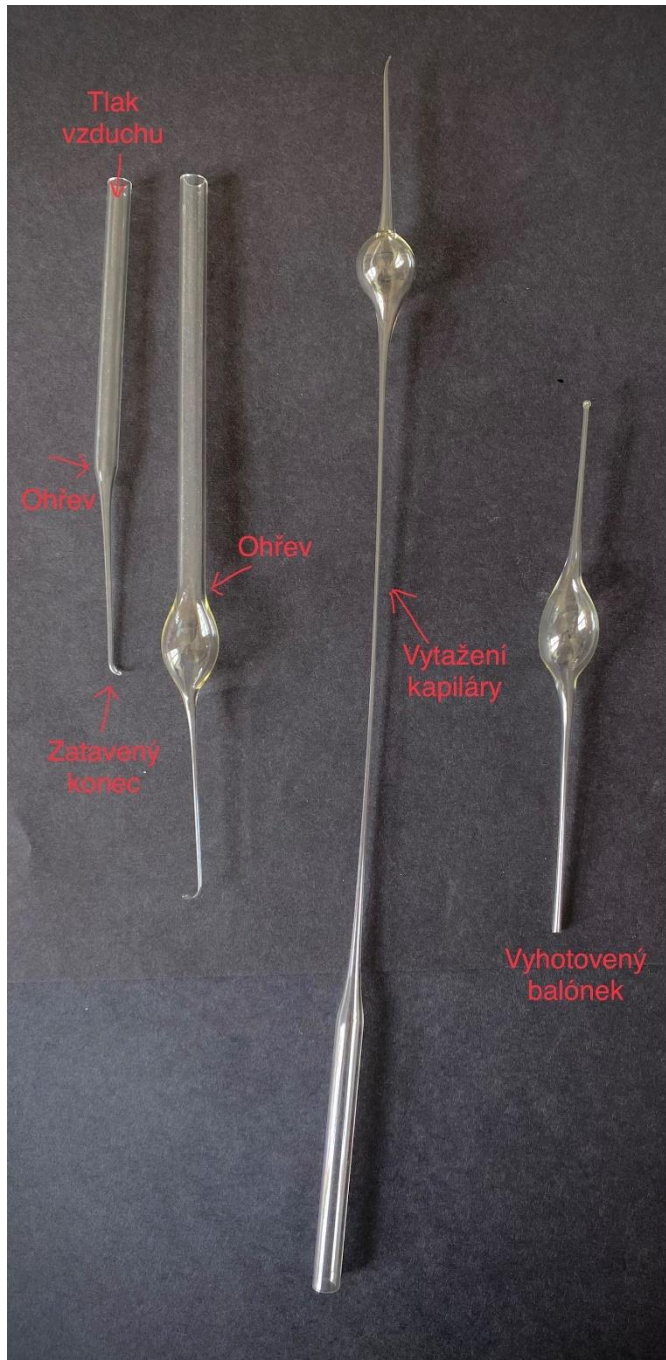
Nejdříve byl uříznut nožem na sklo dostatečně velký kus skleněné trubice (přibližně se jedná o 20 cm). Uříznutí trubice bylo provedeno lehkým naříznutím stěny skla speciálním nožem na sklo, a poté se trubice opatrně odlomila směrem vzhůru (řez skla směřuje nahoru). Došlo k rovnoměrnému lomu v místě naříznutí skleněné trubice. Uříznutou trubici bylo nutné uchopit na obou koncích a rovnoměrně otáčivými pohyby zahřívat nad plamenem kahanu. V momentě, kdy skleněná trubice byla dostatečně zahřátá (sklo bylo lehce tvarovatelné a měkké), mírně se začal tahat materiál od sebe. Ve stejný moment musela být skleněná trubice vyjmuta z plamene a sklo bylo vytaženo do potřebných rozměrů. Při této práci může dojít k roztrhnutí trubice, a proto se v této fázi muselo dbát velké opatrnosti a pečlivosti. Pokud se roztažení povede, vznikne tenoučká skleněná kapilára, kterou lze snadno vylomit (viz obr. č. 6).



Obrázek 6: Zhotovení kapiláry

3.1.2 ZHOTOVENÍ BALÓNKU

Zhotovení balónku je již poměrně náročnější než zhotovení kapiláry. Prvním krokem byla oddělena vhodně dlouhá skleněná trubice (cca 20 cm) a následně trubice byla vytažena do kapiláry, jak již bylo popsáno v podkapitole 3.1.1. Jeden z konců byl odlomen a bylo velice důležité, aby byl konec kapiláry zataven. Dále se se skleněnou trubicí otáčelo nad kahanem rovnoměrně, aby se materiál dostatečně prohřál po celém svém obvodu v místě, kde se trubice zužuje do kapiláry. Byla zahřívána tak dlouho, než v daném místě bylo sklo dostatečně měkké. Trubice byla vyjmuta z plamene a bylo fouknuto do studeného konce skleněné trubice. Vznikla dutá vyboulená část v trubici. Následně bylo potřeba vytvoření kapilárního místa nad vyboulenou dutinou. Místo, kde se mění trubice na vyboulenou dutinu, se začalo nahřívát. Nad plamenem bylo otáčeno rovnoměrně do změknutí skla. Následně byl balónek vyjmutý z plamene a tahem byla vytvořena kapilára. Protáhlá část byla odlomena ve vhodné výšce, podle potřeby. Tento postup je shrnut v následujícím obrázku (viz obr. č. 6).



