

Západo česká univerzita v Plzni

Fakulta pedagogická

Bakalářská práce

**23-HYDROXYBETULIN A JEHO JEDNODUCHÉ
REAKCE**

Monika Šnaiberková

Plzeň 2012

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta pedagogická
Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika ŠNAIBERKOVÁ**
Osobní číslo: **P09B0046P**
Studijní program: **B1001 Přírodovědná studia**
Studijní obor: **Chemie se zaměřením na vzdělávání**
Název tématu: **23-Hydroxybetulin a jeho jednoduché reakce**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

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

1. Nastudovat a procvičit základní metody semimikrotechniky včetně chromatografických postupů.
2. Seznámit se s literaturou, zabývající se výskytem a izolací 23-hydroxybetulinu.
3. Zvolit vhodný přírodní zdroj 23-hydroxybetulinu a provést jeho izolaci.
4. Navrhnout a ověřit některou z možných jednoduchých přeměn 23-hydroxybetulinu.

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


Seznam odborné literatury:

Kvíčala J.: Laboratorní technika organické chemie. VŠCHT, Praha 1998.
Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii. PF, Plzeň 1993.
Richtr V., Kraitr M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie, Sborník katedry chemie. ZČU, Plzeň 2004.
Mayo W. D., Pike M. R., Trumper K. P.: Microscale techniques for the organic laboratory. John Wiley, New York 2001.

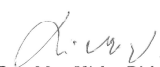
Vedoucí bakalářské práce: **Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **15. června 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2012**


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. června 2011

Prohlá-uji, že jsem práci vypracovala samostatn s použitím uvedené literatury a zdroj informací.

Ve Stra-icích, 15. 7. 2012

í í í í í í í í í í í .

Podkování

Na tomto místě bych chtěl podkovat Doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za jeho odborné vedení, ochotu a trpělivost, které mi poskytoval při práci v laboratoři a při psaní této práce.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Poufřité laboratorní metody.....	2
2.1.1 Extrakce	2
2.1.2 Destilace.....	2
2.1.3 Chromatografie.....	3
2.1.3.1 Adsorp ní chromatografie	4
2.1.3.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	6
2.1.3.3 Sloupcová chromatografie	8
2.2 Terpeny.....	9
2.2.1 Triterpeny.....	10
3. Praktická část	12
3.1 Poufřité metody práce	12
3.1.1 Provedení tenkovrstvé chromatografie	12
3.1.1.1 Příprava litých desek pro analytické provedení TLC (tzv. plastinek).....	12
3.1.1.2 Příprava litých desek pro preparativní provedení TLC	12
3.1.1.3 Provedení analytických TLC a jejich detekce	13
3.1.1.4 Provedení preparativních TLC a jejich detekce.....	13
3.1.1.5 Zpracování preparativních TLC.....	14
3.1.2 Provedení sloupcových chromatografií	15
3.2 Izolace 23-hydroxybetulinu.....	16
3.2.1 Extrakce k řy je ábu obecného	16
3.2.2 Preparativní TLC ethanolického extraktu k řy je ábu obecného (S _{JK})	17
3.2.3 Sloupcová chromatografie extraktu k řy je ábu obecného	21
3.2.3.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakce S _{2/14-21}	29
3.2.4 Sloupcová chromatografie S ₃	30
3.2.4.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku S _{3/2}	34
3.2.4.1.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku S _{3/2I}	38
3.3 Acetylace 23-hydroxybetulinu.....	41
4. Záv ěr	43
5. Seznam poufřité literatury	44
6. Resumé.....	45

1. Úvod

23-hydroxybetulin je poměrně zajímavý triterpenický derivát odvozený od lupanu. Přítomnost této hydroxylové skupiny zcela mění jeho vlastnosti ve srovnání s betulinem. Projevuje se to jak ve fyzikálních vlastnostech, tak v jeho chování při chromatografování. Ve srovnání s betulinem se jeho rozpustnost zvyšuje v polárních rozpouštědlech a naopak v nepolárních rozpouštědlech jeho rozpustnost klesá. Toho se dá využít i při jeho izolaci z přírodního materiálu. Při chromatografickém srovnání lupeolu, betulinu a 23-hydroxybetulinu se přítomnost v této polo hydroxylových skupin v molekule projevuje snížením pohyblivosti na silikagelu. I této vlastnosti lze s výhodou při izolaci využít.

V literatuře jsou popsány jednoduché reakce charakteristické pro primární triterpenoidních hydroxyderivátů. K těm nejjednodušším patří acetylace, které se účelově používá k ochraně hydroxylových skupin například před nechtěnými oxidacemi. Protože dosud nebyl získán plně acetylovaný 23-hydroxybetulin v krystalické formě, stálo by za to se o to pokusit.

Tato bakalářská práce je rozdělena na praktickou a teoretickou část. V teoretické části uvádím základní informace ke stávajícím postupům následně použitých k izolaci 23-hydroxybetulinu. Praktická část se hlavně zabývá samotnou izolací tohoto triterpenu.

2. Teoretická část

2.1 Použité laboratorní metody

Při zpracování této práce byly používány běžné techniky práce užívané v základním cvičení z organické chemie. Na dalších stránkách se vnuji vybraným metodám, které pro zpracování práce mají klíčový význam.

2.1.1 Extrakce

Extrakce je metoda využívaná k izolaci látek, s velkým úspěchem se využívá při izolaci přírodních látek. K izolaci látek se používá vhodného rozpouštědla. Důležitým faktorem pro účinnost extrakce je rozpustnost látky v rozpouštědle a rychlost jejího přechodu z pevné látky do kapaliny (pevná látka se pro zvýšení účinnosti upravuje ztvrdnutím povrchu například roztíráním, mletím, granulováním). Extrahovaná látka musí být v roztoku stálá, vlivem rozpouštědla nesmí docházet k jejím změnám. Použité rozpouštědlo by mělo jít z extraktu snadno beze zbytku odstranit (destilací, odpařením, apod.). Nezbytným faktorem je jeho čistota a stálost.

Podle podmínek, za kterých extrakce probíhá, ji lze rozdělit na několik typů: macerace, digesce, perkolace, vytěpávání (roztěpávání) a perforace. Při maceraci, digesti a perkolaci se jedná o extrakci látky z pevné fáze do kapaliny, při digesti a maceraci je navíc extrakce podpořena zvýšenou teplotou. Vytěpávání a perforace probíhá mezi dvěma kapalnými fázemi¹.

Jako zařízení pro extrakci se používají velká množství extraktorů rozličných typů například extraktory pracující automaticky (Soxhletův extraktor, Gräfov extraktor), extraktory pro malá kvanta látek (miniextraktor podle Blounta, miniextraktor podle Haanena a Baduma), extraktory pro velká kvanta látek (Appelzweigův extraktor). Podrobnější informace o typech extraktorů lze najít v literatuře^{2,3,4}. Při sestavování aparatur pro extrakci je nejvhodnější používat zábrusových spojů, v žádném případě se nesmí používat gumové zátky, které jsou napadány organickými rozpouštědly.

2.1.2 Destilace

Destilace slouží k dělení a čištění kapalných látek. Využívá odlišného bodu varu kapalin dělené směsi nebo lze destilaci využít pro oddělení kapalin od málo těkavých

látek. Při dělení více kapalných látek, se vznikající plynná fáze od kapalné liší složením, následný destilát je bohatší na těžší složku směsi¹.

Destilační metody se dělí na destilaci prostou, frakční, destilaci za sníženého tlaku a destilaci s vodní párou. Prostá destilace se využívá k oddělování kapalných látek s velmi rozdílnou hodnotou bodu varu, pro úplné rozdělení složek směsi je nutný rozdíl v bodech varu alespoň o 150 °C. Prostou destilaci je téměř možno využít k oddělení kapalin od netěkavých látek. K dělení kapalných látek o blízkém bodu varu se používá destilace frakční. Destilace za sníženého tlaku umožňuje destilaci látek, které se rozkládají už za nižších teplot než je jejich bod varu. Destilace s vodní párou se užívá k oddělení těch látek, které tečou s vodní párou při nižší teplotě než je jejich bod varu¹.

Destilační aparatura se skládá ze zdroje tepla, z chladiče (např. Liebigův chladič, kuličkový chladič), z varné baňky a z alonfle (často se používá jeřáb teploř). Při zahřívání kapaliny nesmíme zapomenout přidat do varné baňky varný kamínek k zabránění utajeného varu. Destilaci je téměř možno využít ke kontrole čistoty a ke stanovení bodu varu tekutin.

2.1.3 Chromatografie

Chromatografie patří k významným separačním metodám využívaným v chemických laboratořích. Vznik chromatografie jako vlnění oboru je popisován ruskému chemikovi a botanikovi Cvetovi. Ten jako první využil chromatografické postupy k dělení rostlinných barviv. Práv díky Cvetovým pokusům získala chromatografie své pojmenování, český výraz chroma znamená barva a grafie vychází z českého grafó neboli písmo. Chromatografie neslouží pouze k dělení barvených látek, jak by mohl její název napovídat, ale uplatňuje se hlavně u látek bezbarvých⁵.

Chromatografické metody jsou založeny na využití dvou fází: mobilní (pohyblivé), kterou může být kapalina nebo plyn, a stacionární (nepohyblivé), tou je pevná látka nebo kapalina. Tyto dvě fáze jsou navzájem nemísitelné a složky dělené směsí rozdílně migrují v systému těchto dvou fází. Složky mají rozdílnou afinitu k daným fázím^{4,6}.

Kritérií dělení chromatografických metod je mnoho. Mohou se dělit podle podstaty dělicího procesu, tj. na chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontovým směsí a gelovou. Dalšími způsoby dělení je rozlišení podle uspořádání stacionární fáze, tedy na sloupcovou a plošnou chromatografii. Často užíváním je rozdělení dle

skupenství mobilní fáze: kapalinová a plynová chromatografie. V literatuře⁴ lze najít i další způsoby dělení například podle účelu chromatografie, dle pracovního provedení. Rozdílné způsoby dělení chromatografií se navzájem překrývají (viz. tabulka 1).

Tabulka 1 **Rozdělení chromatografických metod** (převzato z literatury⁷)

		STACIONÁRNÍ (ZAKOTVENÁ) FÁZE	
		pevná látka	kapalina
MOBILNÍ (POHYBLIVÁ) FÁZE	kapalina	Adsorpční chromatografie 1) Sloupcová chromatografie 2) Tenkovrstvá chromatografie a) na sypaných vrstvách b) na vrstvách s pojivem	Rozdlovací chromatografie 1) Papírová chromatografie 2) Kapalinová chromatografie 3) Rozdlovací sloupcová chromatografie
	plyn	Adsorpční plynová chromatografie	Rozdlovací plynová chromatografie

2.1.3.1 Adsorpční chromatografie

Princip rozdělení látek mezi dvě fáze je založen na rozdílné adsorpci dělených látek na povrchu adsorbentu. Adsorpční proces se vyvíjí u tenkovrstvé a sloupcové chromatografie.

Adsorpce vzniká vlivem rozdílu v intenzitách sil, kterými na sebe navzájem působí částice v rozhraní fází. Tyto síly jsou velmi rozdílných druhů - od slabých fyzikálních (například sil van der Waalových), které jsou například tzv. adsorpce fyzikální, až po velmi silné, které se svou intenzitou blíží chemické vazbě (tzv. chemisorpce)³.

Obecně se dá adsorbent charakterizovat jako látka s pórovitou strukturou, která je schopná na svém povrchu reversibilně vázat jiné chemické sloučeniny. Adsorbent tvořící stacionární fázi musí splňovat konkrétní požadavky, musí být v mobilní fázi nerozpustný a nesmí s ní reagovat. Zároveň musí být inertní k chromatografovaným látkám. Dalším požadavkem je velká adsorpční kapacita, ta souvisí s velikostí, tvarem a pórovitostí částic adsorbentu. Neméně důležitou vlastností je selektivnost adsorbentu, která by měla zajistit, co nejvíce rozdíly v adsorptivnosti jednotlivých látek dělených směsí^{3,4}.

Adsorbenty se na základ svých vlastností d ílí na adsorbenty polární a nepolární. Adsorpce u polárních adsorbent probíhá pomocí interakcí ion-dipól a dipól-dipól. Nepolární adsorbenty fungují p eváfn na základ van der Waalsových sil.

P i hledání vhodného adsorbentu pro d lení dané sm si látek vycházíme z údaj v literatu e a drfíme se zásady, fle vfdy volíme adsorbent, na jehofl povrchu se jednotlivé látky neváfí p íli-pevn . Pokud nem fleme vycházet z literárních údaj , jsme nuceni orientovat se p edb fnými pokusy: zkou-íme vfdy d lení pomocí aktivn j-ího adsorbentu, jsou-li na n m látky adsorbovány p íli-pevn a nelze je vymýt ani polárn j-ími rozpou-t dly, volíme adsorbent o niř-ím stupni aktivity, atd. Pokud ani to nevede k cíli, p ejdeme na jiný adsorbent⁶.

