

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ

**ZPRACOVÁNÍ KŮRY JEŘÁBU
OBECNÉHO PRO VÝUKOVÉ ÚČELY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Matyáš Konopa

Přírodovědná studia obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň 2022

Čestné prohlášení

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

V Plzni dne 2022

.....
Podpis autora

Poděkování

Rád bych vyjádřil své díky vedoucímu diplomové práce doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc., který mi byl nápomocen při vytváření dokumentu, praktické části a vymýšlení námětu kvalifikační práce. Děkuji také pedagogickému sboru naší katedry, který mi byl v průběhu vysokoškolských studií vždy oporou.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část.....	2
2.1. Terpenoidní látky	2
2.1.1. 23 – hydroxy betulin	3
2.1.2. Betulin.....	4
2.1.3. Terpenoidy v učebnicích	4
2.1.4. Ukotvení tématu isoprenoidů v kurikulárních dokumentech	7
2.1.5. Příklad vyučovací hodiny zaměřené na téma isoprenoidů	10
2.2. Užité laboratorní metody.....	16
2.2.1. Extrakce (vyluhování).....	16
2.2.2. Destilace	17
2.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)	18
2.2.4. Retenční faktor	22
2.2.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie	23
2.3. Volba vhodné metody extrakce 23 – hydroxy betulinu.....	24
2.3.1. Dříve popsané metody extrakce	24
2.3.2. Zvolená metoda postupu pro extrakci 23 – hydroxy betulinu.....	25
2.4. Chromatografická rozpouštědla	25
2.4.1. Eluotropní řada.....	26
2.4.2. Výběr vhodného rozpouštědla.....	28
2.5. Pomůcky využívané v průběhu experimentu.....	28
2.5.1. Skleněný balónek	28
2.5.2. Kapiláry.....	29
3. Experimentální část	31
3.1. Pomůcky.....	31
3.1.1. Zhotovení kapiláry	31
3.1.2. Zhotovení balónku.....	33
3.1.3. Příprava skleněných desek pro metodu preparativní chromatografie	34
3.2. Výběr rozpouštědla pro extrakci	35
3.2.1. Tenkovrstvá chromatografie jednotlivých vzorků.....	37
3.2.2. Preparativní TLC vzorků.....	40
3.2.3. Retenční faktor a jeho využití v experimentu.....	41
3.2.4. Zpracování vzorků získaných preparativní chromatografií.....	45
3.2.5. Výběr optimálního rozpouštědla	46

3.3. Extrakce 23 - hydroxy betulinu.....	46
3.3.1. Extrahování 23 - hydroxy betulinu.....	46
3.3.2. Zmýdelnění vzorku	48
3.3.3. Výpočet množství ethanolickeho roztoku NaOH pro zmýdelnění vzorku.....	49
3.3.4. Proces zmýdelnění vzorku.....	50
3.3.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie zmýdelněného materiálu	51
3.4. Porovnání TLC meziproduktů a zmýdelněného vzorku	53
3.5. Porovnání dříve provedených izolací s navrhovaným postupem.....	55
4. Závěr	57
5. Resumé	58
6. Seznam použité literatury	59
7. Seznam obrázků	61
8. Seznam tabulek	61

1. Úvod

Již při sepisování bakalářské práce jsem dospěl k rozhodnutí věnovat se tématu triterpenoidních sloučenin při zpracování práce diplomové. Zjistil jsem totiž, že toto téma umožňuje řadu výukových aplikací, především vzhledem k provedení různých laboratorních technik, případně jejich modifikací. Jde také o to, že se otevírá možnost různých přístupů k teoretickému studiu z určitého pohledu okrajových oblastí chemie, kterými triterpenoidní sloučeniny jsou. Až na malé výjimky dosud byla na katedře chemie věnována pozornost betulinu a jeho přeměnám. 23 – hydroxy betulin obsažený v kůře jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*) má díky přítomnosti další hydroxylové skupiny poněkud odlišné vlastnosti, kterými je především rozdílná rozpustnost v polárních a méně polárních rozpouštědlech.

Při řešení diplomové práce jsem využil metod použitých při práci bakalářské. Jedná se především o základní techniky, kterými jsou extrakce, destilace a krystalizace. Vedle těchto metod je nejdůležitější tenkovrstvá chromatografie v analytickém a preparativním provedení. Tenkovrstvá chromatografie triterpenoidních sloučenin může být užitečná i ve školské praxi, kde může rozšířit spektrum chromatografovaných barevných směsí o látky bezbarvé, které je nutno na závěr procesu detekovat.

2. Teoretická část

2.1. Terpenoidní látky

Terpenoidní látky, které můžeme jednoslovně nazvat terpeny jsou organické látky převážně rostlinného původu, jenž se skládají ze dvou či několika isoprenových jednotek. Tyto látky jsou řazeny do skupiny látek obecně nazvaných jako isoprenoidy, jejichž chemická struktura je odvozena od 2 – methyl - 1,3 - butadienu (isoprenu). Mezi isoprenoidy se řadí prchavé aromatické kapaliny známé jako rostlinné silice. Produkce těchto silic využívá rozličných metod izolace, které produkují pryskyřice vznikající oxidací zmíněných rostlinných silic¹.

Hlavním rozdílem mezi pojmy „terpen“ a „terpenoid“ tkví v tom, že terpen označuje primárně uhlovodíky a terpenoid i jejich četné deriváty².

Tabulka č. 1 představuje dělení terpenů dle počtu izoprenových jednotek. Podle množství funkčních skupin můžeme tyto látky dělit do několika skupin. Mezi nejdůležitější skupiny terpenů řadíme hemiterpeny³, mezi něž patří například isopren, který se sám volně v přírodě nevyskytuje a je základním stavebním kamenem terpenoidních sloučenin. Dalšími významnými skupinami isoprenoidů jsou monoterpenoidy a seskviterpenoidy. Jedná se o těkavé sloučeniny obsahující 10–15 uhlíkových atomů a jsou obsaženy v tělech vyšších rostlin. Mezi nejznámější monoterpenoidy se řadí limonen obsažený v pomerančové kůře, kafr z kafrovníku a menthol obsažený v mátě peprné¹.

Tabulka 1 : Přehled terpenoidních sloučenin dle počtu isoprenových jednotek¹.

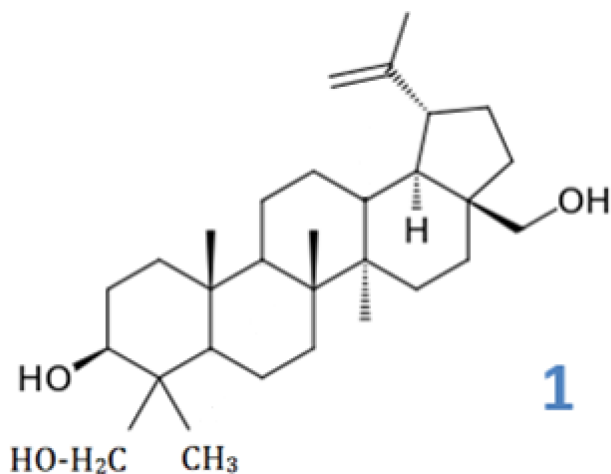
Množství isoprenových jednotek	Množství atomů uhlíku v molekule	Skupina terpenů
2	10	Monoterpeny
3	15	Seskviterpeny
4	20	Diterpeny
6	30	Triterpeny
8	40	Tetraterpeny
n > 1000	5n	Polyterpeny

2.1.1. 23 – hydroxy betulin

23 - hydroxy betulin (1) je sloučenina vyznačující se pentacyklickou strukturou s triterpenoidním charakterem. Jak název napovídá jedná se o derivát látky nesoucí název betulin (2). Od betulinu se liší navázanou hydroxylovou skupinou na 23. uhlíku. Tuto sloučeninu můžeme nalézt v kůře jeřábu obecného, se kterým se v České republice setkáváme v blízkosti cest, silnic a na okrajích polí a lesů.