Obrázek 7: Zhotovení balónku

3.2 VÝBĚR VHODNÉHO ROZPOUŠTĚDLA PRO EXTRAKCI

Před začátkem práce bylo zapotřebí vybrat vhodné rozpouštědlo pro extrakci látek z *Inonotus obliquus*. Jako nejvhodnější rozpouštědlo je myšleno takové, které ze vzorku vymývá největší procentuální výtěžek extrahovaných látek.

Bylo naplněno sedm lékovek malým množstvím *Inonotus obliquus*, který byl předem nadrcen a dále rozmělněn v třecí misce. Vše bylo naváženo na analytických vahách a následně bylo přidáno 10 ml různých rozpouštědel (viz tab. č. 3 a obr. č. 8)

Tabulka 3: Obsahy jednotlivých lékovek

Číslo vzorku	Hmotnost lékovka (v g)	Navážka <i>Inonotus obliquus</i> (v g)	Rozpouštědlo
1	16,2897	1,0003	toluen
2	15,7858	1,0002	chloroform
3	16,4147	1,0000	aceton
4	16,5716	0,9997	methanol
5	16,3140	1,0002	ethanol
6	16,3401	1,0000	diethyether
7	16,3791	1,0000	n-hexan



Obrázek 8: Fotografie jednotlivých lékovek s rozpouštědly

Lékovky s *Inonotus obliquus* se ponechaly louhovat v jednotlivých rozpouštědlech několik dní, přičemž každý den byly několikrát protřepány. Aby bylo zjištěno, ve kterém rozpouštědle dochází k největšímu vymývání extrahovaných látek, bylo přistoupeno k metodě tenkovrstvé chromatografie neboli TLC.

Při metodě TLC bylo využito hliníkové fólie „Silikagel 60 F₂₅₄“ s tloušťkou vrstvy 0,2 mm. Jako mobilní fáze byla využita soustava 10:3 n-hexan:ethyl-acetát. Tento poměr a výběr rozpouštědel je nejvýhodnější pro vynášení látek, především betulinu a lupeolové frakce, které byly zkoumány. Tento výběr bylo potřeba experimentálně vyzkoušet. Při poměru 10:3 byla stopa betulinu a lupeolové frakce zhruba uprostřed chromatografické destičky. Naopak při poměru 1:1 byla stopa těsně před čelem rozpouštědel.

3.2.1 TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ

Před začátkem samostatné TLC vzorků bylo potřeba nastříhat několik hliníkových fólií „Silikagel 60 F₂₅₄“ o vhodném rozměru, poté připravit uzavřenou vyvíjecí soustavu, topnou spirálu na vypálení stop vzorků a naplnění postřiku roztokem 10% kyseliny sírové.

Prvním krokem bylo vyznačení startu na destičce, na straně pokryté silikagelem cca 0,5 cm od spodní strany destičky. Dále vyznačení několika bodů pro nanesení vzorků. Tyto body musí mít optimální odstupy, aby nedocházelo k překrývání drah, které vznikají při vzlínání. Pokud by došlo k překrytí drah, bylo by nutné zopakovat celý postup.

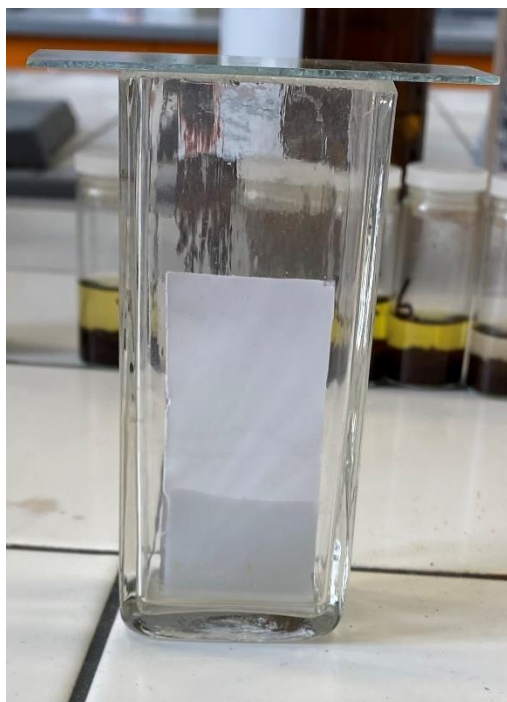
Druhým krokem bylo nanášení jednotlivých vzorků tenkou kapilárou. Kapilára byla vložena do lékovky se vzorkem a rozpouštědlem. Nasátá kapalina byla nanesena na destičku do vyznačeného místa (nasátí kapaliny do kapiláry viz kap. 2.4.2.). Následně byla odlomena část kapiláry, kde se nacházela kapalina a zbytek byl použit na další nasátí a nanesení jiného vzorku. Vzorky byly naneseny do všech pozic kromě pozice prostřední. Tato pozice sloužila pro nanesení vzorku betulinu nebo lupeolové frakce, aby bylo možné porovnávat.