Nej ast ji uřfvanými adsorbenty jsou silikagel, oxid hlinitý, uhlí itan vápenatý i aktivní uhlí. Silikagel je inertní polární adsorbent s velkou adsorp ní aktivitou. Vyrábí se mnoho typ s r znou velikostí pór (od 2 do 15 nm⁶). Silikagel je tvo en vazbami Si-O a hydroxylovými skupinami. Na silikagelu se pevn ji vářf bazické látky, nebo sám silikagel je donorem proton (má povahu slabé kyseliny). Dal-ím asto uřfvaným adsorbentem je oxid hlinitý, který se vyrábí jako alkalický, neutrální i kyselý. Nejvýhodn j-í je uřfítí Al₂O₃ p i d lení st edn polárních látek.

Krom vlastností adsorbentu má na adsorpci vliv také chemické slofení chromatografovaných látek a slofení a vlastnosti rozpou-t del pouřfítých jako mobilní fáze.

Organické látky vykazují jinou schopnost adsorpce p i pouřfítí polárního adsorbentu a p i uřfítí nepolárního adsorbentu. P i pouřfítí polárních adsorbent záleřfí hlavn na po tu a charakteru polárních funk ních skupin v molekule adsorbované látky³. Jsou vypracovány ady, v nichfl jsou funk ní skupiny se azeny podle míry adsorptivity na polárních adsorbentech. Nap . ada R-SO₃H, R-COOH, R-CONH₂, R-OH, R-NH₂, R-COOCH₃, R₁-NH-R₂, R-NO₂, R-OCH₃, R-Cl, R-H (se azena podle klesající adsorptivity na polárním adsorbentu)⁶. U nepolárních adsorbent ovliv uje míru adsorptivity p edev-ím velikost molekuly chromatografované látky.

Na pevnost adsorpce má samoz ejm vliv také rozpou-t dlo. Na povrch adsorbentu se neváfí jen molekuly chromatografovaných látek, ale i molekuly pouřfitého rozpou-t dla. Molekuly chromatografované látky řsoupe řo o mořfnost vázat se na adsorbent. Pokud je rozpou-t dlo polárn j-í nefl chromatografovaná látka, vyt s uje ji z míst adsorpce, tedy mobilní fáze vymývá chromatografovanou látku. Polární rozpou-t dlo se váře na polární adsorbent tím siln ji, řm je polárn j-í (u

nepolárních adsorbent je tomu naopak). Podle polarit y byla rozpou-t dla se azena do tzv. eluotropické ady. Nejvy-í lenové této ady mají nejv t-í adsorptivitu, tudífl jsou nejlep-ími eluenty, nejnífl-í lenové jsou vhodnými rozpou-t dly k jemnému chromatografickému d lení. Ne vřdy vyhovují pro chromatografické d lení vlastnosti istých rozpou-t del, proto se p i chromatografii vyufflvají téfl sm si rozpou-t del, a to zejména p i d lení látek s blízskou adsorptivností. V takovém p ípad poufflváme rozpou-t dla, která spolu v eluotropické ad sousedí. P idáváme polárn j-í rozpou-t dlo k mén polárnímu. Podíly polárn j-ího rozpou-t dla zvy-ujeme pomalu (nejprve p idáváme ádov procenta polárn j-ího rozpou-t dla a podle pot eby postupujeme afl na 50 % sm s). Tento postup poufflváme z d vodu, fle vlastnosti sm si se p iblíflují více vlastnostem polárn j-ího rozpou-t dla. Polárn j-í slofka sm si se siln ji adsorbuje a vyt s uje tím slab ji vázané látky, i alespo zrychluje postup adsorbovaných látek^{3,4}.

D leflitým faktorem pro adsorpci je téfl rozpustnost chromatografované látky v rozpou-t dle. V p ípad , kdy se látky rozpou-t jí p íli- snadno, hrozí, fle se nebudou dostate n siln poutat na adsorbent. Pro správný pr b h chromatografie a pro její reprezentativní výsledky je samoz ejm nezbytné, aby se v-echny látky úpln rozpustily.

Samoz ejmostí je vysoká istota ufflváných rozpou-t del. P ípadné ne istoty by mohly m nit vlastnosti rozpou-t dla nebo zne i- ovat produkty chromatografie.

2.1.3.2 Chromatografie na tenké vrstv (TLC)

Jedná se o nenáro nou a jednoduchou chromatografickou metodu. TLC nej ast ji funguje na adsorp ním principu, d lené látky jsou mobilní fází uná-eny tenkou vrstvou jemnozrného adsorbentu.

Vrstva adsorbentu m fle být na podlofkách nanesena bu ve form fixovaných tenkých vrstev, jejichfl sou ástí je pojivo (nej ast ji sádra nebo -krob), nebo lze pouflít sypané tenké vrstvy (nevýhodou je malá mechanická stabilita). Krom vrstev p ípravovaných v laborato i lze pouflít komer n vyráb né vrstvy (obvykle vrstva adsorbentu na hliníkové folii)⁶.

Chromatografii na tenkých vrstvách je mořno pouflít jako analytickou nebo preparativní metodu.

Analytická chromatografie na tenkých vrstvách slouřlí k ov ování sloření a istoty produkt , ke sledování pr b hu reakcí nebo pomocí ní ur ujeme vhodnou

mobilitní fázi pro preparativní tenkovrstvou chromatografii a sloupcovou chromatografii. Tenkovrstvou chromatografií lze také zjišťovat identitu konkrétní látky. Na jednu chromatografickou desku nanese se zjišťovaná látka a známou látku (standard). Po vyjetí chromatogramu snadno zjistíme, zda se jedná o stejné látky. V takovém případě se stopy obou látek objeví ve stejné vzdálenosti od startu, mají stejný retenční faktor (R_F)⁵. Hlavní výhodou této metody je minimální spotřeba látek. Preparativní TLC slouží k delší separaci složek směsí látek, umožňuje získávat jednotlivé látky ze směsi. Preparativní provedení TLC má oproti sloupcové chromatografii několik výhod: možnost separace, možnost mechanického oddělení rozdělených látek, možnost opakovaného vyvíjení a snadná realizace libovolného potu chromatogramu a nenáročnost zařízením⁶.

Rozdíl mezi analytickým a preparativním provedením je ve velikosti chromatografických desek. Zatímco při analytickém provedení používáme podloží mikroskopická skleněná, při provedení preparativním se užívají skleněné desky o velikosti 20 x 20 cm. Dalším rozdílem mezi analytickým a preparativním provedením je způsob nanášení vzorků. Při analytickém uspořádání se na desku kladou vzorky pomocí kapilár (mikropipet) ve formě oddělených bodů (přibližně 0,5 cm a 1 cm od sebe). Na preparativní desku se vzorek nanáší jako tenký souvislý prouflek.

Pomocí tenkovrstvé chromatografie můžeme odlišit látky barevné i bezbarvé. U látek bezbarvých se musí po proběhnutí chromatografie přistoupit k detekci. Tu lze provést různými metodami selektivními, specifickými nebo univerzálními, například detekce pomocí UV záření (u adsorbentů s fluorescenčním indikátorem), postříkáním 10% roztokem kyseliny sírovou a následným vypálením na vařící vodě (při použití silikagelu, kde je sídla jako pojivo). Pokud provádíme preparativní TLC musíme volit metody, které nevyvolávají změny dělených látek nebo jejich destrukci. V případě, kdy volíme destruktivní metodu, použijeme ji pouze na úzký pás chromatografické desky (například při použití hliníkového odporového drátu, drátem se dotkneme ve dvou místech ve směru startu⁵, zahřejeme organické látky před sejmutím zón odstraníme sekrábnutím vypálených pásů).

Definivním faktorem, kterým se identifikují dělené látky, je tzv. retenční faktor (R_F). Ten se vypočítá jako vzdálenost stopy od startu dělené vzdáleností elučního rozpouštědla od startu. Retenční faktor je charakteristickou veličinou pro konkrétní látku v konkrétním rozpouštědle nebo směsi rozpouštědla na konkrétním nosiči⁵.

Samotná preparativní i analytická TLC probíhá ve vzestupném uspořádání, tj. spodní konec desky se vloží v chromatografické komoře do vyvíjecích rozpouštědel, hladina nesmí dosahovat až ke vzorkům. Vyrábí se mnoho typů chromatografických komor, nejčastěji se však užívají skleněná akvária různých rozměrů a jiné vhodné nádoby. Podmínkou však je, aby je bylo možno hermeticky uzavřít. Sypané vrstvy nesmí být příliš nakloněny a musí se do chromatografických komor vkládat úhelníkem (maximální sklon je 20°). Pro preparativní i analytické provedení se užívají stejné druhy adsorbentů.

Vzdálenost, kterou skvrna urazí při analýze na tenké vrstvě, závisí na polaritě látky a polaritě rozpouštědla. Polárnější látky jsou více zadržovány polárními skupinami silikagelu nebo jiné stacionární fáze. Na druhé straně látka o dané polaritě urazí v určité vzdálenosti při použití rozpouštědla o vyšší polaritě⁵.

Příprava desek pro TLC a její provedení je podrobně popsáno v praktické části této bakalářské práce.

2.1.3.3 Sloupcová chromatografie

Při sloupcové chromatografii dochází k dělení látek na sloupci adsorbentu. V literatuře³ je uváděno nejvhodnější množství adsorbentu ufitého na sloupec jako 30 až 200 násobek hmotnosti dělené směsí. Jako zařízení se pro sloupcovou chromatografii užívají skleněné trubice, které jsou na spodním konci zúžené a opatřené kohoutem (na dno se ještě vloží chomáček vaty, aby se adsorbent nevysypával). Délka a průměr trubice se pro konkrétní dělení určuje podle množství adsorbentu. Zpravidla volíme trubici takových rozměrů, aby v ní umístěný adsorbent tvořil sloupec, jehož délka je v poměru s délkou asi 1:5 až 1:20, nejčastěji 1:10. Při volbě délky skleněné trubice nesmíme zapomenout, že trubice musí být vyprázdněná sloupec adsorbentu, protože nad adsorbentem musí zůstat prostor pro nalití roztoku dělených látek a pro přelévání rozpouštědla.

Sloupec musí být homogenní, jinak by docházelo k nepravidelnostem při dělení nebo dokonce k zničení celé práce. Dělené je ponechat jít sloupec během chromatografie vyschnout. Důležité je k narušení pravidelnosti chromatogramu. Chromatografované látky vléváme na sloupec ve formě koncentrovaného roztoku.

Sloupcová chromatografie se může dělit na klasickou (Cvrtou) chromatografii a promývací chromatografii. Tyto dva typy se rozlišují podle dalšího zpracování. Při

klasické sloupcové chromatografii se sloupec adsorbentu, na kterém jsou látky dle jejich polarit rozděleny do pásů, vytlačí ze skleněné trubice a následně rozefluje na jednotlivé pásy. Z těchto částí sloupce se zadržované látky následně vymyjí. Při promývací chromatografii se po rozdělení látek na sloupci adsorbent z trubice nevytlačí, nýbrž se nadále pokračuje v promývání sloupce. Jednotlivé pásy látek se ze sloupce vymyjí do jednotlivých rozpouštědel do předem připravených nádob. U bezbarvých látek se jednotlivé rozpouštědla pro vymývání látek stanoví jako určité procento zádrže chromatografického sloupce (zádrž je množství kapalin, které je sloupec schopen zachytit). K vymývání sloupce se v první řadě používá rozpouštědel, za nimiž se od nejméně polárních a podle potřeby se pokračuje k více polárním.

Samotné provedení sloupcové chromatografie je uvedeno v praktické části této bakalářské práce.

2.2 Terpeny

Terpeny (terpenoidy) jsou přírodní látky lipidového charakteru, které spolu se steroidy patří do skupiny isoprenoidů. Terpeny tvoří hlavní součást rostlinných silic, pryskyřic a balzámů, například terpen limonen je součástí citronové silice. Především vyšší terpeny mají významné fyziologické účinky, také mezi ně patří známá barviva (například fytoerol, lykopen). V současné době je známo více než 22 000 rozmanitých terpenoidů⁸. Terpeny vykazují velkou strukturní rozmanitost, ale všechny jsou navzájem příbuzné. Všechny lze odvodit z jednoduché pětičlenné jednotky - isoprenu (2-methylbuta-1,3-dien). Podle tzv. isoprenového pravidla si lze představit, že vznikají spojováním isoprenových jednotek v pořadí hlava-pata. Jako hlava isoprenové jednotky se označuje atom uhlíku C₁, jako pata C₄⁸. Terpenoidy se dělí podle počtu isoprenových jednotek spojených dohromady (viz. tabulka 2).