Dle vědeckého článku *Synthesis and cytotoxic activity of 17 - carboxylic acid modified 23 - hydroxy betulinic acid ester derivatives*⁴ lze 23 – hydroxy betulin úspěšně extrahovat též z kořene čínské léčivé byliny *Pulsatilla chinensis*, jež je hojně využívána v tradiční čínské medicíně jako přírodní lék na malárii. Zmíněný terpenoid má též prokazatelné účinky při potlačování vzniku nádorových onemocnění a prevenci před nákazou virem HIV. Dle dostupných informací vykazuje velice podobné biologické účinky jako dříve zmíněná isoprenoidní látka betulin (2) (cit⁴).

Obrázek 1: Molekula 23 - hydroxy betulinu.

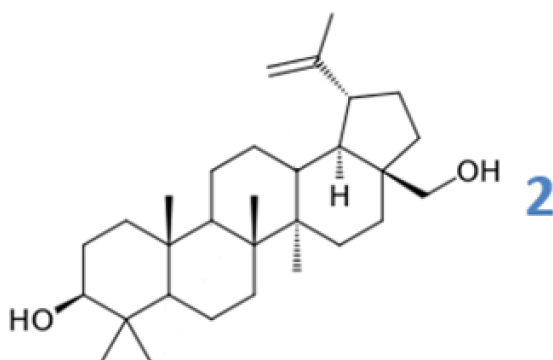


2.1.2. Betulin

Betulin (2) je sloučenina hojně obsažena v přírodě nacházející se převážně v kůře bříz (*Betula sp.*) odkud pochází také název zmíněné sloučeniny. Betulin byl jednou z prvních triterpenoidních látek, které byly objeveny německým chemikem Löwitzem roku 1788 sublimací z březové kůry³.

Tento terpen poskytuje kůře bříz zajímavé vlastnosti. Fungicidní a antibakteriální účinky látky způsobují zvýšenou odolnost březové kůry vůči bakteriím a houbám, které zapříčiňují proces tlení a šíření plísní. Pravděpodobně se jedná o přirozenou ochranu stromu proti požeru a napadení ze strany zvěře a mikroorganismů³.

Obrázek 2: Molekula betulinu.



2.1.3. Terpenoidy v učebnicích

Z hlediska didaktického zaměření této práce je vhodná zmínka o zastoupení terpenoidních látek v učebnicích středních škol a gymnázií orientovaných na chemii. Pro tyto účely byla vybrána středoškolská učebnice Odmaturuj z chemie (2014, s. 177-178).

V učebnici je skupina isoprenoidních (terpenoidních) látek shrnuta relativně stručně v rozsahu 2 klasických stran. Je zde uvedena obecná charakteristika skupiny, grafická podoba isoprenové funkční skupiny a základní dělení dle počtu isoprenových jednotek podobně jako v tabulce č.1. Dále jsou v publikaci popsány nejdůležitější skupiny terpenoidních sloučenin, jejich obecné vlastnosti, včetně nejvýznamnějších zástupců.

Obrázek 3: Ukázka z učebnice Odmaturuj z chemie (včetně ev. nedostatků) s. 177 (cit⁵).

biochemie
Poznámky

33. Izoprenoidy

Charakteristika

- velmi pestrá skupina látek
- přírodní látky vznikající v rostlinných a živočišných organismech
- jejich základní stavební jednotkou je **IZOPREN** (2-methylbut-1,3-dien)
- jednotky izoprenu se mohou spojovat do různě dlouhých řetězců
- rozlišujeme dvě základní skupiny:

- TERPENY
 - STEROIDY

izopren

$$\text{CH}_2 = \underset{\text{CH}_3}{\text{C}} - \text{CH} = \text{CH}_2$$

Terpeny

Charakteristika

- přírodní sloučeniny obsažené hlavně v rostlinách
- patří mezi sekundární metabolity tvořící se v organismu odbouráváním některých látek
- skládají se z různého počtu izoprenových jednotek:
 - MONOTERPENY (2 jednotky, 10 uhlíkových atomů)
 - SESKVITERPENY (3 jednotky, 15 uhlíkových atomů)
 - DITERPENY (4 jednotky, 20 uhlíkových atomů)
 - TRITERPENY (6 jednotek, 30 uhlíkových atomů)
 - TETRATERPENY (8 jednotek, 40 uhlíkových atomů)
 - POLYTERPENY (velký počet jednotek)

Vlastnosti

- mají lipofilní charakter (rozpustné v tucích, nerozpustné ve vodě)
- z chemického hlediska jde o uhlovodíky nebo jejich dusíkaté deriváty (alkoholy, ketony, aldehydy, karboxylové kyseliny), mohou být acyklické i cyklické (s jedním i více kruhy)

Zástupci

Monoterpeny

- těkavé, vonné látky obsažené v silicích, pro svou příjemnou vůni využívané k výrobě parfémů
- MENTHOL je součástí silice máty peprné
- MYRCEN je obsažen ve vavřínové silici

Izopren je pouze strukturálním základem izoprenoidů, v přírodě se volně nevyskytuje.

izopren (viz kap. 20, str. 117)

Terpeny jsou složkou silic, pryskyřic a balzámů. Silice neboli éterické oleje jsou vonné těkavé olejovité tekutiny obsažené v různých částech rostlin, používají se např. v kosmetice, voňavkářství, potravinářství. Pryskyřice vznikají oxidací silic na kůře stromů, jsou to tuhé, lepkavé, ve vodě nerozpustné látky. Používají se např. v lékařství nebo voňavkářství. Balzámy jsou polotekuté směsi pryskyřic a silic, často se používají v kosmetice a lékařství.

menthol

Obrázek 4: Ukázka z učebnice *Odmaturuj z chemie (včetně ev. nedostatků)* s. 178 (cit⁵).

- GERANIOL byl izolován z růžového oleje
- CITRAL je součástí citronové silice
- LIMONEN je obsažen v citronové a pomerančové silici
- KAFR je obsažen ve dřevě kafrovníku, má typickou vůni, uplatňuje se v lékařství a při výrobě umělých hmot (celuloid)
- PINEN je jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších terpenů, jeho hlavním zdrojem je borovicová silice (terpentýn)

Seskviterpeny

- jsou součástí éterických olejů, nacházejí se v řadě rostlin
- FARNESOL je rozšířený, obsažený v různých silicích
- HUMULEN je součástí chmelové silice
- KYSELINA ABSCISOVÁ je přítomna v rostlinných tkáních a způsobuje stárnutí a opadávání listů

Diterpeny

- FYTOL je ve formě esteru součástí molekuly chlorofylu
- VITAMIN A

Triterpeny

- SKVALEN a LANOSTEROL jsou meziproducty metabolismu steroidů


Tetraterpeny


- nejvýznamnější jsou přírodní barviva **KAROTENOIDY** (žluté, oranžové až červené), např. β-karoten, provitamin vitamínu A, nebo lykopen (červené barvivo rajčat)


Polyterpeny


- nejvýznamnější je elastický přírodní **KAUČUK**, používá se v gumárenském průmyslu
- izomerem kaučuku je **GUTAPERČA**, není elastická, získává se z tropických stromů, používá se v elektrotechnice jako izolátor


Poznámky


 Citral se používá při průmyslové syntéze vitamínu A.