Nanesené vzorky na destičce se nechaly vyschnout několik minut. Dále byla naplněna vyvíjecí soustava n-hexanem a ethyl-acetátem v již zmíněném poměru 10:3. Jelikož pro TLC bylo potřeba menší množství tohoto poměru, pipetovalo se 1 ml n-hexanu

a 0,3 ml ethyl-acetátu. Bylo zachováno absolutní čistoty, tedy pro každou látku bylo využito jiné pipety.

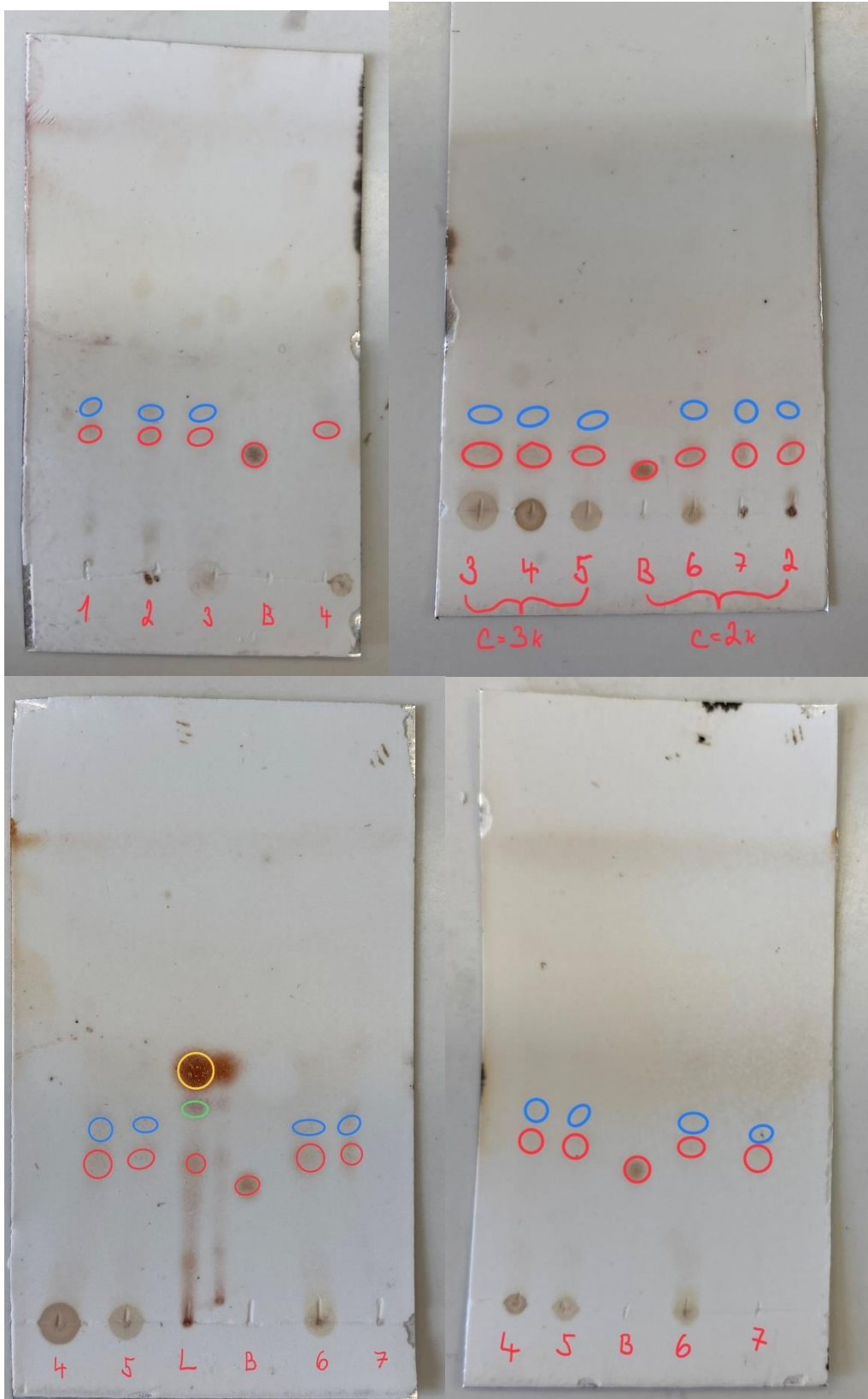
Po naplnění vyvíjecí soustavy mobilní fází do ní byla vložena chromatografická destička pomocí pinzety tak, aby start byl vespod vyvíjecí soustavy. Aby bylo zamezeno úniku par obou rozpouštědel, byla soustava překryta krycím sklíčkem (viz obr. č. 9). Bylo ponecháno, aby rozpouštědla vystoupala do výšky cca 1 cm od vrchního okraje. Chromatografická destička byla vyjmuta pinzetou a následně postříkána roztokem 10% kyseliny sírové. Dále byla vložena na topnou spirálu, aby se vypálila stopa vzlínání jednotlivých vzorků.