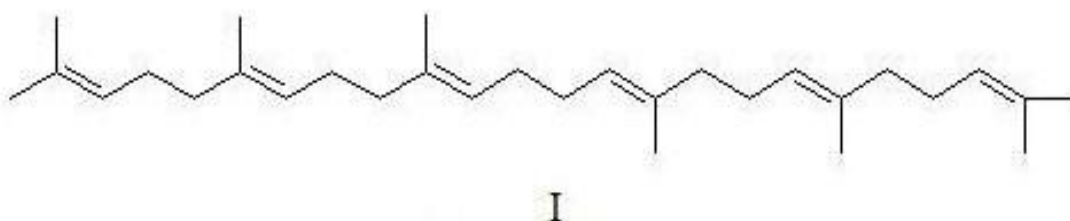
Tabulka 2 **Rozdělení terpenů**

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

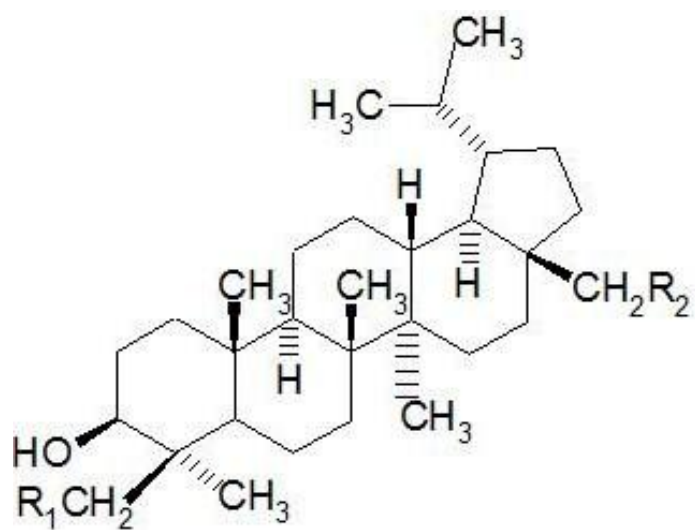
Odvozování terpenů od isoprenu je pouze formální. V přírodě se terpeny odvozují od jednoduchých acyklických prekurzorů typu geraniolu (C₁₀), farnesolu (C₁₅), geranylgeraniolu (C₂₀) a skvalenu (C₃₀)⁹.

2.2.1 Triterpeny

Triterpeny mají skelet tvořený 30-ti uhlíky. V přírodě se vyskytují volné nebo vázané ve formě etherů, glykosidů a různých esterů. Mají širokou paletu biologických aktivit například antimikrobiální, protivirové, protizánětlivé, protinádorové a mnohé další¹⁰. Triterpeny vznikají ze skvalenu jeho cyklizací. Samotný vznik skvalenu začíná u acetylkoenzymu A, z jehož dvou molekul vzniká kondenzací acetoacetylkoenzym A. Z acetoacetylkoenzymu A vzniká přes sled několika reakcí mevalonová kyselina, z níž přes několik mezikroků vzniká isopentenylidifosfát, ten se přes několik mezikroků přeměňuje na geranylidifosfát, z něhož vzniká farnesyldifosfát. Symetrickým zdvojením farnesyldifosfátu vzniká skvalen⁹ (I).



Skvalen cyklizuje přes několik rozlišených konformací svého řetězce. Při vzniku triterpenů lupanového typu se uplatňuje tzv. dammaranový typ skeletu. Přeměnou dammaranového prekurzoru vzniká skelet lupanový jehož velmi rozšířeným zástupcem je lupeol (II), od kterého se odvozuje betulín (III), zastoupený například v břízové kůře⁷ a 23-hydroxybetulín (IV), obsažený v kůře jeřábu obecného. Vznik triterpenů je poměrně složitý proces probíhající přes velké množství reakcí a meziproduktů. Tento proces je v literatuře dobře popsán a tato práce se jím nezabývá.



	R ₁	R ₂
II	H	H
III	H	-OH
IV	-OH	-OH

3. Praktická část

3.1 Použité metody práce

Protože se v práci opakovaly použité postupy, uvádím je v úvodu této části práce s tím, že na dalších místech budu jejich užití pouze konstatovat.

3.1.1 Provedení tenkovrstvé chromatografie

3.1.1.1 Příprava litých desek pro analytické provedení TLC (tzv. plastinek)

Na skleněnou podložku bylo vedle sebe vyrovnáno 36 podložních mikroskopických sklíček. V každé bylo rozmícháno 36 g silikagelu Merck (Kieselgel 60 G) v 83 ml destilované vody. Suspenze silikagelu byla vлита na vyrovnaná sklíčka. Poté byla suspenze za pomoci skleněné tyčinky, která měla na obou koncích kousky pryžové hadice (tloušťka odpovídala výšce sklíček dohromady s požadovanou výškou vrstvy), rovnoměrně rozložena po celé ploše sklíček. Po úplném zaschnutí celé vrstvy se jednotlivá sklíčka od sebe odlamují.

3.1.1.2 Příprava litých desek pro preparativní provedení TLC

Skleněná deska (20 cm x 20 cm) byla nejprve důkladně očištěna, aby se odstranily případné zbytky organických látek. Byla omyta ethanolem a následně opláchnuta destilovanou vodou. Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 25 g silikagelu Merck (Kieselgel 60 G). K tomuto množství silikagelu bylo přidáno 55 ml destilované vody, následně byl obsah baňky promíchán protřepáním krouživými pohyby. Smícháním vznikla nepříliš hustá suspenze (musí mít takovou konzistenci, aby dobře nanášela na skleněnou desku, nesmí být příliš hustá ani tekutá). Tato suspenze byla nalévána, v kruzích směrem od středu ke krajům, na navlhčenou skleněnou desku. Hrdlem baňky byla suspenze následně rozložena rovnoměrně po celém jejím povrchu až k okrajům desky. Na konec byla deska drfena pouze na břících prsty jedné ruky a druhou rukou bylo zespodu na desku mírně poklepáváno, tím byly odstraněny případné nerovnosti. Jestliže je suspenze nanášena v rovnoměrné vrstvě, lze ověřit, pokud se na desku podíváme vodorovně proti světlu. Stejným způsobem byly připraveny další desky.

3.1.1.3 Provedení analytických TLC a jejich detekce

Při analytických TLC byla používána chromatografická folie DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄. Pro detekci bezbarvých organických látek byl u chromatografií prováděn postik 10% ní kyselinou sírovou a vypálení na elektrickém vaříci.

Z chromatografické folie byl pro TLC zkoušku odstříhán velikostně odpovídající kousek a pomocí kapilár byly na folii bodovnaneseny vzorky sledovaných látek. Body od sebe byly vzdáleny asi 0,5 cm. Po odpaření rozpouštědla byla tenká vrstva spodním koncem vložená do rozpouštědla v chromatografické komoře (roztok dosahoval několik milimetrů pod nanesené vzorky). V chromatografické komoře byla ponechána, než rozpouštědla vystoupala pár milimetrů pod horní okraj folie, a poté byla pomocí pinzety vyndána z chromatografické komory. Ihned po vyjmutí z komory byla tenká vrstva postříkána 10% ní kyselinou sírovou. Po postřiku byl chromatogram vypálen na vaříci. Když se na tenké vrstvě objevily organické látky jako zuhelnalé stopy, byla zvaříce sejmuta.

3.1.1.4 Provedení preparativních TLC a jejich detekce

Vzorek byl rozpouštěn v malém množství rozpouštědla (1 až 2 ml). Balonek byl zahát nad vařícem, a pak do něj byl nasát nepatrný podíl roztoku. Opět byl balonek zahát nad vařícem, čímž se roztok vypařil a páry ethanolu z balonku vytlačily vzhůru vzduchu. Následně byl zahátý balonek ponořen kapilárním koncem pod hladinu roztoku a došlo k nasátí veškerého roztoku do balonku. Pomocí naplněného balonku byl asi 2 cm od spodního konce lité vrstvy nanesen souvislý prouflek roztoku (od levého i pravého okraje bylo ponecháno pár milimetrů volných, aby roztok nestekl na hranu sklené desky). Pokud z balonku roztok pouze vykapával, byla kladena jedna kapka vedle druhé. Po nanesení celého obsahu balonku, byl balonek vypláchnut malým množstvím rozpouštědla a obsah byl vypuštěn na předem vysušenou stopu dříve naneseného vzorku. Při nanášení vzorku byla snaha, aby bylo po celé šířce lité vrstvy naneseno stejné množství vzorku a zároveň byl vznikající prouflek co nejúhelnější.

Po odpaření veškerého rozpouštědla byla deska vložená do akvária se smíšením rozpouštědla tak, aby se stopa nesměřela a rozpouštědlo k ní muselo vzlihnout. Akvárium bylo uzavřeno a utěsněno, aby z něj nemohly utíkat páry rozpouštědla. K utěsnění byl použit molitan zabalený v polyethylen (přesahoval přes okraje akvária), na ten byla položena sklená deska a několik knih, aby molitan dobře přilnul k akváriu a řádně

t snil. Pokud by tomu tak nebylo, mohlo by na chromatografické desce docházet k nefádoucím jevům, je-li by nepřízniv ovlivovaly například chromaturie (například deformace stop). Když se rozpouštědel dostalo téměř k hornímu okraji desky, byla chromatografická deska z akvária vyndána a na vzduchu se z ní nechala odpařit veškerá rozpouštědla.

Po vyjmutí preparativní desky z akvária a po odpaření veškerých rozpouštědel byl k detekci organických látek použit fluhavený odporový drát. Odporovým drátem byly na desce vypáleny dva pruhy ve směru start-elu. V místech, kde byly obsaženy složky dle směsi, došlo ke zhuštění v důsledku uhořelání organické látky¹¹.

3.1.1.5 Zpracování preparativních TLC

Po vypálení stop odporovým drátem bylo připraveno k sejmutí jednotlivých oblastí z desky. Jednotlivé oblasti, ve kterých se objevily organické látky, byly na desce přehledně vyznačeny a poté byly zhořelé stopy z desky sekrábnuty, aby nedošlo ke znehodnocení vzorků rozkladnými produkty. Pak byly jednotlivé oblasti z desky sejmuty za pomoci dlouhého pravítka, které bylo zaryto do vrstvy silikagelu a opatrnými tahy ze strany na stranu se jím povedlo vrstvu silikagelu z desky stáhnout. Jednotlivé oblasti byly po sundání z desky rozmístěny mezi dvěma listy křídového papíru na jemný prášek.

Rozmístěný silikagel byl následně po částech vsypáván do skleněných trubic, jejichž spodní konec byl utěsněn smotkem vaty. Vždy po přidání části silikagelu bylo trubicí poklepáno o dřevěnou desku, aby se silikagel sklepal a vytěsnil se ze sloupce vzduch (čle je silikagel dobře sklepan lze poznat podle dutého zvuku, který při poklepání zazní). Trubice byly upevněny ke stojanu a následně byly po několik dní promývány rozpouštědly. Prokapávající roztok byl z trubic jímán do předem zvážených baněk.

Po promytí sloupce bylo připraveno k destilaci. Byla sestavena destilační aparatura podle obrázku 1.



Obr. 1 Destilační aparatura

1. baňka, ve které se sbírá oddestilované rozpouštědlo
2. chladič připojený k vodovodu
3. baňka se vzorkem
4. laboratorní hnízdo suché 50 ml

Baňky s roztoky byly jedna po druhé připojeny k chladiči a byla z nich oddestilována rozpouštědla. Vzorky nebyly oddestilovány až do sucha. Když v baňce zůstalo malé množství kapaliny, byl odpojen chladič a za soustředění baňkou v topném hnízdě byl zbytek rozpouštědla odpařen k suchu. Poté byly z baňky páry rozpouštědla odsávy pomocí vodní vývěvy. Baňky se získanými vzorky byly dány do sušárny ($t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), po vyjmutí ze sušárny byly baňky ještě jednou připojeny k vývěvě a po vychladnutí na vzduchu zváženy.

Pozn.: Při destilaci je důležité zpočátku hlídat teplotu. Pokud se topné hnízdo nastaví na příliš vysokou teplotu, roztok v baňce za nepříznivých okolností může vybublávat až do chladiče, z čehož pak vyteče do baňky, v níž se sbírá oddestilované rozpouštědlo. Pokud k takovému případu dojde, musí se veškerý roztok z této baňky nalít zpět do baňky se vzorkem a destilovat od začátku. Po předestilování části rozpouštědla je nutné, ještě tento podíl vrátit do baňky se vzorkem, aby se dostatečně vymyl chladič.

3.1.2 Provedení sloupcových chromatografií

Byla připravena chromatografická kolona. Do skleněné trubice, jejíž konec byl utěsněn smotkem vaty, bylo po částech nasypáno 30 g silikagelu. Po přidání každé části

bylo trubicí několikrát poklepáno o dřevnou podložku, aby se silikagel v trubici dobře utopil (vytlačil se ze sloupce vzduch). Takto naplněná trubice byla pomocí drátů připevněna ke stojanu.