 **Terpentýn** (jehož součástí je pinen) se používá jako ředidlo laků.


 Kyselina abscisová je antagonistou růstových hormonů rostlin (působí jako inhibitor růstu).


 Vitamin A retinol je součástí zrakových pigmentů a vzniká štěpením tetraterpenu β-karotenu.

 **vitamin A**
(viz kap. 36, str. 188)

 Skvalen je ve větším množství obsažen ve žraločím tuku.

 Kaučuk se získává ve formě koloidního roztoku tzv. latexu z některých tropických rostlin.

 Průmyslově se vyrábí syntetické kaučuky, např. polymer butadienu nebo chloropren (polymer chlorbutadienu).

 **syntetické kaučuky**
(viz kap. 28, str. 154)

2.1.4. Ukotvení tématu isoprenoidů v kurikulárních dokumentech

RVP pro gymnázia (2007, s. 30)

Vzdělávací obor: Chemie

Vzdělávací obsah: Organická chemie

Očekávaný výstup z RVP:

- Žák charakterizuje základní skupiny organických sloučenin a jejich významné zástupce, zhodnotí jejich surovinové zdroje, využití v praxi a vliv na životní prostředí.

Učivo:

- Deriváty uhlovodíků a jejich klasifikace

Obrázek 5: Ukotvení isoprenoidů v RVP (převzato z⁶).

ORGANICKÁ CHEMIE

Očekávané výstupy

žák

- ▶ zhodnotí vlastnosti atomu uhlíku významné pro strukturu organických sloučenin
- ▶ aplikuje pravidla systematického názvosloví organické chemie při popisu sloučenin s možností využití triviálních názvů
- ▶ charakterizuje základní skupiny organických sloučenin a jejich významné zástupce, zhodnotí jejich surovinové zdroje, využití v praxi a vliv na životní prostředí
- ▶ aplikuje znalosti o průběhu organických reakcí na konkrétních příkladech
- ▶ využívá znalosti základů kvalitativní a kvantitativní analýzy k pochopení jejich praktického významu v organické chemii

Učivo

- uhlovodíky a jejich klasifikace
- deriváty uhlovodíků a jejich klasifikace
- heterocyklické sloučeniny
- syntetické makromolekulární látky
- léčiva, pesticidy, barviva a detergenty

ŠVP Biskupské gymnázium Brno

Učivo:

- Heterocykly, alkaloidy, isoprenoidy

Školní výstupy

- Žák prohloubí a systematizuje dosud získané znalosti v uvedených celcích.
- Žák rozšíří své znalosti v partiích učiva, které byly probrány v chemii v omezené formě.
- Žák aplikuje získané vědomosti v dalších oblastech chemie.
- Žák popíše zdroj a účinek běžných alkaloidů na organismy.

Mezipředmětové vztahy

- Biologie

Téma isoprenoidních látek je probíráno pouze na chemicky zaměřených seminářích některých gymnázií, mezi něž patří i výše jmenované Biskupské gymnázium v Brně. Seminář na této konkrétní škole disponuje dvouhodinovou časovou dotací každý týden, přičemž pro téma isoprenoidních látek je vyčleněna jedna vyučovací hodina o čtyřiceti pěti minutové časové dotaci.

Obrázek 6: Ukotvení isoprenoidů v ŠVP Biskupského gymnázia Brno (převzato z⁷).

5.19.23 Seminář z chemie

Časové, obsahové a organizační vymezení

Ročník	1.	2.	3.	4.
Hodinová dotace	0	0	0	2

Charakteristika předmětu

Seminář z chemie je určen pro žáky posledního ročníku, kteří mají zájem o další vysokoškolské studium s přírodovědným zaměřením.

V semináři si žáci kompletují a rozšiřují chemické znalosti a dovednosti tak, aby byli připraveni a schopni zvládnout maturitní zkoušku, přijímací zkoušky a úvod vysokoškolského studia.

Výchovné a vzdělávací strategie

Výchovné a vzdělávací strategie v semináři z chemie jsou stejné jako v běžných hodinách chemie. Studenti jsou vedeni k efektivní systematické činnosti a samostatnosti.

Přehled učiva a výstupů žáků

Téma	Výstup Žák:	Učivo	Mezipředmětové vztahy, průřezová témata, poznámky
4. ročník			
Biochemie	<ul style="list-style-type: none"> • Prohloubí a systematizuje dosud získané znalosti v uvedených celcích • Rozšíří své znalosti v partiích učiva, které byly probrány v chemii v omezené formě • Aplikuje získané vědomosti v dalších oblastech chemie • Chápe a dokáže popsat biochemické procesy probíhající na biologických membránách a v buněčných organelách • Zná význam, strukturu i zdroje ATP • Umí popsat zdroj a účinek běžných alkaloidů • Zná umístění a umí popsat stavbu a funkci běžných přírodních barviv 	<ul style="list-style-type: none"> • Heterocykly, alkaloidy, izoprenoidy • Vitaminy, enzymy, hormony • Barviva a léčiva • Aminokyseliny, peptidy, proteiny, metabolismus proteinů • Nukleové kyseliny, proteosyntéza • Sacharidy, metabolismus sacharidů • Lipidy, metabolismus lipidů • Energetika biochemických reakcí 	<ul style="list-style-type: none"> PT 6.2.1 PT 6.2.2 PT 6.4.1 PT 6.4.2 PT 6.4.3 BI

2.1.5. Příklad vyučovací hodiny zaměřené na téma isoprenoidů

Didaktická transformace

Téma výukové jednotky: Isoprenoidy

Typ vyučovací hodiny: Seminář z chemie

Typ školy: Gymnázium

Cílová skupina: 3. ročník (SŠ)

Přibližný počet žáků: 25

Hlavní cíle výukové hodiny:

- Žák vyjmenuje základní zástupce isoprenoidů a popíše jejich využití, včetně obecných vlastností.

Další cíle výukové hodiny:

- Žák rozdělí isoprenoidy dle počtu obsažených isoprenových jednotek.
- Žák popíše výskyt isoprenoidů v živých organismech.
- Žák prokáže znalost významu isoprenoidních látek v souvislosti s jejich biologickou aktivitou.
- Žák se orientuje v názvosloví základních isoprenoidních látek a dokáže tvořit příslušné chemické vzorce.
- Žák vyjmenuje nejvýznamnější rostlinné alkaloidy.