Roztok kyseliny sírové se zde použil jako univerzální detekční metoda. Při postřiku a následném zahřátí na vařiči docházelo ke karbonizaci organických látek.



Obrázek 9: Uzavřená vyvíjecí soustava

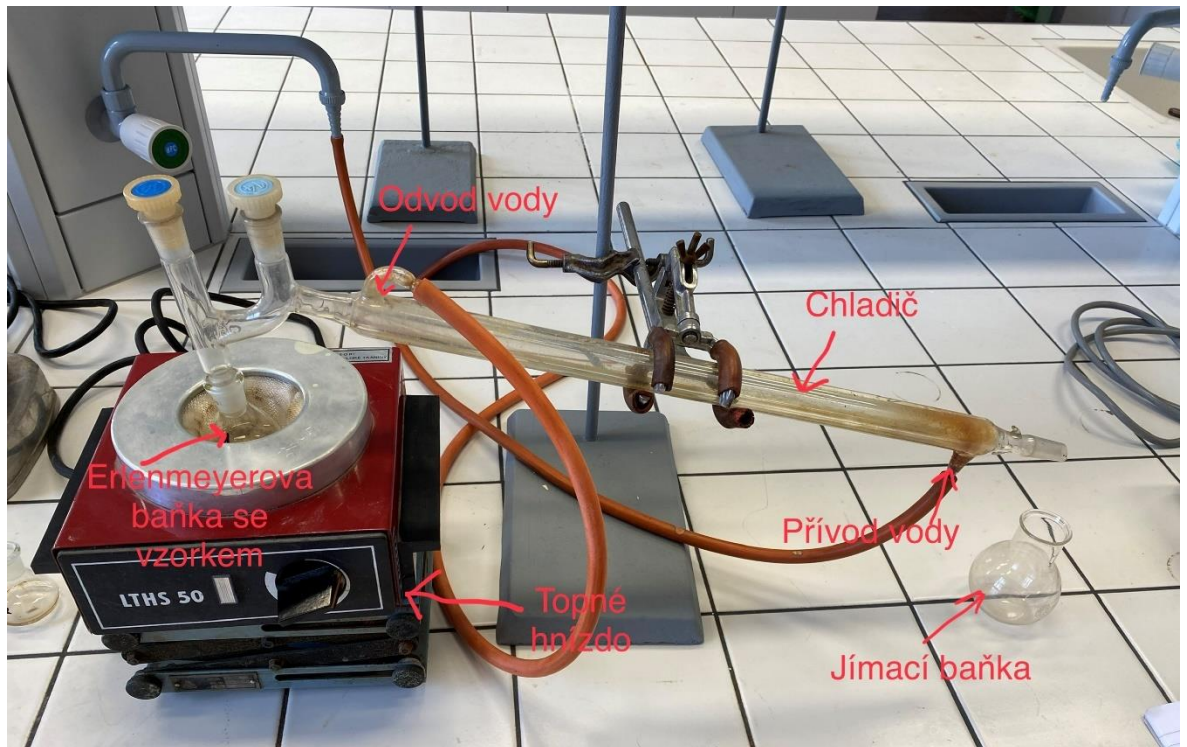
Bylo provedeno několik TLC s různým pořadím nanesených vzorků a s různým naneseným množstvím (myšleno počet dotyků kapiláry s chromatografickou destičkou) (viz soubor obrázků č. 10)



Obrázek 10: Výsledky z TLC L = lupeolová frakce, B = betulin, c = počet dotyků kapiláry s destičkou

3.2.2 DESTILACE JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ

Před začátkem destilace bylo zapotřebí sestavit destilační aparaturu (viz obr. č. 11)



Obrázek 11: Destilační aparatura

Do 25ml očíslovaných Erlenmeyerových baňek byl vložen varný kamínek, aby se zamezilo výskytu utajeného varu. Takto připravené baňky byly zváženy na analytických vahách. Po zvážení bylo odpipetováno 5 ml vzorku podle tabulky č. 4. Následně se každý obsah v baňce destiloval. Bylo zapotřebí ohlídat, aby zůstalo malé množství vzorku v baňce. Kdyby byl vzorek destilován do sucha, mohl by se vzorek spálit, a tím by byl znehodnocen. Dále byly vzorky v Erlenmeyerových baňkách vloženy do laboratorní sušárny, kde při cca 110 °C byly dosušeny do konstantní hmotnosti.