Roztok vzorku byl opatrně za pomoci skleněné tyčinky vlit z odměrného válce na sloupec silikagelu. Pod chromatografickou trubicí byl postaven druhý odměrný válec, do kterého bylo jímáno protečené rozpouštědlo. Z množství roztoku, které bylo na sloupec nalito, a z množství protečených rozpouštědel byla určena zádržlivost chromatografického sloupce. Podle velikosti zádržlivosti byla určena velikost podílů určených k promývání sloupce. Poté byly na sloupec nalévány jednotlivé podíly rozpouštědel, které byly jímány do předem zvážených baněk.

Byla sestavena destilační aparatura podle obrázku 1. Baněka byla připojena k chladiči a byla z ní oddestilována rozpouštědla. Vzorek nebyl oddestilován až do sucha. Když v baněce zůstalo malé množství kapaliny, byl odpojen chladič a za soustředěného otáčení baněkou v topném hnízde byl zbytek rozpouštědel odpařen k suchu. Páry rozpouštědel byly z baněky odsáty pomocí vodní výfuky. Baněka byla poté vložena do sušárny, po vyndání ze sušárny byla baněka opět připojena k výfuce. Vychladlá baněka byla zvážena.

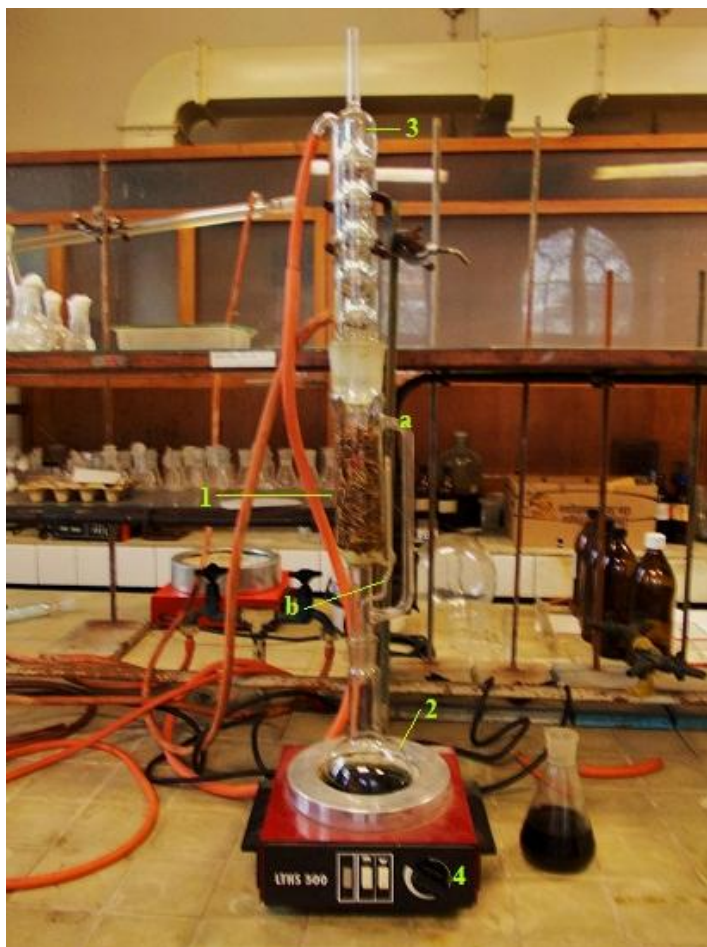
Tímto postupem byly zpracovány všechny frakce sloupcové chromatografie.

3.2 Izolace 23-hydroxybetulinu

3.2.1 Extrakce kůry jeřábu obecného

Kůra z mladých větviček jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia* L.) byla nasečána na malé kousky (kůra jde nejlépe se sloupnout z prvníků větviček, pokud větvičky seschnou, kůra se z nich špatně sloupává). Tato nasečaná kůra byla rozprostřena na dřevném podnosu a byla několik dní ponechána nad topením vyschnout. Vysušená kůra byla v malých kouscích nachována do Soxhletova extraktoru objemu 250 ml (k uchování lze použít skleněnou tyčinku), který byl připojen na chladič a varnou baněku objemu 500 ml vloženou do topného hnízda (viz obrázek 2). Extrakce ethanolem probíhala po dobu 15 hodin. Výsledkem extrakce byl zeleně zbarvený ethanolický extrakt kůry jeřábu obecného, označený jako S_{JK}. Množství jeřábové kůry použité k extrakci bylo 82,4 g. Extrakce byla provedena dvakrát (39 g a 43,4 g). Oba podíly byly spojeny do 500 ml baněky, ze které bylo následně oddestilováno rozpouštědlo.

Z 82,4 g k ry je ábu obecného bylo extrakcí získáno 11,54 g ethanolického extraktu k ry je ábu obecného (S_{JK}), což je 14 %.



Obr. 2 Extrakce k ry je ábu obecného ethanolem

1. Soxhlet v extraktor napln ěný k rou je ábu obecného
 - a) sklen ěná trubice, kterou p ěry rozpou ět ěla stoupaj ě do chlad ěe
 - b) trubi ka, kterou po napln ěn ě ekstrak ěn ěho prostoru nadestilovan ěm rozpou ět ělem extrakt p ěte ě do varn ě ba ky
2. varn ě ba ka s etanolem
3. chlad ě p ěpojen ě na vodovod
4. laboratorn ě hn ězdo such ě 500 ml

3.2.2 Preparativn ě TLC ethanolického extraktu k ry je ábu obecn ěho (S_{JK})

Nejprve byl na rozpou ěn ě extraktu S_{JK} vyzkou ěn chloroform, ale ěst extraktu se neda ilo rozpustit a v roztoku z st ěvaly drobn ě krystalky i po m ěrn ěm zah ět ěn ěm. Proto byl nakonec pro rozpou ěn ě extraktu pou ěit ethanol.

K preparativní tenkovrstvé chromatografii byly z extraktu odebrány tři vzorky: 1. 67,2 mg, 2. 69,6 mg, 3. 69,5 mg. Každý vzorek byl nanesen na vlastní TLC desku (litá vrstva silikagelu Merck). Nanášení vzorku a následné vyvíjení preparativní desky bylo provedeno dle postupu uvedeného v části 3.1.1.4.

Desky byly vyvíjeny ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 5:2. Každá deska byla v této směsi vyvíjena třikrát za sebou. Mezi jednotlivými vyvíjeními byl ponechán dostatečný čas na dokonalé odpaření rozpouštědel. Ke každému vyvíjení byla použita nová směs rozpouštědel, aby bylo zajištěno fládané složení směsi. Tento způsob provedení se nazývá vícenásobná eluce, jejíž princip spočívá v tom, že při opakovaném vyvíjení preparativní desky do rozpouštědla se jednotlivé pásy látek o nepatrných odlišných R_F stávají startem pro novou chromatografii¹¹.

U této preparativní tenkovrstvé chromatografie nebylo potřeba provádět detekci pomocí fluhaveného odporového drátu, protože po vyvíjení bylo na desce patrné přítomnosti zbarvených oblastí. Zóna nejdále od startu byla označena jako S1. Zóna s látkami, které zůstaly na startu, byla označena jako S5. Podle těchto oblastí byla litá vrstva rozdělena a dále byla tato preparativní TLC zpracovávána podle postupu popsaného v části 3.1.1.5.

Barevně si odpovídající pruhy byly ze všech tří desek sesypány vředy do jedné chromatografické trubice. K promývání připravených trubic byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Jednotlivé vzorky získané promytím byly popsány, látky vymyté ze zóny nacházející se nejdále od startu byly označeny jako frakce S₁. Látky, které se držely na startu, byly označeny za frakci S₅.

V tomto případě byly po prvním vážení bačky opět postaveny pod trubice, které byly ještě jednou promyty směsí n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Další den byla rozpouštědla z baněk oddestilována stejným způsobem, jak již bylo uvedeno. Vysušené a vychladlé bačky byly opět zváženy. Zjištěné hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 3.

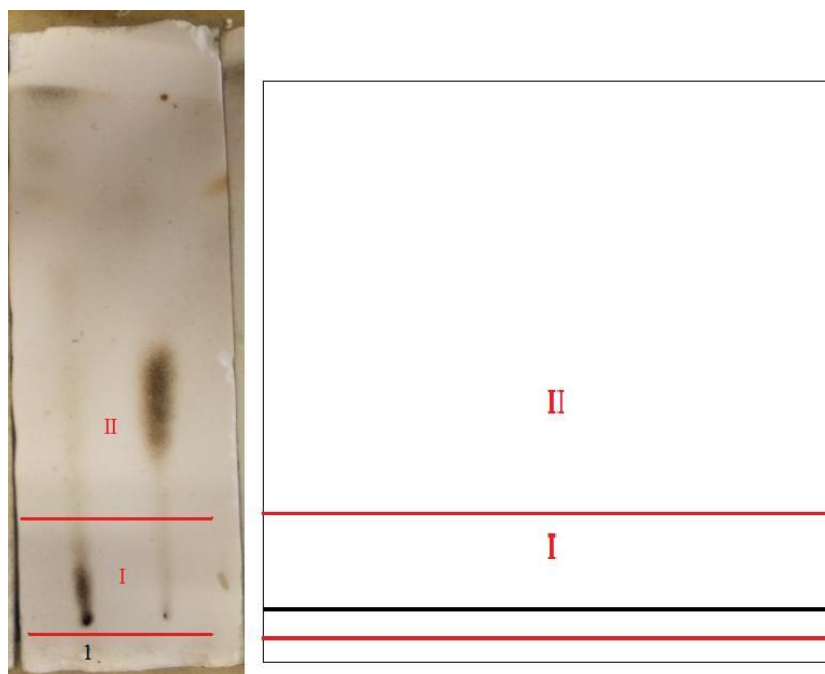
Tabulka 3 **Preparativní tenkovrstvá chromatografie extraktu S_{JK}**

Frakce	Hmotnost prázdné bačky	Hmotnost bačky při prvním vážení	Hmotnost bačky při konečném vážení	Hmotnost frakce
S ₁	103,4009 g	103,4337 g	103,4347 g	0,0338 g
S ₂	52,8701 g	52,8807 g	52,8812 g	0,0111 g
S ₃	46,4227 g	46,4378 g	46,4393 g	0,0166 g

S ₄	40,1719 g	40,1775 g	40,1782 g	0,0063 g
S ₅	54,5696 g	54,5847 g	54,5895 g	0,0199 g
Celková hmotnost vymytých organických látek				0,0877 g

Před samotným provedením preparativní tenkovrstvé chromatografie extraktu S_{JK}, byly provedeny analytické tenkovrstvé chromatografie. První TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10:3, druhá TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Po porovnání bylo z těchto chromatografií jasné patrné, že ethanolický extrakt kory je obecně obsahuje především méně pohyblivé organické látky. Na základě těchto zjištění bylo rozhodnuto použít pro promývání chromatografických trubic směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1.

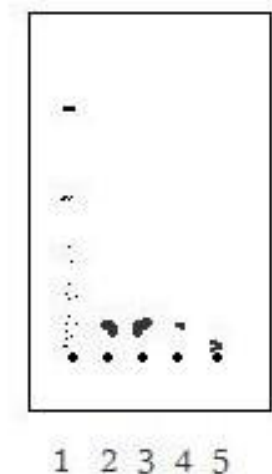
K této preparativní chromatografii byla též udělena analytická tenkovrstvá chromatografie na plastince. Na plastinku byl nanesen vzorek extraktu kory je obecně a nechal se vyvíjet ve stejné směsi rozpouštědel jako preparativní litá deska (směs 5:2). Pomocí této chromatografie bylo zjištěno, že se velká část organických látek drží blízko startu. Na preparativních deskách byla tato část rozdělena na ty i barevné zóny (porovnání je na obrázku 3).



Obr. 3 Porovnání analytické a preparativní TLC: stopa 1 je extrakt S_{JK}; oblast I byla na preparativních deskách rozdělena na ty i barevné zóny, oblast II obsahovala pohyblivější látky; pro analytickou i preparativní TLC byl použit

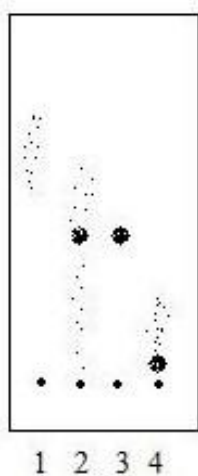
silikagel Merck (Kieselgel 60 G); ob tenkovrstvé chromatografie byly provedeny ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 5:2

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí S₁, S₂, S₃, S₄ a S₅ (viz. obrázek 4). TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Z této chromatografie bylo zji-t no, že frakce S₂, S₃ a S₄ obsahují obdobné látky, a tak byly tyto vzorky spojeny do jednoho, ozna en S₃.** Frakce S₁ obsahovala pohybliv j-í látky, frakce S₅ oproti tomu látky mén pohyblivé.



Obr. 4 Analytická TLC: 1. S₁, 2. S₂, 3. S₃, 4. S₄, 5. S₅

Byla provedena analytická TLC zkou-ka frakcí S₁, S₃ a S₅ spolu se vzorkem 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1, vyvíjení bylo provedeno dvakrát za sebou. **Výsledný chromatogram ukázal, že se hledaný 23-hydroxybetulin nacházel ve frakci S₃.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 5.