Výukové metody:

- Řízená diskuse
- Výklad
- Výuka podporovaná počítačem (tabletem)
- Kooperativní výuka

Organizační formy výuky:

- Frontální
- Skupinová

Klíčové kompetence:

- Kompetence k řešení problémů
 - Žák za pomoci sešitu vyjmenuje nejvýznamnější rostlinné alkaloidy v rámci opakování tématu předchozí hodiny.
- Kompetence k učení
 - Žák uvede základní vlastnosti isoprenoidů.
 - Žák vypíše přírodní zdroje isoprenoidních sloučenin.
- Kompetence komunikativní
 - Žák odpovídá na otázky kladené vyučujícím.
 - Žák v průběhu opakování komunikuje se svým spolužákem.
- Kompetence sociální
 - Žák rozliší jednotlivé zástupce isoprenoidů za pomoci řízené kooperace se spolužákem.
- Kompetence digitální
 - Žák pracuje s moderními technologiemi typu interaktivní tabule a tablet.
 - Žák si opakuje učivo za pomoci elektronických kvízů.

Pomůcky:

Učebnice (Odmaturuj! z chemie 2, 2014)

Interaktivní tabule

Tablety (př: Apple iPad)

Kvízové aplikace Kahoot a Wordwall

Formy hodnocení:

- Úplná zpětná vazba
- Krátká neúplná zpětná vazba
- Slovní hodnocení

Kritéria hodnocení:

- Stupeň komunikace mezi spolužáky
- Stupeň zvládnutí kooperačního kvízu se spolužákem

Časový a obsahový harmonogram výukové hodiny

Výuková jednotka zabývající se tématem isoprenoidů vyžaduje časovou dotaci o délce 45 minut čili jednu vyučovací hodinu základního typu.

Předchozí hodinu bylo probráno téma alkaloidů a v následující vyučovací jednotce se studenti seznámí s tématem vitamínů.

Úvodní část vyučovací hodiny je věnována opakování látky hodiny přechozí. K tomuto účelu mohou být využity tablety a kvízová aplikace Wordwall, ve které si vyučující vytvoří kvízy dle svých preferencí. Opakování může probíhat taktéž formou dotazování na předem připravené otázky, na něž žáci reagují a snaží se o jejich korektní zodpovězení. V ideálním případě, kdy škola disponuje sadou tabletů můžeme využít první možnosti, přičemž žáci v průběhu této aktivity kooperují ve dvojicích.

Prostřední část hodiny obsahuje samotný výklad, který využívá Powerpoint prezentaci komentovanou vyučujícím. V průběhu této aktivity je třeba dbát na poutavost výkladu a názornou obrázkovou podporu. Pro optimalizaci pozornosti studentů, můžeme do středu Powerpoint prezentace vložit video (související s tématem) z internetových video kanálů typu YouTube.

Předposlední část výukové jednotky náleží opakování, pro které mohou být znovu využity tablety a aplikace Kahoot. Aplikace Kahoot je kompetitivní kvízový program, do kterého se žáci přihlásí pod svými jmény a následně za pomoci tabletů, či svých mobilních telefonů poskytují zpětnou vazbu a odpovídají na otázky promítané na dataprojektoru, či interaktivní tabuli. Za každou správnou odpověď obdrží množství bodů, které se v průběhu hry sčítá a na konci kvízu dochází k seřazení žáků na stupně vítězů dle získaného skóre. Program tedy poskytuje částečnou zpětnou vazbu studentům, kteří po dokončení kvízu zjistí svou úspěšnost v činnosti.

Na konci hodiny je vhodné s žáky prodiskutovat poplatnost získaných informací v reálném životě. V jaké oblasti vědění by se jim nabyté informace mohly hodit s přihlédnutím na budoucí typ zvolené vysoké školy.

Tabulka 2: Časový a obsahový harmonogram výukové jednotky.

Čas	Obsah	Cíl	Výuková metoda	Hodnocení	Pomůcky	Zadání
5 min.	Úvod a seznámení s náplní hodiny.	X	X	X	Online třídnice	X

7 min.	Opakování tématu předchozí hodiny	Žák vyjmenuje nejvýznamnější rostlinné alkaloidy.	Řízená diskuse podporovaná tabletem	Krátká neúplná zpětná vazba, slovní hodnocení	Tablet	Na základě nápořvedy vypiř, o jaký alkaloid se jedná.
--------	-----------------------------------	---	-------------------------------------	---	--------	---

20 min.	Isoprenoidy – obecná charakteristika, využití, zdroje	Žák rozdělí terpenoidy dle počtu isoprenových jednotek. Žák popíše výskyt isoprenoidů v živých organismech. Žák prokáže znalost významu isoprenoidních látek v souvislosti s jejich biologickou aktivitou.	Výklad	Úplná zpětná vazba, neúplná krátká zpětná vazba	PPT prezentace, projektor/int eraktivní tabule	Učitel promítá PPT prezentaci, kterou komentuje a doplňuje svým výkladem. V průběhu výkladu se žáci ptají na problémové otázky.
10 min.	Soutěžní kvíz Kahoot. Opakování znalostí získaných v průběhu výkladu.	Žák vyjmenuje základní zástupce isoprenoidů, popíše jejich využití a vlastnosti.	Didaktická hra, výuka podporovaná počítačem (tabletem)	Neúplná zpětná vazba	Tablet, mobilní telefon	Žáci pomocí svých mobilních telefonů, či zapůjčených tabletů vyplňují kvíz, přičemž za správné odpovědi získávají body. Na konci kvízu dochází k vyhlášení vítězů, kteří jsou odměněni motivační známkou.
3 min.	Diskuze o poplatnosti nabytých informací v reálném životě	Žák kriticky přemýšlí a obhájuje poplatnost informací nabytých v průběhu výukové jednotky.	Řízená diskuze	Slovní, úplná zpětná vazba	X	Jak uplatníte znalost isoprenoidních látek v rámci Vařeho budoucího povolání?

Reflexe hodiny

Reflexe činnosti žáka

Žák vyjmenuje základní skupiny a zástupce isoprenoidních látek. Žák vyjmenuje základní zástupce a využití alkaloidů. Žák spolupracuje se svými spolužáky při zpracovávání připravených kvízů.

Autodiagnostika učitele

Byla časová dotace na zvolené téma dostatečná? Byly naplněny všechny stanovené cíle?

Klíčové místo výukové hodiny

Jako klíčové místo vyučovací jednotky může být označena finální diskuse nad poplatností informací získaných v průběhu vyučování. Pokládáním otázek nutíme žáky kriticky přemýšlet, přičemž podporujeme rozvoj klíčových kompetencí studentů.

Kritické místo výukové hodiny

Kritickým bodem výuky může být samotný výklad pomocí Powerpoint prezentace. Tato část výuky se může jevit nudně a nemotivačně. Žáci nemusí udržet svou pozornost po dostatečně dlouhou dobu, což vede k nekázní a špatnému uchopení učiva.

Alterace kritického místa výuky

Abychom předešli negativním jevům popsaným v předchozím odstavci, je nutno prezentaci podpořit poutavými obrázky. Mezi obrázky by se měla řadit jak schémata průmyslových výrob, tak fotky vzniklých produktů. V případě isoprenoidních látek by mohla prezentace obsahovat fotky, či obrázky rostlin, ze kterých byly tyto látky izolovány. V případě 23 – hydroxy betulinu by mohla být v prezentaci zobrazena fotka jeřábu obecného, včetně jeho přirozeného stanoviště.