Po vysušení a vychladnutí baňek na laboratorní teplotu byly baňky zváženy. Dále byly naměřené hodnoty od sebe odečteny (viz tab. č. 4).

Tabulka 4: Jednotlivé naměřené hmotnosti vzorků

Číslo vzorku	Rozpouštědlo	Hmotnost Erlenmeyerovy baňky s varným kamínkem (v g)	Hmotnost Erlenmeyerovy baňky s varným kamínkem a vzorkem (v g)	Odpipetováno vzorku (v ml)	Hmotnost vzorku (v g)
1	toluen	17,5522	17,5559	5	0,0037
2	chloroform	18,2388	18,2479	4,6	0,0091
3	aceton	17,0019	17,0060	5	0,0041
4	methanol	16,3382	16,3556	5	0,0174
5	ethanol	17,5784	17,5849	5	0,0065
6	diethylether	17,7806	17,7884	4,4	0,0078
7	n-hexan	18,0399	18,0437	4,5	0,0038

3.2.3 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A KONEČNÝ VÝBĚR ROZPOUŠTĚDLA

Tabulka 5: Procentuální výtěžky

Číslo vzorku	Rozpouštědlo	Hmotnost navážky (v g)	Odpipetováno vzorku (v ml)	Hmotnost vzorku (v g)	% výtěžek (přepočteno na 10 ml pipetovaného vzorku)
1	toluen	1,0003	5	0,0037	0,74 %
2	chloroform	1,0002	4,6	0,0091	1,97 %
3	aceton	1,0000	5	0,0041	0,82 %
4	methanol	0,9997	5	0,0174	3,48 %
5	ethanol	1,0002	5	0,0065	1,30 %
6	diethylether	1,0000	4,4	0,0078	1,77 %
7	n-hexan	1,0000	4,5	0,0038	0,84 %

Některé z těchto vzorků byly znečištěny malými částicemi rozmělněného preparátu *Inonotus obliquus*, který se i přes nasávání pipetou skrz vatou dostával do pipety. Nejvíce znečištěný byl vzorek s rozpouštědlem č. 2 a méně znečištěn byl i vzorek s rozpouštědlem č. 4.

Závěrečný výběr vhodného rozpouštědla byl usuzován podle získaných dat z jednotlivých extrakcí s různými rozpouštědly (viz tab. č. 5). A dále podle jednotlivých tenkovrstvých chromatografií. Jako nejlepší rozpouštědlo pro extrakci byl vybrán methanol. Dále byl vybrán n-hexan k odstranění lipofilních složek a postupně byla zvyšována polarita přes ethanol k methanolu.

3.3 EXTRAKCE LÁTEK

Po vyzkoušení sedmi různých rozpouštědel bylo přistoupeno k další části. Samostatná extrakce látek probíhala v Soxhletově extraktoru.

3.3.1 EXTRAKCE V SOXHLETOVĚ EXTRAKTORU

Pro extrakci v Soxhletově extraktoru bylo postupně využito všech vybraných rozpouštědel. Prvním rozpouštědlem byl n-hexan, druhým ethanol a třetím methanol.

Před naplněním extraktoru bylo potřeba vysušený vzorek *Inonotus obliquus* nalámat na menší kousky. Takto nalámaný vzorek byl zvážen a poté bylo zváženým vzorkem naplněno tělo Soxhletova extraktoru (viz obr. č. 12).

Celková hmotnost vysušeného vzorku pro naplnění byla: 65,126 g.

Následně byla prvním rozpouštědlem, tedy n-hexanem, naplněna varná baňka s varným kamínkem, která byla vložena do topného hnízda. Samostatná extrakce probíhala cca 24 hodin. Po dokončení extrakce prvním rozpouštědlem, byl tento proces opakován i pro zbylá dvě rozpouštědla, tedy ethanol a methanol. Před zahájením extrakce dalším rozpouštědlem byl extrahovaný materiál dokonale zbaven rozpouštědla předchozího (n-hexanu před extrakcí ethanol, ethanolu před extrakcí methanolu).



Obrázek 12: Naplněné tělo Soxhletova extraktoru vzorkem *Inonotus obliquus* (vata ve spodní části extraktoru brání úniku jemných částecek materiálu do baňky s rozpouštědlem).

3.3.2 DESTILACE EXTRAKTŮ

Po dokončení procesu pro všechna tři rozpouštědla byl obsah varných baněk přelit do tří předem zvážených 250ml baněk s varným kamínkem (viz tab. č. 6). Při přelévání byl obsah baněk několikrát promyt stejným rozpouštědlem, kterým byl vzorek extrahován, aby bylo v co největší míře zamezeno ztrátám.

Následně byl obsah v baňkách destilován. Odparek byl vysušen do konstantní hmotnosti při teplotě 110 °C v sušárně (vysušené baňky s extraktem viz obr. č. 13). Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly baňky zváženy. Výsledky byly následně od sebe odečteny pro získání jednotlivých hmotností vzorků (viz tab. č. 6).