Obr. 5 Analytická TLC: 1. S₁, 2. S₃, 3. R634 B,B', 4. S₅

Pro preparativní tenkovrstvou chromatografií bylo celkem použito 206,3 mg ethanolického extraktu k ry je ábu obecného. Výsledkem chromatografického dělení bylo p t frakcí S₁, S₂, S₃, S₄ a S₅. **Z chromatografických trubic se poda ilo vymýt 87,7 mg organických látek. Výt fhost preparativní TLC byla 42,51 %. Frakce obsahující 23-hydroxybetulin váffily 34 mg, cofl je 38,7 %.**

3.2.3 Sloupcová chromatografie extraktu k ry je ábu obecného

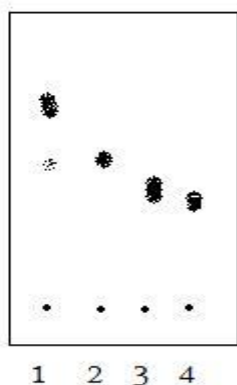
Z pevného extraktu k ry je ábu obecného (S_{JK}) bylo odebráno 1,0183 g extraktu. K tomuto množství extraktu bylo p ilito 10 ml ethyl-acetátu a roztok byl zah át na elektrickém va i i. Poté bylo k extraktu, rozpu-t ním v ethyl-acetátu, p ilito 28,5 ml n-hexanu. Po p idání n-hexanu se ze vzniklého roztoku vylou ily krystalky, které byly následn z roztoku odstran ny a vlofeny do su-árny k vysu-ení (vzorek S_A o hmotnosti 0,0580 g).

Sloupcová chromatografie byla provedena podle postupu popsaneho v ásti 3.1.2.

Extrakt k ry je ábu obecného byl rozpu-t n ve sm si ethyl-acetátu a n-hexanu a roztok byl vlit na sloupec silikagelu. Odm ný válec, ze kterého byl roztok na sloupec naléván, byl následn t ikrát vypláchnut 2 ml sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 2:1. Do chromatografické trubice bylo p ilito je-t dal-ích 5 ml sm si 2:1. Do trubice bylo celkem nalito 49,5 ml roztok , z trubice vytekl 1 ml istých rozpou-t del. Podle t chto údaj byla zádrfl chromatografického sloupce ur ena p iblífn 50 ml. Pro dal-í práci byly zvoleny frakce 25 ml (polovina zádrfle).

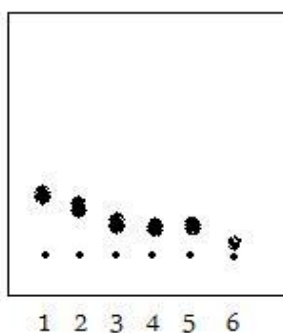
Nejprve byl sloupec promýván sm sí n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 2:1. Prvních 25 ml bylo nalito na sloupec a nechalo se protéct do ba ky, vzorek byl ozna en za frakci S_{2/1}. Dal-í vzorky, získané promytím sloupce sm sí 2:1, byly ozna eny jako frakce S_{2/2} afl S_{2/9}. Od frakce S_{2/10} do frakce S_{2/30-32} byl sloupec promýván 25 ml podíly sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. Od frakce S_{2/16} byly podíly jímány po t ech do jedné ba ky, tudífl byly získány frakce S_{2/16-18}, S_{2/19-21}, S_{2/22-24}, S_{2/25-27}, S_{2/28-30}. Od frakce S_{2/31-33} byl sloupec promýván istým ethyl-acetátem, jednalo se o frakce S_{2/31-33} a S_{2/34-36}. Poslední frakce byly získány promytím sloupce istým ethanolom. Frakce S_{2/37-39} byla je-t ve sm si ethanolu s ethyl-acetátem (ethyl-acetát, který zbyl ve sloupci po promývání), frakce S_{2/40-42} a S_{2/43-45} ufl byly vymyty istým ethanolom.

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí $S_{2/1}$ a $S_{2/4}$. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 2:1. **Výsledek zkou-ky ukázal, že každá frakce obsahovala jiné látky.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 6.



Obr. 6 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/1}$, 2. $S_{2/2}$, 3. $S_{2/3}$, 4. $S_{2/4}$

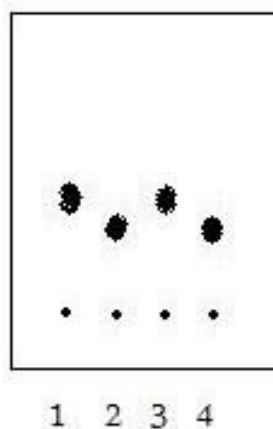
Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí $S_{2/4}$ a $S_{2/9}$. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 2:1. **Z chromatografie bylo patrné, že frakce $S_{2/4}$ a $S_{2/5}$ obsahovaly stejné látky, proto bylo p istoupeno k jejich spojení do frakce $S_{2/4,5}$. Frakce $S_{2/6}$, $S_{2/7}$ a $S_{2/8}$ obsahovaly stejné látky, proto byly spojeny do frakce $S_{2/6,7,8}$.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 7.



Obr. 7 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/4}$, 2. $S_{2/5}$, 3. $S_{2/6}$, 4. $S_{2/7}$, 5. $S_{2/8}$, 6. $S_{2/9}$

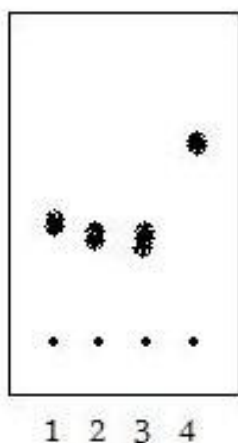
Pro kontrolu byla je-t ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí $S_{2/6,7,8}$ a $S_{2/9}$, kdy byly st ídav naneseny frakce $S_{2/6,7,8}$ a frakce $S_{2/9}$. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Z této chromatografie bylo jasné patrné, že**

frakce $S_{2/9}$ obsahovala jiné látky než spojená frakce $S_{2/6,7,8}$. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 8.



Obr. 8 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/6,7,8}$; 2. $S_{2/9}$; 3. $S_{2/6,7,8}$; 4. $S_{2/9}$

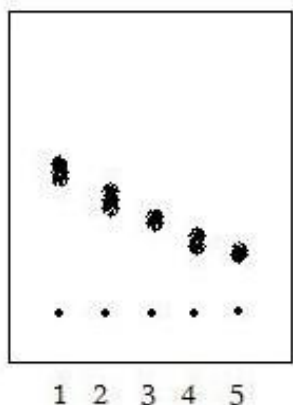
Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/10}$, $S_{2/11}$ a $S_{2/12}$ spolu s čistým betulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Z výsledného chromatogramu bylo jasné patrné, že tyto frakce ze sloupcové chromatografie obsahovaly méně pohyblivé látky, než je betulin. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 9.



Obr. 9 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/10}$, 2. $S_{2/11}$, 3. $S_{2/12}$, 4. betulin

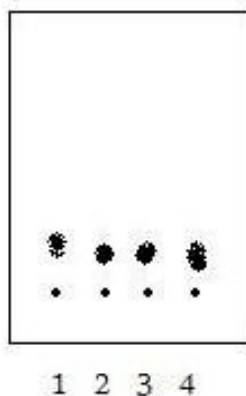
Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/9}$, $S_{2/10}$, $S_{2/11}$, $S_{2/12}$ a $S_{2/13}$. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Po detekci bylo

z chromatogramu patrné, že každá z frakcí obsahovala odlišné látky. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 10.



Obr. 10 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/9}$, 2. $S_{2/10}$, 3. $S_{2/11}$, 4. $S_{2/12}$ a 5. $S_{2/13}$

Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/13}$, $S_{2/14}$, $S_{2/15}$ a $S_{2/16-18}$. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Výsledný chromatogram ukázal, že frakce $S_{2/14}$, $S_{2/15}$ a $S_{2/16-18}$ obsahovaly stejné látky a bylo možno je následně spojit. Chromatogram je uveden na obrázku 11.



Obr. 11 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/13}$, 2. $S_{2/14}$, 3. $S_{2/15}$, 4. $S_{2/16-18}$

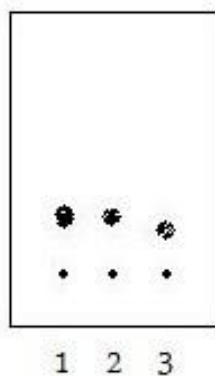
Z předchozí TLC zkoušky nebylo možno s jistotou určit, zda je frakce 13 jiná než frakce 14, proto byla ještě udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/13}$, $S_{2/14}$ a $S_{2/19-21}$. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1 tentokrát za sebou. Podle výsledného chromatogramu bylo rozhodnuto nespojovat frakce 13 a 14, protože obsahovaly jiné látky. Zároveň z TLC zkoušky vyplynulo, že je možné

spojit frakci 14 s frakcí 19-21, nebo obsahovaly stejné látky. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 12.



Obr. 12 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/13}$, 2. $S_{2/14}$, 3. $S_{2/19-21}$

Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/16-18}$, $S_{2/19-21}$ a $S_{2/22-24}$. Tato TLC byla udána především proto, aby se zjistilo, zda jsou ze sloupce ještě vymývány nějaké organické látky. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Z výsledného chromatogramu bylo jasné patrné, že se z trubice stále vymývají organické látky. **Výsledek analytické TLC navíc ukázal, že frakce $S_{2/16-18}$ a $S_{2/19-21}$ obsahovaly stejné látky.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 13.

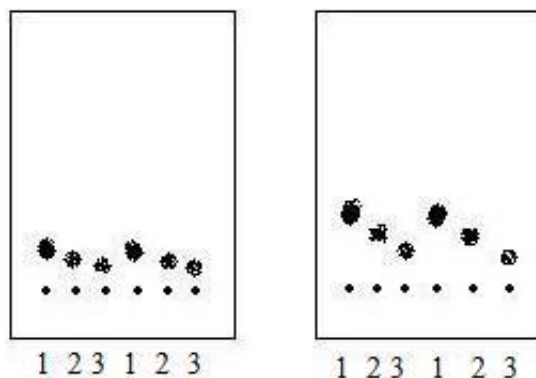


Obr. 13 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/16-18}$, 2. $S_{2/19-21}$,

3. $S_{2/22-24}$

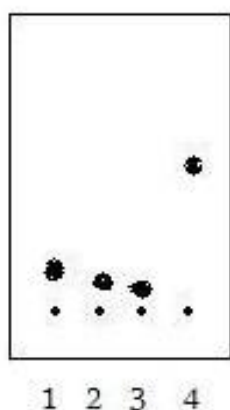
Byly udány dvě analytické TLC zkoušky frakcí $S_{2/15}$, $S_{2/22-24}$ a $S_{2/28-30}$. První TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1 pouze jednou, druhá TLC byla v této směsi vyvíjena dvakrát za sebou. **Výsledky těchto chromatografií ukázaly, že frakce 22-24 a 28-30 obsahovaly jiné látky než frakce**

15. Navíc bylo dobře viditelné, že při vícenásobné eluci dochází k ostřejšímu rozdělení chromatografovaných látek než při jednoduchém vyvíjení. Princip vícenásobné eluce spoívá v tom, že při opakovaném vnoení preparativní desky do rozpoušidla se jednotlivé pásy látek o nepatrně odlišných R_F stávají startem pro novou chromatografii¹¹. Oba výsledné chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 14.



Obr. 14 Analytické TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/15}$, 2. $S_{2/22-24}$, 3. $S_{2/28-30}$

Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/22-24}$, $S_{2/25-27}$ a $S_{2/28-30}$ spolu s čistým betulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Z výsledného chromatogramu bylo jasné patrné, že tyto frakce sloupcové chromatografie obsahovaly méně pohyblivé látky než je betulin. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 15.

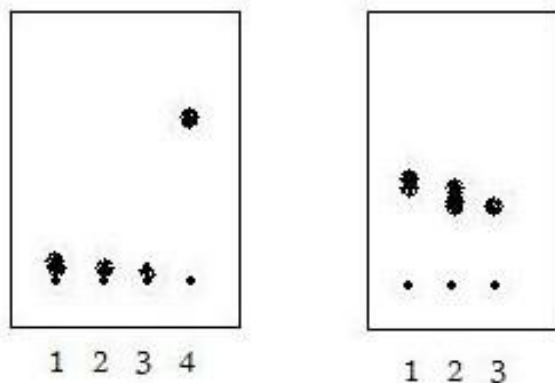


Obr. 15 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/22-24}$, 2. $S_{2/25-27}$,

3. $S_{2/28-30}$, 4. betulin

Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/28-30}$, $S_{2/31-33}$ a $S_{2/34-36}$ spolu s čistým betulinem. TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1 (A). Navíc byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/28-30}$, $S_{2/31-33}$ a $S_{2/34-36}$, která

byla provedena v čistém ethyl-acetátu (B). Z chromatogramu B je patrné, že na stop 3 je látka jednotného složení, která je ve směsi s dalšími pohyblivějšími na stop 2. Výsledné chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 16.