Harmonogram výkladu (PPT prezentace)

- 1) Obecné charakteristika
 - Slajd 1: Dělení isoprenoidů na terpeny a steroidy
 - Slajd 2: Odvození sloučenin od isoprenu a charakteristické funkční skupiny
- 2) Terpeny
 - Slajd 3: Rozdělení terpenů na 6 dílčích skupin
 - Slajd 4: Obecné informace o skupině terpenů
 - Slajd 5: Surovinová základna terpenů
 - Slajd 6: Využití terpenů
 - Slajd 7: Monoterpeny (menthol, limonen, kafr)
 - Slajd 8: Seskviterpeny (humulen)
 - Slajd 9: Diterpeny (retinol, fytol)
 - Slajd 10: Triterpeny (betulin → 23 - hydroxy betulin)

- Slajd 11: Tetraterpeny (β – karoten, lykopen) a polyterpeny (kaučuk, gutaperča)

3) Steroidy

- Slajd 12: Obecné informace + rozdělení steroidních látek
- Slajd 13: Fytosteroly (ergosterol)
- Slajd 14: Zoosteroly (cholesterol)
- Slajd 15: Steroidní hormony (testosteron, progesteron a estrogen)

2.2. Užití laboratorní metody

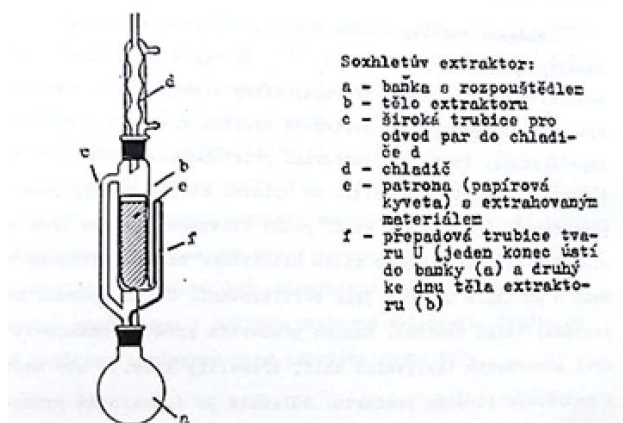
2.2.1. Extrakce (vyluhování)

V průběhu experimentální části bakalářské práce i práce diplomové se využívalo k získání 23 – hydroxy betulinu z kůry jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) Soxhletova extraktoru. Extrakce v tomto přístroji je náročná na čas a je třeba ji provádět opakovaně k získání nejvíce koncentrovaného výluhu s obsahem požadované terpenoidní sloučeniny. Po extrakci byla látka zkoncentrována v destilační aparatuře.

Soxhletova přístroje bylo využito z důvodu snadné obslužnosti a možnosti kontinuální extrakce čerstvým rozpouštědlem, která je v tomto případě velice žádoucí.

Přístroj má několik částí, přičemž se do střední části přístroje vkládá patrona, která je předem naplněna drobnými vyčištěnými a vysušenými úlomky kůry jeřábu ptačího. K zábrusu ve spodní části přístroje je připojena varná baňka naplněná rozpouštědlem a z vrchní části je na střední část přístroje nasunut zpětný chladič, sloužící ke kondenzaci par vznikajících v průběhu varu rozpouštědla⁸.

Obrázek 7: Schéma a popis Soxhletova extraktoru (převzato z⁸).



Z hlediska didaktiky chemie jsou pokusy využívající metody extrakce velice atraktivní. Žákům může být zdůvodněno, že tohoto principu může být využito nejen v laboratořích při získávání dalších látek dále využívaných například v lékařství, kosmetice ale i v průmyslovém měřítku, kde je extrahován materiál za účelem získání produktů využitelných

v potravinářství. Jako příklad poslouží extrakce rostlinného materiálu (nejčastěji semen) za účelem získání rostlinných olejů (slunečnicový, řepkový atd.).

V případě chemických pokusů je nutno dodržovat bezpečných postupů a žáky důsledně proškolit o bezpečnosti práce v chemické laboratoři. Je důležité tyto postupy dodržovat a vyžadovat jejich důsledné plnění v každodenní laboratorní činnosti. V případě extrakce pracujeme s těkavými rozpouštědly a žářem topného tělesa, tudíž je nutno využívat ochranné pomůcky zabraňující poškození lidského zdraví a újmě na majetku⁹.

2.2.2. Destilace

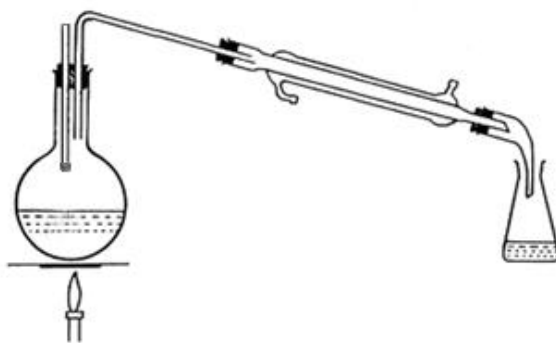
Destilace je vhodný způsob oddělení dvou a více kapalin na základě rozdílných teplot varu. Tato metoda se uplatňuje jak v laboratořích, tak v různých odvětvích průmyslu jako je výroba lihu, či zpracování ropných frakcí.

Tato metoda je též nutná při přípravě extraktů v laboratořích i průmyslu. Chemické laboratoře využívají destilaci v nejznámějších provedeních i při zpracování malých množství kapalin.

Jedná se o jednu z nejnáročnějších metod semimikrotechniky, neboť klade důraz na pečlivost a kvalitní sestavení aparatury rozličných tvarů a velikostí.

V případě zahřívání kapaliny umístěné ve varné baňce dochází k jejímu varu a při průchodu par aparaturou přes chladič k následné kondenzaci, přičemž vzniklý kondenzát se kulminuje v jímací baňce⁸.

Obrázek 8: Destilační aparatura (převzato z¹⁰).



Destilace je vhodná metoda, kterou učitel může zařadit do výuky chemie především jako demonstrační prostředek. Žák v průběhu metody pochopí důležitost fyzikálních vlastností látek, mezi něž patří například teplota varu. V dnešní době je možno žákům promítnout video prostřednictvím internetových portálů (YouTube atd.), avšak reálná demonstrace ve školních prostorách je zajisté nejefektivnějším a nejvíce motivačním faktorem při výuce chemie. V průběhu experimentu je též nutno dbát na slovní popis pokusu, který žákům ujasňuje, k čemu v průběhu experimentu dochází. V případě dokonalého propojení slovního popisu a samotného provedení experimentu dochází k nejproduktivnějšímu vzdělávacímu efektu¹¹.

V průběhu vyučovací jednotky je nutno celou destilační aparaturu detailně popsat, upozornit na fyzikální odlišnosti destilovaných kapalin a též na bezpečné provedení celé operace (vhodný zdroj tepla, umístění vstupu a výstupu chladící kapaliny).

2.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Pro potřeby zisku 23 – hydroxy betulinu bylo využito efektivní metody analytické chemie známé jako „tenkovrstvá chromatografie“.

Principem této metody je rozdělování jednotlivých látek obsažených v soustavě pomocí dvou fází. První je fáze mobilní, kterou představuje vhodné rozpouštědlo. Druhá fáze se nazývá stacionární.