Tabulka 6: Naměřené hodnoty extrakce

Rozpouštědlo	Hmotnost varné baňky s kamínkem (v g)	Celková hmotnost po vysušení (v g)	Hmotnost extrahovaného vzorku (v g)	% výtěžek
n-hexan	96,045	96,234	0,189	0,29 %
ethanol	106,447	108,693	2,246	3,45 %
methanol	125,998	127,689	1,691	2,60 %

Obrázek 13: Extrakt *Inonotus obliquus* v různých rozpouštědlech

3.3.3 ZMÝDELNĚNÍ VZORKU

Před začátkem samostatného zmýdelnění části vzorku bylo potřeba připravit ethanolický roztok hydroxidu draselného.

Při přípravě roztoku KOH v ethanolu bylo přihlédnuto k analogickému zmýdelnění extraktu jeřábové kůry, provedeném již dříve (viz tab. č. 7) (Richtr – osobní sdělení). A potřebné množství bylo vypočteno přímou úměrností. Pro každý nezmýdelněný vzorek byl připraven co nejvíce podobný ethanolický roztok hydroxidu draselného (viz tab. č. 7).

Postup výpočtu ethanolického roztoku hydroxidu draselného:**a) Přepočet potřebného množství KOH**

110 mg extraktu 117 mg KOH

150 mg extraktu x mg KOH

$$x = 117 \times \frac{150}{110} = 159,55 \text{ mg}$$

b) Přepočet potřebného množství ethanolu

110 mg extraktu 20 ml ethanolu

150 mg extraktu x ml ethanolu

$$x = 20 \times \frac{150}{110} = 27,27 \text{ ml}$$

Tabulka 7: Množství látek pro zmýdelnění

Autor	Množství vzorku (v mg)	Množství hydroxidu draselného (v mg)	Množství ethanolu (v ml)
Richtr	110	117	20
Žemlička (n-hexan)	150	160	27
Žemlička (ethanol)	150	162	27
Žemlička (methanol)	150	160	27

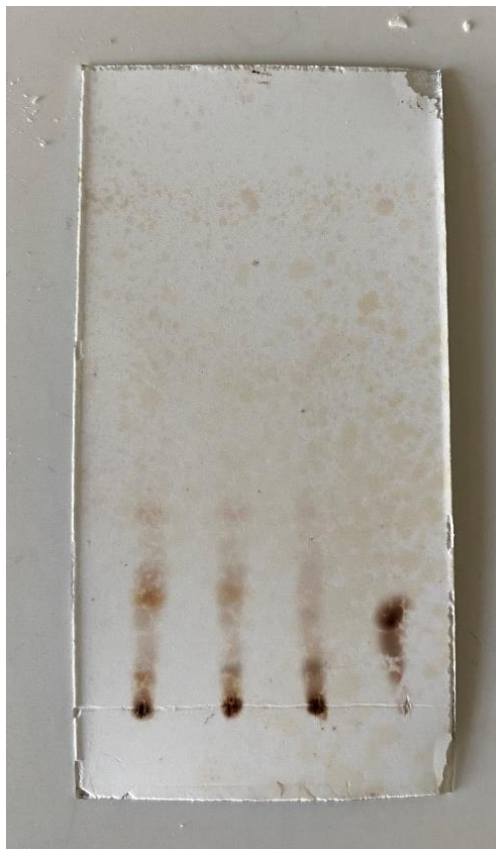
Do jednotlivých varných baněk s varným kamínkem bylo naváženo 150 mg nezmýdelněných vzorků, které byly následně zality 27 ml ethanolického roztoku KOH.

Pro každý extrakt byla provedena zpětná destilace, při níž dochází k tzv. „refluxu“ (látka se začne vypařovat a její páry kondenzují ve zpětném chladiči, a tím se vrací zpět do varné baňky). Tento děj probíhal u každého vzorku 5 hodin. Následně byly baňky odstaveny a zazátkovány.

3.4 TENKOVSTVÁ CHROMATOGRRAFIE JEDNOTLIVÝCH PRODUKTŮ

Před samotným začátkem bylo potřeba připravit nezbytné pomůcky a chemikálie, jak bylo zmíněno v podkapitole 3.2.1. Jako mobilní fáze byla použita soustava n-hexan:ethylacetát (10:3). Navíc bylo použito chloroformu k nanášení extrahovaných krystalů v kapalně fázi na chromatografickou destičku.

Dále byla provedena orientační tenkovrstvá chromatografie nezmýdelněných produktů (viz obr. č. 14).



Obrázek 14: TLC nezmýdelněných extraktů (zleva n-hexan, ethanol, methanol, betulin)

3.4.1 TLC EXTRAKTU – N-HEXAN

Prvním produktem, který byl zkoumán byl extrakt n-hexanový.