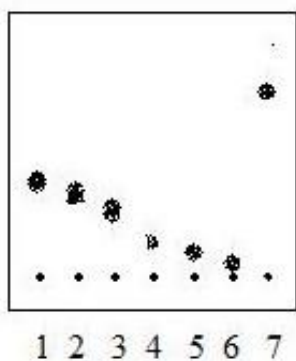


Obr. 16 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/28-30}$, 2. $S_{2/31-33}$, 3. $S_{2/34-36}$, 4. betulin;

Aí jako rozpouštědlo byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1;

Bí jako rozpouštědlo byl použit čistý ethyl-acetát

Byla udělána analytická TLC zkouška frakcí $S_{2/28-30}$, $S_{2/31-33}$, $S_{2/34-36}$, $S_{2/37-39}$, $S_{2/40-42}$, $S_{2/43-45}$ spolu s čistým betulinem. TLC byla provedena v čistém ethyl-acetátu. Po detekci bylo na chromatogramu vidět, že byla každá frakce jiná. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 17.



Obr. 17 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/28-30}$, 2. $S_{2/31-33}$, 3. $S_{2/34-36}$, 4. $S_{2/37-39}$, 5. $S_{2/40-42}$, 6. $S_{2/43-45}$, 7. betulin

Byla udělána analytická TLC zkouška frakce $S_{2/14-21}$ a vzorku obsahujícího 23-hydroxybetulin (R 634 B,B'). TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. Z výsledného chromatogramu bylo jasné patrné, že frakce 14-21

obsahovala hledaný 23-hydroxybetulin. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 18.



Obr. 18 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{2/14-21}$, 2. R 634 B, B'

Na základ výsledk získaných pomocí analytických tenkovrstvých chromatografií v-ech frakcí sloupcové chromatografie byly spojeny frakce, které obsahovaly pohybliv j-í látky nejl je 23-hydroxybetulin. Jednalo se o frakce $S_{2/1}$ a $S_{2/13}$, tato spojená frakce byla ozna ena $S_{2/1-13}$. Z výsledk analytických TLC zkou-ek bylo zji-t no, fe se 23-hydroxybetulin nacházel ve frakcích $S_{2/14}$, $S_{2/15}$, $S_{2/16-18}$ a $S_{2/19-21}$. Tyto frakce byly taktéfl spojeny do jedné, která byla ozna ena $S_{2/14-21}$. Frakce $S_{2/22-24}$, $S_{2/25-27}$, $S_{2/28-30}$, $S_{2/31-33}$, $S_{2/34-36}$, $S_{2/37-39}$, $S_{2/40-42}$ a $S_{2/43-45}$ obsahovaly mén pohyblivé organické látky nejl je 23-hydroxybetulin, také tyto frakce byly následn spojeny, smí-ená frakce $S_{2/22-45}$. V tabulce 4 jsou uvedeny hmotnosti zji-t né p i zpracovávání sloupcové chromatografie extraktu S_{JK} .

Tabulka 4 Sloupcová chromatografie extraktu S_{JK}

Frakce	Hmotnost prázdné ba ky	Hmotnost ba ky se vzorkem	Hmotnost frakce
$S_{2/1-12}$	44,8861 g	45,0405 g	0,1544 g
$S_{2/13}$	36,5934 g	36,6036 g	0,0102 g
$S_{2/14-18}$	40,2431 g	40,2787 g	0,0356 g
$S_{2/19-21}$	56,8896 g	56,8968 g	0,0072 g
$S_{2/22-24}$	35,5514 g	35,5575 g	0,0061 g
$S_{2/25-39}$	42,6355 g	42,6497 g	0,0142 g
$S_{2/40-42}$	74,3648 g	74,4018 g	0,0370 g
$S_{2/43-45}$	40,7419 g	40,7473 g	0,0054 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,2701 g

Z extraktu k ry je ábu obecného bylo odebráno 1,0183 g. Po rozpou- t ní v ethyl- acetátu a následném p idání n-hexanu se z roztoku vylou ily krystalky, které byly z roztoku p ed nalitím na sloupec odstran ny. Na sloupec bylo tedy nalito pouze 0,9603 g extraktu. **Sloupec byl prolit 1 125 ml rozpou- t del, tímto mnofstvím rozpou- t del se poda ilo ze sloupce vymýt 0,2701 g organických látek. Frakce obsahující 23- hydroxybetulin dohromady váží 42,8 mg, což je 15,8 %. Ú innost sloupcové chromatografie S₂ byla 28,12 %.** Po zji- t ní, že je 23-hydroxybetulin ze sloupce jífl vymyt, bylo ukon eno promývání sloupce. Tento fakt se projevil na nízké ú innosti sloupcové chromatografie.

3.2.3.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie frakce S_{2/14-21}

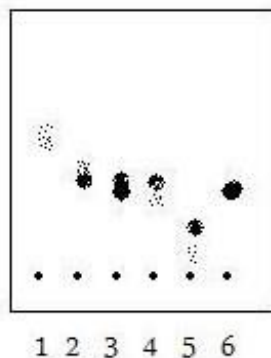
Spojením frakcí S_{2/14} a S_{2/19-21} s obsahem 23-hydroxybetulinu byla získána frakce S_{2/14-21} váží 42,8 mg. Naná- ení vzorku, následné vyvíjení preparativní desky a detekce organických látek byly provedeny dle postupu popsáního v ásti 3.1.1.4. K vyvíjení preparativní desky byla pouflita sm s n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. Deska byla v této sm si vyvíjena dvakrát za sebou. Podle oblastí, ve kterých se objevily organické látky, byla deska následn rozd lena na p t ástí. Zóna nacházející se v ele byla ozna ena 1. Zóna, která se nacházela u startu, byla ozna ena 5. Rozd lení na zóny bylo je- t zkontrolováno TLC frakcí S_{2/14} a S_{2/19-21} (obr. 12). Rozd lení oblastí na preparativní desce odpovídalo výsledk m získaným analytickou TLC.

Zpracování desky bylo provedeno podle postupu uvedeného v ásti 3.1.1.5. V tomto p ípad byl k promývání trubic pouflit istý ethyl-acetát. Získané frakce byly ozna eny S_{2/14-21(1.)}, S_{2/14-21(2.)}, S_{2/14-21(3.)}, S_{2/14-21(4.)}, S_{2/14-21(5.)}, a poté byly zváfleny. Zji- t né hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Tenkovrstvá chromatografie vzorku S_{2/14-21}

Frakce	Hmotnost prázdne ba ky	Hmotnost ba ky se vzorkem	Hmotnost frakce
S _{2/14-21(1.)}	39,5778 g	39,5842 g	0,0065 g
S _{2/14-21(2.)}	35,4817 g	35,4841 g	0,0024 g
S _{2/14-21(3.)}	40,7596 g	40,7770 g	0,0174 g
S _{2/14-21(4.)}	37,0791 g	37,0851 g	0,0060 g
S _{2/14-21(5.)}	79,8419 g	79,8474 g	0,0055 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0378 g

Pro identifikaci frakcí, které obsahovaly 23-hydroxybetulin, byla udána analytická TLC zkouška, která byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1 dvakrát po sobě. **Z výsledného chromatogramu bylo jasné patrné, že se 23-hydroxybetulin nacházel ve frakcích S_{2/14-21(2)}, S_{2/14-21(3)}, S_{2/14-21(4)}. Nejistější byla frakce S_{2/14-21(3)}** (viz. obrázek 19).



Obr. 19 **Analytická TLC:** 1. S_{2/14-21(1)}, 2. S_{2/14-21(2)}, 3. S_{2/14-21(3)}, 4. S_{2/14-21(4)},
5. S_{2/14-21(5)}, 6. R 634 B, B'

Na desku bylo k preparativní tenkovrstvé chromatografii naneseno 42,8 mg vzorku. **Z trubice se podařilo vymýt 37,8 mg organických látek. Účinnost celého dlečného procesu byla 88,31 %. Frakce obsahující 23-hydroxybetulin váží celkem 23,4 mg, což je 61,9 %.**

3.2.4 Sloupcová chromatografie S₃

Pro další sloupcovou chromatografii byl zvolen silikagel s větší zrnitostí. Zatímco pro sloupcovou chromatografii S₂ byl zvolen silikagel s velikostí pórů 5-30 mikronů, pro sloupcovou chromatografii S₃ byl použit silikagel s velikostí pórů 40-100 mikronů. U sloupcové chromatografie S₃ protékalo rozpouštědlo v dlečném sledku velikosti pórů mnohem rychleji, ale rozdělení látek nebylo tak účinné jako u chromatografie S₂. Pro chromatografii S₃ byl použit jiný extrakt jeřábové kůry než pro chromatografii S₂. U sloupcové chromatografie S₃ byl na sloupec nanesen roztok extraktu jeřábu obecného, který byl předem za účelem zjednodušení jeho složení zpracován varem s ethanolickým NaOH (předem na ester na hydroxyderiváty).

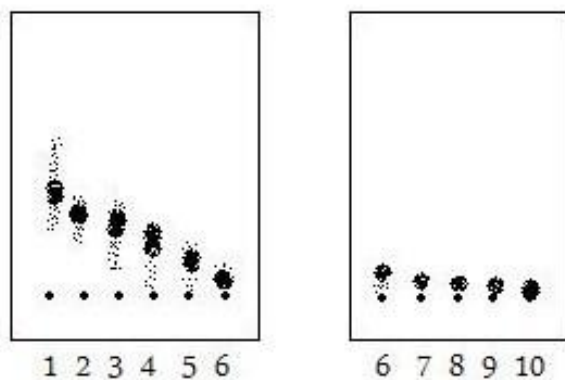
Sloupcová chromatografie byla provedena podle postupu popsaného v části 3.1.2.

1 g extraktu je ábu po NaOH byl rozpu-t n v 30 ml ethyl-acetátu, roztok byl nalit na sloupec silikagelu. Zádrfl sloupce inila 35 ml. Organické látky byly ze sloupce vymývány 30 ml podíly ethyl-acetátu. Frakce získané promytím sloupce byly ozna eny S_{3/1} aíl S_{3/10}. Zji-t né hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 **Sloupcová chromatografie S₃**

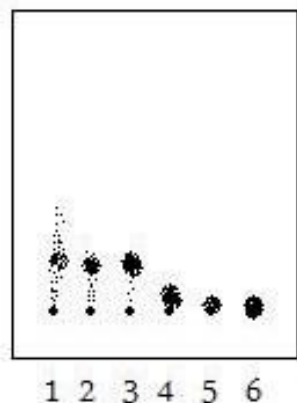
Frakce	Hmotnost prázdné ba ky	Hmotnost ba ky se vzorkem	Hmotnost frakce
S _{3/1}	33,6494 g	34,2145 g	0,5651 g
S _{3/2}	27,7098 g	27,8238 g	0,1140 g
S _{3/3}	42,9792 g	43,0977 g	0,1185 g
S _{3/4}	56,8133 g	56,8448 g	0,0315 g
S _{3/5}	47,0656 g	47,0867 g	0,0211 g
S _{3/6}	46,5573 g	46,5671 g	0,0098 g
S _{3/7}	42,4451 g	42,4512 g	0,0061 g
S _{3/8}	41,9751 g	41,9805 g	0,0054 g
S _{3/9}	50,8221 g	50,8269 g	0,0048 g
S _{3/10}	31,7187 g	31,7222 g	0,0035 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,8798 g

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka prvních –esti frakcí sloupcové chromatografie S₃. Dále byla ud lána analytická TLC zkou-ka –esté aíl desáté frakce. Ob TLC byly provedeny ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. Tyto tenkovrstvé chromatografie byly provedeny, aby se zjistilo, zda jsou n které frakce stejné. Oba výsledné chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 20.



Obr. 20 **Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie:** 1. S_{3/1}, 2. S_{3/2}, 3. S_{3/3}, 4. S_{3/4}, 5. S_{3/5}, 6. S_{3/6}, 7. S_{3/7}, 8. S_{3/8}, 9. S_{3/9}, 10. S_{3/10}

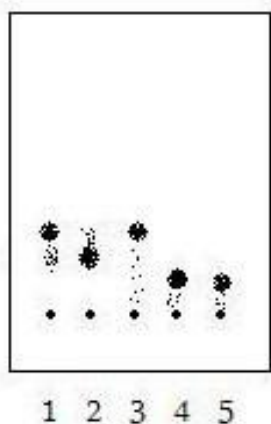
Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{3/2}$, $S_{3/4}$, $S_{3/6}$, $S_{3/8}$ a $S_{3/10}$ spolu se vzorkem 23-hydroxybetulinu (R 634 B,B'). TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. **Výsledky chromatografie ukázaly, že se 23-hydroxybetulin zřejmě nacházel ve frakci 2 a 4. Frakce 6, 8 a 10 obsahovaly méně pohyblivé látky.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 21.