Stacionární fáze je v principu tvořena hliníkovou destičkou převrstvenou sorbentem, jenž je nejčastěji tvořen silikagelem, či oxidem hlinitým. Mobilní fází jsou převážně organická rozpouštědla vybraná tak, aby vzorek vymyla do analyzované plochy, nikoliv mimo sorbent.

Tenkovrstvá chromatografie slouží ke sledování čistoty námi analyzované organické látky a je vhodná pro zpracování barevných sloučenin, avšak je možno ji použít i pro analýzu sloučenin bezbarvých.

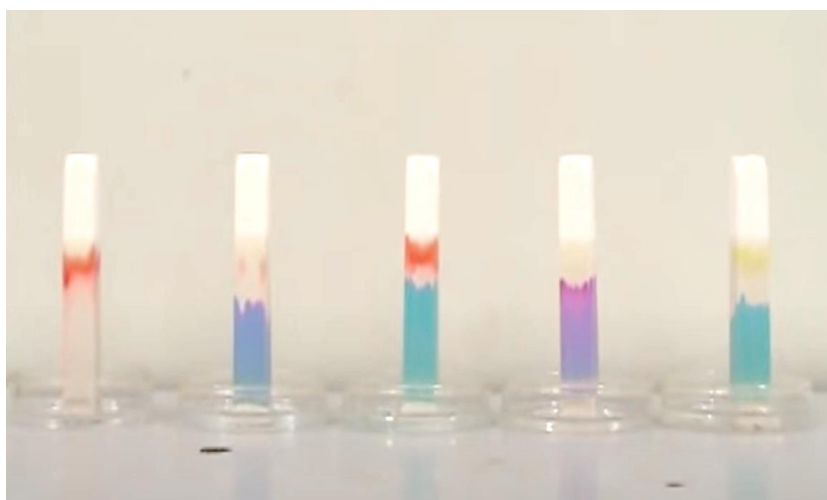
Po nanesení vzorku na stacionární fázi a jeho následnému vložení do soustavy s mobilní fází je třeba využít detekčních činidel, která zobrazí dráhu analyzovaného vzorku na povrchu sorbentu. Mezi vhodné detekční metody patří například postříkání plochy roztokem desetiprocentní kyseliny sírové a následným zahřátím vzorku, přičemž dojde ke zuhelnatění analyzované organické látky⁸.

Chromatografií 23 – hydroxy betulinu se zabýval americký chemik Lawrie, jenž využíval kůry blahovičnicku královského (*Eucalyptus regens*) k extrakci triterpenoidních sloučenin s důrazem na 23 – hydroxy betulin. Následným procesem bylo odtučnění vzorku petroletherem a světlem, přičemž pomocí etheru vyextrahoval nezmýdelněný materiál. Proces byl velice časově náročný a trval celý jeden den. Bylo zjištěno, že vyextrahovaný materiál obsahoval množství 23 – hydroxy betulinu¹².

Lawrie se nezabýval pouze 23 – hydroxy betulinem, ale zkoumal i jeho deriváty, mezi něž patří 23 – hydroxy allobetulin získaný varem 23 – hydroxy betulinu ve směsi ethanolu a kyseliny chlorovodíkové pod zpětným chladičem, kdy následně došlo k izolaci etherem. Na konci postupu získal čistý vzorek 23 – hydroxy allobetulinu¹².

Tenkovrstvou chromatografií lze využít i při výuce chemie, neboť se jedná o velice efektní experiment, který může být proveden za využití jednoduchých pomůcek (různobarevné fixy, křída, voda a plastové kapátko). Různobarevnými fixy nakreslíme po obvodu kříd čáry a následně křídly postavíme do misek s vodou. Křída s čárami poslouží jako stacionární fáze a voda jako fáze mobilní. Po provedení úkonu dojde k rozpuštění barev, přičemž se jednotlivé barvy dostanou do různých vzdáleností dle pevnosti vazby jednotlivých barev k podkladu. Podobné pokusy mohou žáci provádět i v domácím prostředí při konání distanční výuky, či jako doplněk vyučování. V průběhu experimentování si žáci zopakují pojmy jako je rozpouštědlo, rozpouštěná látka, chromatografie atd.¹³.

Obrázek 9: Chromatografie barvy fixu (převzato z¹³).



Dělení chromatografických metod

Chromatografické metody můžeme dělit několika způsoby, a to dle principu dělení, podle užití mobilní fáze, či tvaru (uspořádání) stacionární fáze.

a) Dle principu dělení

I. Rozdělovací chromatografie

Na rozvoji této metody se podíleli vědci Archer Martin a Richard Laurence Millington Synge v průběhu 40. let 20. století. V průběhu rozdělovací chromatografie dochází k separaci sloučeniny mezi dvěma kapalinami, přičemž ve sloučenině dochází k interakci s dvojicí navzájem nemísitelných kapalných fází za vzniku rovnováhy¹⁴.

II. Adsorpční chromatografie

Princip této metody spočívá v oddělení látek rozpuštěných v roztoku od sebe. V průběhu chromatografického procesu dochází k ukládání mobilní fáze na povrch fáze pevné neboli stacionární fáze. Za adsorpci mobilní fáze mohou s největší pravděpodobností slabé nevazebné Van der Waalovy síly¹⁴.

III. Ionově výměnná (Ionexová) chromatografie

Tato metoda spočívá v odtržení iontu vázaného v tuhé nemísitelné fázi, následným převodem do roztoku a jeho náhrada jiným iontem, který je obsažen v roztoku. Výměna iontů závisí především na síle, která poutá iont v měničce iontů, vlastnostech vyměňovaných iontů a v nemísitelnosti měniče iontů a kapalně fáze¹⁵.

IV. Gelová chromatografie

V případě gelové chromatografie je stacionární fází syntetický neionizovaný gel, který je umístěn ve svislé koloně a jsou v něm vytvořeny malé póry. Tento gel následně funguje jako molekulové síto. Molekuly větší, než póry gelu jím následně nemohou pronikat a procházejí přes kolonu rychlostí mobilní fáze. Látky se zde rozdělují dle zmenšujících se rozměrů molekul¹⁶.

b) Dle mobilní fáze

I. Plynová chromatografie

Vzorek je dávkován do proudu plynu, který jej následně unáší kolonou. Mobilní fáze je nazvána jako nosný plyn. Pro správný transport vzorku je nutné jeho okamžité zplynování po vstupu do zařízení. V chromatografické koloně dochází

k selekci složek na základě rozdílné schopnosti poutat se k stacionární fázi. Pomocí plynové chromatografie můžeme určovat například zastoupení methanolu, či ethanolu v destilátech¹⁷.

II. Kapalinová chromatografie

Součástí HPLC aparatury je vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje protečení mobilní fáze kolonou o menších rozměrech. V níž je stacionární fáze vázána na velice malé částice měřící pouze několik mikrometrů. Výhodou této metody je bezesporu její vyšší účinnost a menší doba analýzy než v případě využití klasické sloupcové chromatografie¹⁸.

c) Dle uspořádání

I. Sloupcová chromatografie

Dělicí médium je umístěno ve skleněných, či kovových vertikálně uspořádaných trubicích, přičemž jsou naplněny stacionární fází často ve formě pevného silikagelu se vzorkem. Mobilní fáze je protékající organické rozpouštědlo.