Při prvním TLC bylo kapilárou naneseo malé množství (myšleno jeden dotyk kapiláry s chromatografickou destičkou) zmýdelněného extraktu, nezmýdelněného extraktu a čistý betulin. Takto připravená chromatografická destička neposkytla žádnou informaci o látkách obsažených ve zmýdelněném extraktu a poskytla velmi slabou nečitelnou stopu v nezmýdelněném extraktu.

Bylo tedy uváženo, že výsledný produkt bude muset být nanesen ve větší koncentraci, přičemž koncentrace čistého betulinu zůstala stejná. Na další chromatografickou destičku bylo naneseo větší množství (5 dotyků kapiláry) zmýdelněného extraktu. U nezmýdelněného 3 dotyky kapilárou. Takto připravená chromatografická destička po vypálení již poskytla čitelnou informaci o obsažených látkách (viz obr. č. 15).



Obrázek 15: TLC n-hexanového extraktu (Z- zmýdelněný, N- nezmýdelněný, B- betulin)

3.4.2 TLC EXTRAKTU – ETHANOL

Dalším zkoumaným produktem byl extrakt, jenž byl extrahován ethanolem.

Při nanášení jednotlivých extraktů na chromatografickou destičku bylo využito získané informace z předešlého TLC n-hexanového extraktu. Proto již pro první TLC bylo nanášeno stejné množství jednotlivých extraktů jako u n-hexanového extraktu. Při vypálení chromatografické destičky byla známa pouze informace o čistém betulinu a nezmýdelněném vzorku, informace o zmýdelněném vzorku chyběla. Proto pro další TLC bylo nanášeno dvojnásobné množství (10 dotyků kapilárou). Takto připravená chromatografická destička po vypálení poskytla čitelnou informaci o obsažených látkách (viz obr. č. 16)



Obrázek 16: TLC ethanolového extraktu (B- betulin, N- nezmýdelněný, Z- zmýdelněný)

3.4.3 TLC EXTRAKTU - METHANOL

Posledním zkoumaným produktem byl extrakt, jenž byl extrahován methanolem.

Při nanášení jednotlivých vzorků na chromatografickou destičku bylo využito informace z TLC ethanolových produktů. Bylo tedy nanášeno stejné množství. Po vypálení první chromatografické destičky byla poskytnuta čitelná informace o obsažených látkách v jednotlivých vzorcích (viz obr. č. 17).



Obrázek 17: TLC methanolového extraktu (N- nezmýdelněný, Z- zmýdelněný, B- betulin)

3.4.4 ZHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH TLC

Pro n-hexanový vzorek bylo zjištěno, že po zmýdelnění zmizely některé obsahové látky, také bylo potřeba nanést větší množství, aby byly stopy čitelné.

Ve srovnání s betulinem je však n-hexanový extrakt neprůkazný, jelikož neexistuje žádná stopa v úrovni stopy, kterou zanechal extrakt čistého betulinu.

Pro ethanolový vzorek bylo zjištěno, že bylo potřeba nanést dvojnásobné množství zmýdelněného vzorku oproti n-hexanovému vzorku. Také po zmýdelnění vymizely některé obsahové látky. Dále ve srovnání s betulinem je ethanolový extrakt taktéž neprůkazný jako u n-hexanového extraktu.

Pro methanolový vzorek bylo zjištěno, že je potřeba nanést stejného množství zmýdelněného množství jako tomu bylo u ethanolového vzorku. Po zmýdelnění vymizely některé obsahové látky. Ve srovnání s betulinem je však zmýdelněný vzorek oproti předchozím vzorkům průkazný. Ve zmýdelněném vzorku existuje stopa, která je na úrovni stopy, kterou zanechal extrakt čistého betulinu. Tedy lze říci, že zmýdelněný methanolový extrakt by mohl obsahovat jako jednu ze svých obsahových látek betulin.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce vycházela ze vzorku rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*) č. 2 (imperfektní stadium), datum sběru proběhl 5.1.2021 v lokalitě Světce u Tachova. Vzorek byl sušen při 45 °C.

Počátkem této bakalářské práce byl výběr tří rozpouštědel pro extrakci obsahových látek rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*). Na základě výtěžků a TLC byl zvýhodněn n-hexan, ethanol a methanol.

Vzorek č. 2 byl postupně extrahován 24 hodin n-hexanem, ethanolem a methanolem. Následně byly extrakty zahuštěny destilací a vysušeny do konstantní hmotnosti s výtěžkem pro n-hexanový extrakt 0,29 %, pro ethanolový extrakt 3,45 % a pro methanolový extrakt 2,60 %. Následně byly jednotlivé extrakty saponifikovány. Bylo provedeno TLC se srovnáním s čistým extraktem betulinu. Jediným vzorkem, kde byla pomocí TLC prokázána stopa shodná se stopou čistého betulinu byl zmýdelněný methanolický extrakt. To, zda se jedná skutečně o betulin je nutné prokázat v souvislosti s detailnějším rozbořem, který bude směřovat k izolacím některých látek a pokusem o jejich identifikaci. Předpokládám, že tento detailnější rozbor bude řešen v průběhu mé diplomové práce.