Obr. 21 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{3/2}$, 2. $S_{3/4}$,

3. R 634 B,B', 4. $S_{3/6}$, 5. $S_{3/8}$, 6. $S_{3/10}$

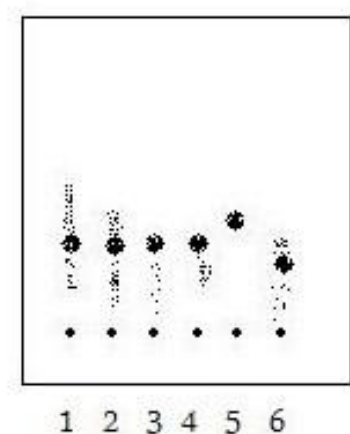
Byla udána analytická TLC zkouška frakcí $S_{3/4}$ a $S_{3/7}$ spolu se vzorkem 23-hydroxybetulinu (R 634 B,B'). TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1 dvakrát za sebou. Z výsledků TLC zkoušky bylo jasné patrné, že frakce 6 a 7 obsahovaly stejné látky. **Frakce 4 obsahovala 23-hydroxybetulin a frakce 5 obsahovala stopy 23-hydroxybetulinu.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 22.



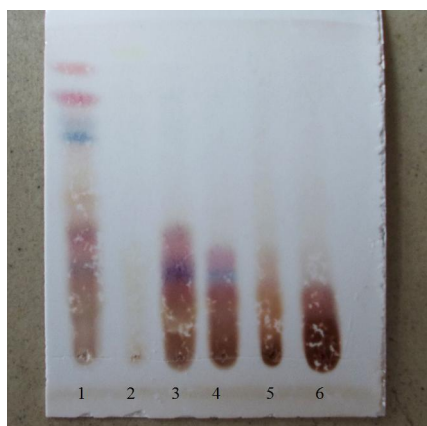
Obr. 22 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{3/4}$, 2. $S_{3/5}$,

3. R 634 B,B', 4. $S_{3/6}$, 5. $S_{3/7}$

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí $S_{3/2}$ a $S_{3/5}$ spolu se dv ma r znými vzorky 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1 dvakrát za sebou. **Zkou-ka ukázala, že 23- hydroxybetulin byl krom frakcí 4 a 5 obsažen i ve frakcích 2 a 3.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 23. Poté byla ud lána analytická TLC zkou-ka stejných frakcí, která byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 2:1 t ikrát za sebou. Ve sm si 2:1 se frakce ost eji rozd lily a dalo se jist ji ur it, které vzorky obsahují 23-hydroxybetulin. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 24. **Výsledky této chromatografie potvrdily p ítomnost 23-hydroxybetulinu ve frakcích 2, 3, 4 a 5.** Ale fládná z t chto frakcí nebyla dostate n ístá. Frakcí 2 a 3 bylo dostate né mnofství pro p ípadnou preparativní TLC, proto byly ponechány každá zvlá- . Frakce 4 a 5 byly spojeny, protože frakce 5 obsahovala pouze malé mnofství 23-hydroxybetulinu.



Obr. 23 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{3/2}$, 2. $S_{3/3}$,
3. R 634 B,B', 4. $S_{3/4}$, 5. 23-hydroxybetulin, 6. $S_{3/5}$



Obr. 24 Analytická TLC frakcí sloupcové chromatografie: 1. $S_{3/2}$,
2. 23-hydroxybetulin, 3. $S_{3/3}$, 4. $S_{3/4}$, 5. R 634 B,B', 6. $S_{3/5}$

Na sloupec byl nanesen 1 g extraktu je ábu po NaOH, ze sloupce se poda ilo vymýt 879,8 mg organických látek. Bylo k tomu zapot ebí p iblifn 300 ml istého ethylacetátu. Ú innost sloupcové chromatografie S₃ byla 87,98 %. Frakce obsahující 23-hydroxybetulin váffily dohromady 285,1 mg, cofl je 32,4 %.

3.2.4.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku S_{3/2}

Frakce S_{3/2} (114 mg) ze sloupcové chromatografie S₃ byla rozpu-t na v malém mnofství ethyl-acetátu a byla nanesena na preparativní desku. Naná-ení vzorku, vyvíjení lité desky a detekce organických látek byla provedena podle postupu popsaneho v ásti 3.1.1.4. Dal-í zpracování preparativní TLC bylo provedeno podle postupu popsaneho v ásti 3.1.1.5.

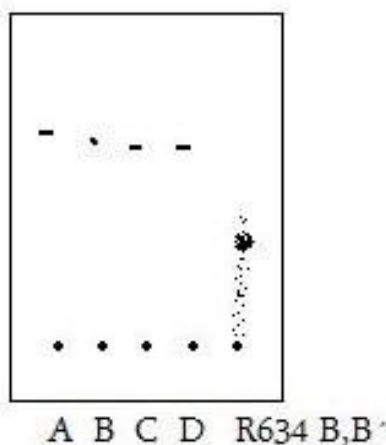
Podle zuhelnat lých stop se deska rozd lila na jedenáct zón. Zóna nacházející se v ele byla ozna ena za zónu A. Zóna, která byla v oblasti startu, byla ozna ena jako zóna J. Sloupce byly promývány istým ethyl-acetátem. Získané hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Tenkovrstvá preparativní chromatografie vzorku S_{3/2}

Frakce	Hmotnost prázdné ba ky	Hmotnost ba ky se vzorkem	Hmotnost frakce
A	35,4648 g	35,4660 g	0,0012 g
B	40,1897 g	40,1905 g	0,0008 g
C	36,5794 g	36,5813 g	0,0019 g
D	42,6037 g	42,6045 g	0,0008 g
E	50, 8315 g	50,8376 g	0,0061 g
F	42,4109 g	42,4135 g	0,0026 g
G	40,7217 g	40,7268 g	0,0051 g
H	41,9630 g	41,9688 g	0,0058 g
CH	47,0488 g	47,0553 g	0,0065 g
I	34,3932 g	34,4507 g	0,0575 g
J	27,7116 g	27,7198 g	0,0082 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0965 g

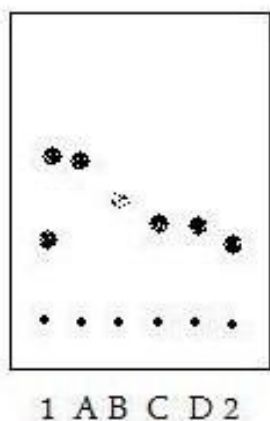
Byla provedena analytická TLC zkou-ka frakcí A afl D spolu se vzorkem 23-hydroxybetulinu (R 634 B,B). TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1 dvakrát za sebou. Po detekci bylo z chromatogramu patrnó, fe frakce

A, B, C i D obsahovaly pohybliv j-í látky nejl je 23-hydroxybetulin. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 25.



Obr. 25 Analytická TLC

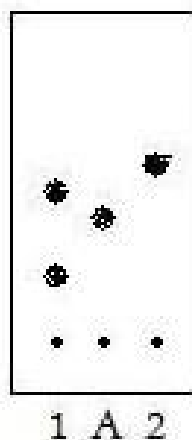
Byla ud lána je-t jedna analytická TLC zkou-ka frakcí A aíl D. Tentokrát byly porovnávány se vzorkem betulinu a se vzorkem extraktu b ezové k ry. TLC byla provedena ve sm sí n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 10:3. **Po detekci bylo z výsledného chromatogramu vid t, fe frakce A aíl D byly pohybliv j-í nejl istý betulin. Z chromatogramu bylo také patrnó, fe frakce C a D obsahovaly stejné látky.** Z výsledku nebylo možno usoudit, jestli byla frakce A stejná jako stopa lupeolu u extraktu b ezové k ry. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 26.



Obr. 26 Analytická TLC: 1. extrakt b ezové k ry, 2. istý betulin

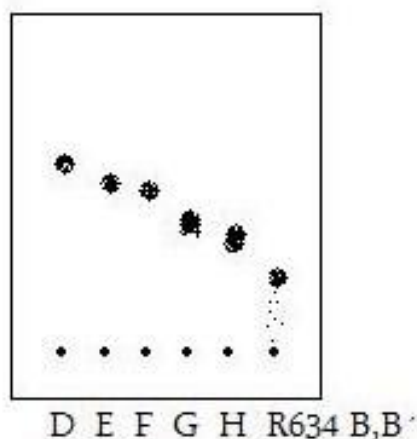
Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakce A spolu se vzorkem extraktu b ezové k ry a vzorkem R 636 BK2. TLC byla provedena ve sm sí n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 10:3. **Po detekci bylo na chromatogramu vid t, fe frakce A nebyla**

totofná s lupeolem ani se vzorkem R 636 BK2. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 27.



Obr. 27 **Analytická TLC:** 1. extrakt b ezové k ry, 2. R 636 BK2

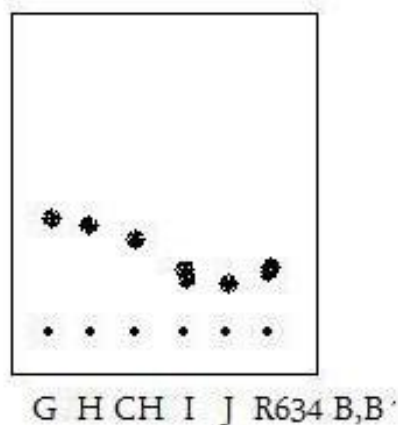
Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí D afl H, pro kontrolu k nim byl nanesen vzorek 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Po detekci bylo možno z chromatogramu usoudit, že ani jedna z frakcí D afl H neobsahovala 23-hydroxybetulin. V-echny frakce D, E, F, G i H obsahovaly pohybliv j-í látky.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 28.



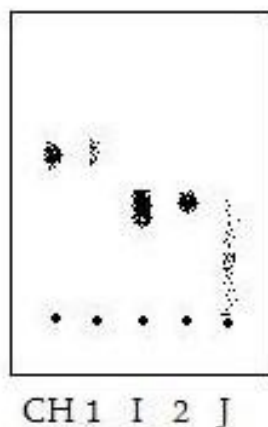
Obr. 28 **Analytická TLC**

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frakcí G afl J spolu se vzorkem 23-hydroxybetulinu (R 634 B,B'). TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Výsledek chromatografie ukázal, že 23-hydroxybetulin byl pravd podobn obsafen ve frakci I** (obrázek 29). Protože výsledek nebyl zcela pr kazný, byla provedena dal-í analytická TLC zkou-ka frakcí CH, I a J spolu se dv ma vzorky 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu

v poměru 1:1 dvakrát za sebou, aby se stopy lépe rozdělily. Po detekci bylo z chromatogramu jasné patrné, že 23-hydroxybetulin obsahovala frakce I. Frakce CH také obsahovala malé množství 23-hydroxybetulinu. Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 30.



Obr. 29 Analytická TLC



Obr. 30 Analytická TLC: 1. vzorek 23-hydroxybetulinu, 2. R 634 B,B'

Na litou desku bylo k preparativnímu provedení tenkovrstvé chromatografie naneseno 114 mg vzorku, z desky se podařilo získat 96,5 mg organických látek. Účinnost chromatografie byla 84,64 %. Frakce obsahující 23-hydroxybetulin váží dohromady 63,5 mg, což je 65,8 %. Frakce I váží 57,5 mg nebyla dostatečně čistá a kromě 23-hydroxybetulinu obsahovala ještě další látky. Tato frakce byla následně i-ť na pomoci další preparativní tenkovrstvé chromatografie. Frakce CH, která také obsahovala stopy 23-hydroxybetulinu, bylo příliš málo pro další d-lení

pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Frakce CH byla ponechána zvláště, frakce A a H byly spojeny.

3.2.4.1.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku S3/2I

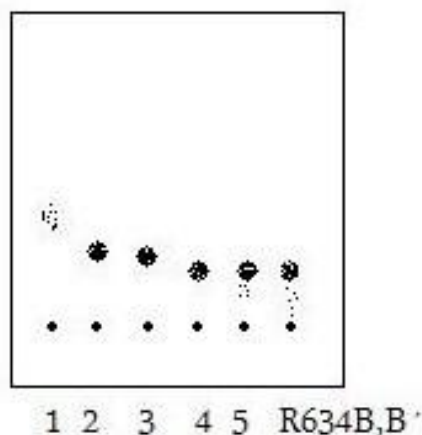
Vzorek S3/2I (57,5 mg) byl nanesen na litou preparativní desku. Tato deska byla vyvíjena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 2:1 třikrát za sebou. Nanášení vzorku, vyvíjení lité desky a detekce organických látek byly provedeny podle postupu popsaného v části 3.1.1.4. Další zpracování tenké vrstvy bylo provedeno podle postupu popsaného v části 3.1.1.5.

Zóna nejdále od startu byla označena 1. Zóna v oblasti startu byla označena 8. Trubice byly promývány stejným ethyl-acetátem. Zjištěné hmotnosti jsou uvedeny v tabulce 8. Frakce získané promytím sloupců byly označeny S3/2I₁ a S3/2I₈.