II. Chromatografie v plošném uspořádání

Patří sem již popsané metody chromatografie jako PC (papírová), či TLC (tenkovrstvá).

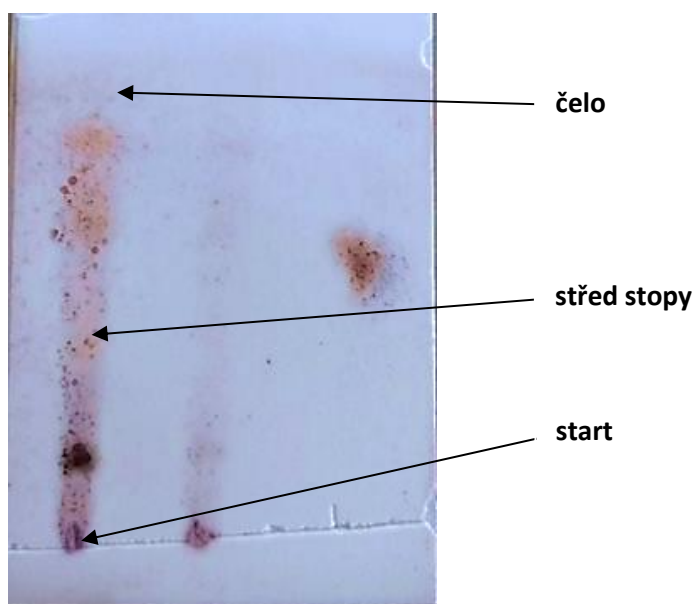
2.2.4. Retenční faktor

Hodnota R_f (retenčního faktoru) představuje zaostání skvrny analyzované látky za čelem rozpouštědla a je závislá na konkrétní vyvíjecí soustavě. Vztah pro výpočet retenčního faktoru je definován jako podíl vzdálenosti středu skvrny od startu (V_m) a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu (V_r)¹⁹.

$$R_f = \frac{V_m}{V_r}$$

Díky retenčnímu faktoru jsme schopni přepočítat rozmezí jednotlivých chromatografických zón z malých chromatografických destiček (6x3 cm) na velké skleněné chromatografické desky převrstvené silikagelem (20x20 cm). Větší desky s větším množstvím analyzované látky využijeme v metodě známé jako preparativní tenkovrstvá chromatografie¹⁹.

Obrázek 10: Hliníková destička s naneseným sorbentem a stopou analyzovaného vzorku.



2.2.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie

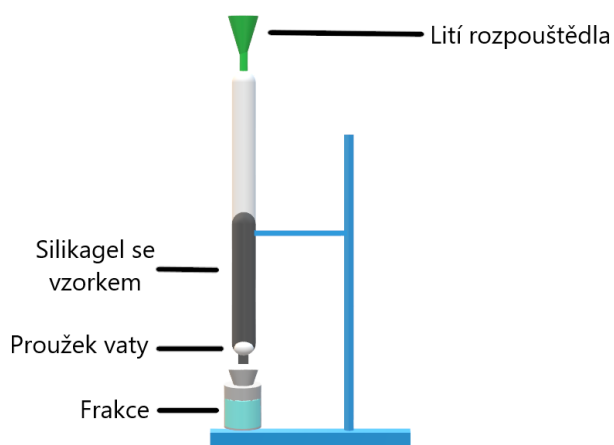
Rozdíl mezi preparativní tenkovrstvou chromatografií a klasickou TLC je především ve velikosti chromatografických desek, které v případě prvně zmíněné metody dosahují výšky a šířky 20 cm (20x20), přičemž tloušťka vrstvy bývá až 3 mm. Povrch chromatografické desky je nutno opatřit dostatečnou vrstvou sorbentu. V našem případě bylo využito Erlenmeyerovy baňky, ve které byla připravena suspenze 20 g práškového silikagelu ve 45 ml destilované vody⁸. Tato suspenze byla následně rovnoměrně nanášena na povrch skleněné desky. Po zaschnutí sorbentu bylo přistoupeno k nanášení vzorku pomocí balonku.

Po nanášení vzorku na chromatografickou desku došlo k jejímu vložení do vyvíjecí soustavy s dostatečným množstvím předem vybrané směsi rozpouštědel. Následně bylo přistoupeno k sejmutí příslušných chromatografických zón, jejichž poloha byla zjištěna pomocí výpočtů retenčního faktoru. Dalším krokem bylo naplnění skleněných kolon sejmutými zónami, jež tvořil silikagel s analyzovaným vzorkem. Následně byl vzorek promýván vhodným rozpouštědlem.

Po eluci rozpouštědla v kolonách byly frakce vyjmuty, destilovány a následně dosušeny v laboratorní sušárně při 120 °C.

Posledním krokem bylo zvážení jednotlivých vzorků (bez přítomnosti varného kamínku) a zápis hodnot k pozdějšímu zpracování.

Obrázek 11: Aparatura pro zpracování vzorků preparativní chromatografie.



Pro zjištění informace o nejvhodnějším rozpouštědle k extrakci kůry jeřábu ptačího bylo nutno zakápnout vysušené frakce preparativní chromatografie několika kapkami chloroformu a vzorky následně nanést a chromatografovat (TLC) na malých aluminiových destičkách. Touto metodou bylo analyzováno nejvhodnější rozpouštědlo vhodné pro následující kroky práce.

2.3. Volba vhodné metody extrakce 23 – hydroxy betulinu

Z důvodu většího množství zpracovávaného materiálu byla zvolena metoda extrakce pomocí Soxhletova extraktoru, který je na naší fakultě dostupný a velice vhodný k dosažení tíženého výsledku. Tento přístroj je vhodný pro extrakci organických látek z rostlinných materiálů, tedy i z kůry jeřábu ptačího bohaté na terpenoidní látky.

Před započítím práce v laboratoři bylo důležité zvolit správnou metodu postupu, která by vyhovovala povaze experimentální části práce.

2.3.1. Dříve popsané metody extrakce

Extrakcí 23 – hydroxy betulinu se zabýval americký vědec J. W. Lawrie (cit¹²), který zpracovával vzorek kůry blahovičnicku královského (*Eucalyptus regens*). Na počátku jeho experimentu došlo k odtučnění vzorku pomocí petroletheru a následné extrakci za pomoci etheru. Na konci postupu byl získán nezmýdelněný materiál, ve kterém byla na základě chromatografie zjištěna přítomnost 23 – hydroxy betulinu¹².

Extrakce uvedena v práci²⁰ vychází z postupné extrakce 180 g vysušené jeřábové kůry (*Sorbus aucuparia*). K extrakci byl využit Soxhletův přístroj, přičemž byla kůra vylouhována pomocí petroletheru. Dále bylo nutno oddestilovat rozpouštědlo, což poskytlo získání látky, která 23 – hydroxy betulin prakticky neobsahovala. V tomto extraktu se nacházelo větší množství méně polárních složek.

Následovala extrakce diethyletherem. Tento postup trval přibližně 50 hodin a poskytl 3,2 % obsah látky. Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla prokázána přítomnost 23 – hydroxy betulinu ve velkém množství.