RESUMÉ

This bachelor's thesis was based on a sample of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) No. 2 (imperfect stage), the collection took place on 5.1.2021 in the locality of Světce u Tachova. The sample was dried at 45 ° C.

The beginning of this bachelor thesis was the selection of three solvents for the extraction of constituents of *Inonotus obliquus*. Based on yields and TLC, n-hexane, ethanol and methanol were preferred.

Sample No. 2 was extracted successively for 24 hours with n-hexane, ethanol and methanol. Subsequently, the extracts were concentrated by distillation and dried to constant weight in a yield of 0.29% for the n-hexane extract, 3.45% for the ethanol extract and 2.60% for the methanol extract. Subsequently, the individual extracts were saponified. TLC was performed by comparison with pure betulin extract. The only sample where a trace identical to that of pure betulin was detected by TLC was a saponified methanolic extract. Whether it is really betulin must be proven in connection with a more detailed analysis, which will lead to the isolation of some substances and attempts to identify them. I assume that this will be resolved during my diploma thesis.

SEZNAM LITERATURY

1. Navrátilová Z.: Inonotus obliquus - active compounds and therapeutic effects. *Praktické lékárenství* [online]. 2016, 12(6), 237-239 [cit. 2022-06-17]. ISSN 18012434. Dostupné z: https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201606-0005_Rezavec_sikmy-obsahove_latky_a_lecive_ucinky.php
2. Thomas P.W., Elkhateeb W.A., Daba G.M.: Chaga (Inonotus obliquus): a medical marvel but a conservation dilemma?. *Sydowia* [online]. 2020, 72, 123-130 [cit. 2022-06-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia72-2020-0123>
3. Mc Murry J.: *Organická chemie*. VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-4769-1.
4. Šarek J.: *Betulinines* [online]. [cit. 2022-06-17]. Dostupné z: <https://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>
5. Laboratorní technika. *Pedagogická fakulta MU* [online]. Dostupné z: <https://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>
6. Šilhánková A.: *Laboratoř organické chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-7080-395-9.
7. Richtr V., Kraitr M.: *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*. Plzeň: Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, 2004.
8. Richtr V.: *Semimikrotechnika v organické chemii*. Plzeň: PF, ZČU; 1993.
9. Trnka T.: *Praktikum z organické chemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.
10. Kapilární jevy | Eduportál Techmania. *Eduportál | Eduportál Techmania* [online]. Copyright © Techmania Science Center o.p.s. [cit. 17.06.2022]. Dostupné z: <https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/struktura-latek/povrch-kapaliny/kapilarni-jevy>
11. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: [online]. Kapilára. [cit. 17.06.2022]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kapil%C3%A1ra>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec Betulinu (Wikipedie).....	4
Obrázek 2: Soxhletův extraktor	6
Obrázek 3: Vyhodnocení chromatogramu R_F (převzato z ⁷).....	8
Obrázek 4: Tvar kapiláry a balónku	11
Obrázek 5: Kapilární elevace (vlevo) a deprese (převzato z ¹⁰).....	13
Obrázek 6: Zhotovení kapiláry	15
Obrázek 7: Zhotovení balónku	16
Obrázek 8: Fotografie jednotlivých lékovek s rozpouštědly	17
Obrázek 9: Uzavřená vyvíjecí soustava	19
Obrázek 10: Výsledky z TLC L = lupeolová frakce, B = betulin, c = počet dotyků kapiláry s destičkou	20
Obrázek 11: Destilační aparatura	21
Obrázek 12: Naplněné tělo Soxhletova extraktoru vzorkem <i>Inonotus obliquus</i> (vata ve spodní části extraktoru brání úniku jemných částiček materiálu do baňky s rozpouštědlem).	25
Obrázek 13: Extrakt <i>Inonotus obliquus</i> v různých rozpouštědlech.....	26
Obrázek 14: TLC nezmýdelněných extraktů (zleva n-hexan, ethanol, methanol, betulin). 28	
Obrázek 15: TLC n-hexanového extraktu (Z- zmýdelněný, N- nezmýdelněný, B- betulin)	29
Obrázek 16: TLC ethanolového extraktu (B- betulin, N- nezmýdelněný, Z- zmýdelněný) 30	
Obrázek 17: TLC methanolového extraktu (N- nezmýdelněný, Z- zmýdelněný, B- betulin)	31

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Dělení terpenů podle počtu isoprenových jednotek (převzato z ³).....	4
Tabulka 2: Eluotropní řada rozpouštědel pro TLC (převzato z ⁷).....	10
Tabulka 3: Obsahy jednotlivých lékovek.....	17
Tabulka 4: Jednotlivé naměřené hmotnosti vzorků.....	22
Tabulka 5: Procentuální výtěžky.....	23
Tabulka 6: Naměřené hodnoty extrakce.....	26
Tabulka 7: Množství látek pro zmýdelnění.....	27