Tabulka 8 Tenkovrstvá preparativní chromatografie vzorku S3/2I

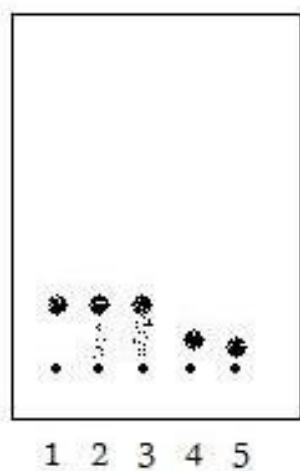
Frakce	Hmotnost prázdné baňky	Hmotnost baňky se vzorkem	Hmotnost frakce
I ₁	40,7488 g	40,7493 g	0,0005 g
I ₂	41,9689 g	41,9709 g	0,0020 g
I ₃	40,2005 g	40,2030 g	0,0025 g
I ₄	50,8315 g	50,8465 g	0,0150 g
I ₅	42,6407 g	42,6684 g	0,0277 g
I ₆	34,3956 g	34,4000 g	0,0044 g
I ₇	42,4158 g	42,4190 g	0,0032 g
I ₈	36,5712 g	36,5730 g	0,0018 g
Celková hmotnost vymytých organických látek			0,0571 g

Byla udělána analytická TLC zkouška frakcí I₁ a I₅, pro kontrolu k nim byl přidán vzorek 23-hydroxybetulinu (R 634 B,B'). TLC byla provedena ve směsi n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 1:1. **Po detekci bylo z chromatogramu patrné, že se 23-hydroxybetulin nacházel ve frakcích I₄ a I₅.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 31.



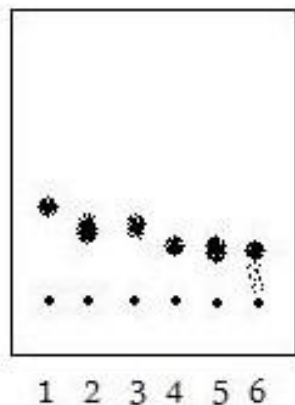
Obr. 31 **Analytická TLC:** 1. I₁, 2. I₂, 3. I₃, 4. I₄, 5. I₅, 6. R 634 B,B'

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frací I₅ afl I₈ spolu se vzorkem R 634 B,B' obsahujícím 23-hydroxybetulin. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Na výsledném chromatogramu bylo vid t, že také frakce I₆ obsahovala hledaný 23-hydroxybetulin.** Chromatogram je uveden na obrázku 32.



Obr. 32 **Analytická TLC:** 1. I₅, 2. R 634 B,B', 3. I₆, 4. I₇, 5. I₈

Byla ud lána analytická TLC zkou-ka frací I₂ afl I₆ spolu s dal-ím vzorkem 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm si n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. Po detekci bylo mofno usoudit, že **frakce I₃ byla stejná jako vzorek 23-hydroxybetulinu.** Výsledný chromatogram je uveden na obrázku 33.



Obr. 33 **Analytická TLC:** 1. I₂, 2. I₃, 3. 23-hydroxybetulin, 4. I₄, 5. I₅, 6. I₆

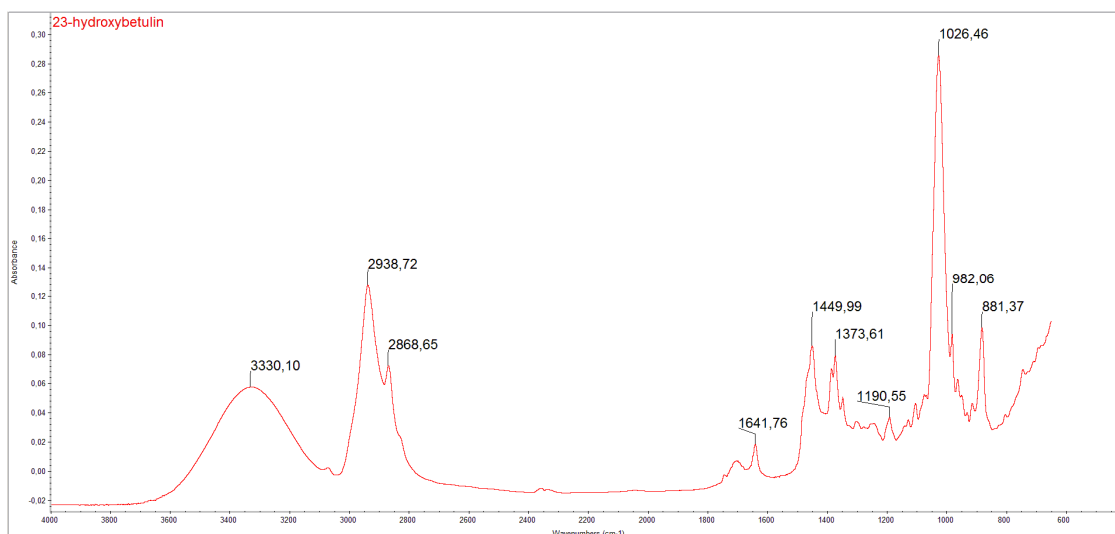
Pro kontrolu byla je-t ud lána analytická TLC zkou-ka frakce I₃ a vzorku 23-hydroxybetulinu. TLC byla provedena ve sm sí n-hexanu a ethyl-acetátu v pom ru 1:1. **Výsledek této chromatografie potvrdil, že frakce I₃ obsahovala 23-hydroxybetulin.** Chromatogram je uveden na obrázku 34.



Obr. 34 **Analytická TLC:** 1. I₃, 2. 23-hydroxybetulin

Výsledky analytických TLC zkou-ek ukázaly, že 23-hydroxybetulin (odpovídající vzorku R 634 B,B') obsahovaly frakce I₄, I₅ a I₆. Frakce I₅ m la nejvy-í istotu a byla ponechána samostatn . Frakce I₄ a I₆ byly mírn zne i-t né dal-ími látkami, tyto frakce byly spojeny. Z krystal frakce I₅ bylo provedeno stanovení bodu tání. Zji-t ný bod tání byl 230 ó 240°C. U frakce I₅ bylo také provedeno m ení infra ervených spekter (viz. obrázek 35). Spojená frakce I_{4,6} byla ponechána pro dal-í pouflití. **Frakce I₃ byla stejná jako druhý vzorek 23-hydroxybetulinu,** frakce I₃ byla ponechána zvlá- . K preparativnímu d lení bylo na

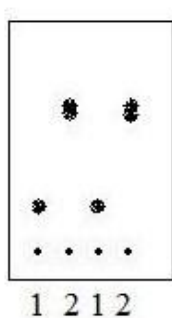
litou desku naneseno 57,5 mg organických látek. Z trubic se povedlo vymýt 57,1 mg organických látek. Účinnost chromatografie byla 99,3 %.



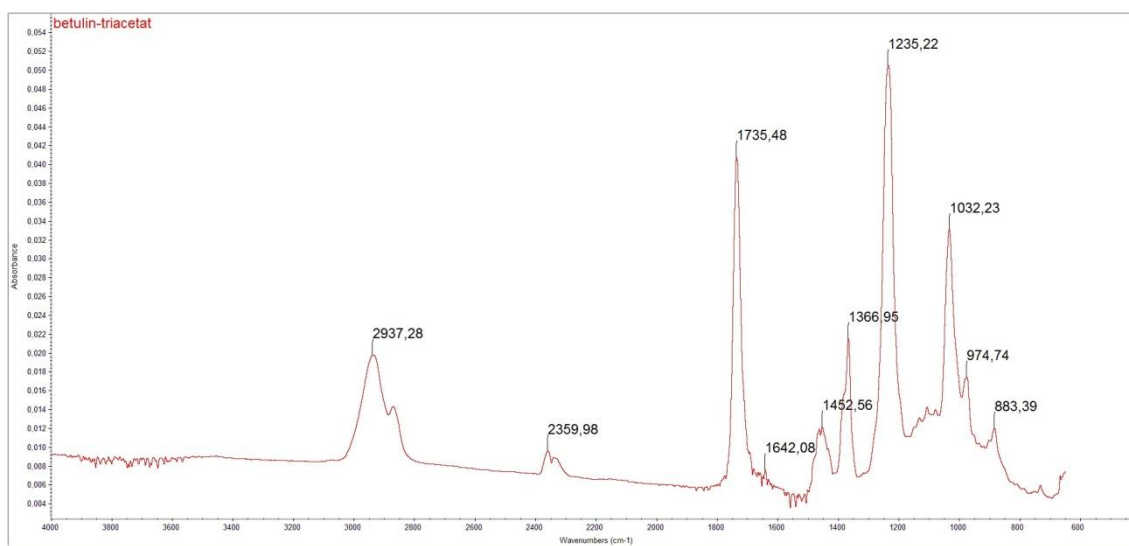
Obr. 35 I spektrum 23-hydroxybetulinu (měřeno na přístroji Nicolet IS 5 s použitím nástavce ATR)

3.3 Acetylace 23-hydroxybetulinu

19,5 mg 23-hydroxybetulinu (frakce S3/2I_{4,6}) bylo za tepla rozpuštěno v 0,5 ml bezvodého (suchého) KOH) pyridinu a po ochlazení byly pipetovány 0,3 ml acetanhydridu. Po 24 hodinovém stání bylo pipetováno dalších 0,7 ml acetanhydridu. Po týdenním stání byla reakční směs zředěna 8 ml 10%ní kyseliny chlorovodíkové a pod kladným tlakem extrahována 3 krát 2 ml chloroformu. Chloroformové podíly byly spojeny, promyty 10 ml vody, 5 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a vysušeny bezvodým síranem sodným. Po oddestilování chloroformu bylo získáno 17,6 mg nekrystalického produktu, jehož TLC je odlišné od TLC výchozího 23-hydroxyderivátu (obrázek 36). Rozdílnost výchozího hydroxyderivátu a produktu acetylace je patrná i porovnáním IR spekter (viz. obrázek 37).



Obr. 36 Analytická TLC: 1. 23-hydroxybetulin (S3/2I₅), 2. betulin-triacetát



Obr. 37 I spektrum betulin-triacetátu (m ěno na p ěstroji Nicolet IS 5 s poufětěm něstavce ATR)

4. Závěr

V praktické části této bakalářské práce jsem se zabývala především izolací 23-hydroxybetulinu z přírodního materiálu. K jeho izolaci jsem využila několik postupů. Preparativní tenkovrstvá chromatografie extraktu kory je obecně se nejvíce jako výhodná metoda k získání 23-hydroxybetulinu. Vzorky získané touto metodou byly velmi znečištěné. Pro jejich přečištění by bylo nutno provést ještě několik dalších dělání.

Sloupcové chromatografie extraktu kory je obecně jsou k dělání vhodnější, zejména pak sloupcová chromatografie na silikagelu s větší velikostí pórů. Tato sloupcová chromatografie probíhala rychle a bylo získáno několik frakcí s obsahem 23-hydroxybetulinu. Jedna z nich byla poté použita k dalšímu dělání. Pomocí dvou za sebou následujících preparativních tenkovrstvých chromatografií se podařilo získat relativně čistý vzorek 23-hydroxybetulinu, který byl použit pro změnění IR spektra (viz. obrázek 35) a následnou acetylaci. Reakcí s acetanhydridem v pyridinu byl připraven acetylderivát, podle TLC jednotný a výrazně odlišný od výchozího hydroxyderivátu. Acetylderivát, získaný v amorfní podobě byl použit ke změnění IR spektra (viz. obrázek 37).

Z porovnání obou IR spekter je zřejmé, že acetylace proběhla v plném rozsahu. Protože reakce byla provedena s malým množstvím hydroxyderivátu, nebylo možno provést další plánovanou reakci, parciální hydrolýzu triacetátu, která by teoreticky měla vést ke směsi hydroxyacetylderivátů.

5. Seznam použité literatury

1. Galuszka P., Luhová L.: Laboratorní technika pro biochemiky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc 2003
2. Andrlík K., Týmek J.: Základy laboratorní práce, SNTL, Praha 1953
3. Keil B. a kol.: Laboratorní technika organické chemie, SAV, Praha 1963
4. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
5. Rychtr V., Kříž M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie, Sborník katedry chemie ZU, Plzeň 2004
6. Gaspari J., Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
7. Klinotová E., Klinot J. a kol.: Základní cvičení z organické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1980
8. McMurry J.: Organická chemie, VCHCT, Praha 2007
9. Šervinka O. a kol.: Chemie organických sloučenin (2), SNTL, Praha 1987
10. www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny (25. 6. 2012)
11. Rychtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii, Pedagogická fakulta ZU v Plzni, Plzeň 1993

6. Resumé

This thesis is dividend into the theorethical and practical part. In the theorethical part are mentioned some laboratory techniques like column chromatogamy, thin-layer chromatogamy, distillation and extraction. In the practical part of this thesis is a description of the practision thin-layer chromatogamy and column chromatogamy. In the practical part there is also described simple transformation 23-hydroxybetulin (acetylation).