Třetím rozpouštědlem pro louhování kůry byl zvolen methanol. Postup, jenž trval obdobně dlouhou dobu jako při extrakci etherem poskytl 19,4 gramů vyextrahované látky, která odpovídala procentuálnímu výtěžku 10,8 procenta nezmýdelněné látky. Po provedení TLC bylo zjištěno, že tento vzorek 23 – hydroxy betulinu obsahoval větší množství polárnějších složek.

Poté se přistoupilo k chemické reakci, která nese název zmýdelnění. Zmýdelnění vzorku v tomto případě představovalo přidání alkoholického roztoku NaOH, v průběhu čehož vznikala jako odpadní produkt amoniak.

Ve zmýdelněném vzorku nebyla standartními metodami dokázána přítomnost 23 – hydroxy betulinu, tudíž se přistoupilo k metodě sloupcové chromatografie na sloupci oxidu hlinitého a následnou krystalizací ve směsi benzenu a methanolu. Sloupcovou chromatografií byl získán 23 – hydroxy betulin. V průběhu této metody je vhodné opakovaně využít krystalizace ve směsi benzenu a methanolu.

2.3.2. Zvolená metoda postupu pro extrakci 23 – hydroxy betulinu

Po volbě vhodného rozpouštědla a vyextrahování vzorku z kůry jeřábu obecného pomocí Soxhlethova extraktoru je vhodné výsledný produkt zmýdelnit pomocí ethanolického roztoku hydroxidu sodného, poté využít metodu chromatografie na sloupci oxidu hlinitého a následně vzorek opakovaně krystalizovat ve směsi benzenu a methanolu.

V průběhu této práce došlo k otestování metody, kdy se vzorek extrahoval přímo methanolem a následně byl zmýdelněn ethanolickým roztokem hydroxidu sodného. Získaná látka byla analyzována metodou preparativní tenkovrstvé chromatografie a výsledná frakce poskytla relativně čistý vzorek 23 – hydroxy betulinu.

2.4. Chromatografická rozpouštědla

Na trhu existuje velké množství organických rozpouštědel vhodných pro extrakci terpenoidů z rostlinného materiálu a vždy je výhodné určit, pomocí kterého rozpouštědla získáme nejvíce látky v požadované čistotě. Mezi chromatografickými rozpouštědly je množství rozdílů, přičemž se liší především schopností rozpuštění dané látky. Tento fakt

závisí na povaze rozpouštěné molekuly. Nejdůležitějšími faktory je selektivita a polarita látky.

Pro polární molekuly je charakteristická přítomnost polárních vazeb. Ty mají významný vliv na rozpustnost látek a je pravděpodobné, že se taková látka bude ochotně rozpouštět v polárním rozpouštědle. I zde platí známá poučka, podobné se rozpouští v podobném.

Při chromatografických metodách je nutno vybírat vhodná rozpouštědla tak, aby zvolená metoda byla účinná a nedocházelo ke zbytečným chybám při analýze. Příkladem výběru nekompatibilních rozpouštědel může být neschopnost vzlínání složek vzorku pomocí mobilní fáze ($R_f = 0$), či příliš velká vzdálenost vynesení vzorku na destičce od startu ($R_f =$ příliš vysoká hodnota).

To znamená, že každé rozpouštědlo má přímý vliv na hodnotu R_f látek, které oddělujeme. Je-li na daném nosiči (stacionární fázi) R_f chromatografované látky blízko nuly, může pomoci využití polárnějšího rozpouštědla. Pokud látka postupuje příliš rychle (R_f je vysoké) s čelem rozpouštědel, může pomoci snížení polaritu rozpouštědla. V obou případech je nutnou podmínkou alespoň částečná rozpustnost chromatografované látky v použitém rozpouštědle. Z tohoto důvodu třídíme organická rozpouštědla do eluotropních řad²¹.

2.4.1. Eluotropní řada

Pokud rozpouštědla seřadíme dle jejich polaritu, vytvoříme tzv. eluotropní řadu, kterou představuje tabulka č.3. V této tabulce jsou rozpouštědla řazena dle jejich klesající relativní permitivity a ta, která jsou umístěna ve své blízkosti budou pravděpodobně dobře mísitelná mezi sebou. Rozpouštědla, která se nacházejí na protilehlých koncích spolu mísit nelze²¹.

Tabulka 3: Eluotropní řada organických rozpouštědel (převzato z⁹).

ELUOTROPNÍ ŘADA ROZPOUŠTĚDEL

Rozpouštědlo	Relativní permitivita ϵ	Rozpustnost ve vodě (g/l)
Pentan	1,84	0,04
Hexan	1,90	0,14
Cyklohexan	2,00	0,10
Tetrachlormethan	2,20	0,80
Sirouhlik	2,60	2,20
Toluen	2,40	0,47
Benzen	2,30	1,80
Diethylether	4,30	74,2
Chloroform	4,80	10,0
Aceton	20,7	mísitelný
Dioxan	2,21	mísitelný
1-Pentanol	13,9	21,9
Tetrahydrofuran	7,60	mísitelný
Ethylacetát	6,00	86,0
Diethylamin	3,58	mísitelný
Acetonitril	37,5	mísitelný
1-Butanol	17,1	79,0
Pyridin	12,4	mísitelný
Isopropylalkohol	19,9	mísitelný
Ethanol	24,3	mísitelný
Methanol	32,6	mísitelný
Ethylenglykol	37,7	mísitelný
Kyselina octová	6,15	mísitelný

2.4.2. Výběr vhodného rozpouštědla

Nejdůležitějším poznatkem při výběru rozpouštědla je vybrat takové, v němž se ještě všechny složky chemické směsi rozpouštějí.

Je třeba vybrat takové rozpouštědlo, při kterém daná látka na použitém nosiči (stacionární fáze) vykazuje hodnotu R_f kolem 0,3. V případě silného poutání látek rozpouštědlem dojde k jejich zastavení na startu vyvíjecího procesu, přičemž v opačném případě analyzované látky překonají předem stanovené rozmezí a analýza bude zatížena chybou²².

2.5. Pomůcky využívané v průběhu experimentu

2.5.1. Skleněný balónek

Pro práci s malými kvanty kapalin bylo třeba připravit několik skleněných balonků. K jejich zhotovení je třeba plynový kahan, nůž na sklo a trubice vhodného průměru (8–12 mm) z měkkého skla. Při výrobě balonku ze skleněných trubic o jiném průměru a tvrdosti dochází k horšímu výsledku, přičemž se balonek obtížněji vyfukuje, či dochází k praskání výsledného produktu. Správnou teplotu tavení skla poznáme podle toho, že při zahřívání skleněné trubice se plamen kahanu barví do žlutooranžova. Při použití trubice ze skla tvrdého (Sial nebo Simax) je teplota laboratorního plynového kahanu nedostatečná a je potřeba využít speciálního sklářského kahanu (s přídavkem kyslíku).

V případě zasunutí skleněného balonku do kapaliny (používaných rozpouštědel), dochází pomocí efektu roztažnosti plynů v závislosti na okolní teplotě k nasávání kapaliny z příslušné nádoby. K tomuto efektu by nedošlo v případě, že by balonek nebyl předem zahříván v dlani. Funkce tohoto jevu je závislá na změně tlaku plynu obsaženého uvnitř balonku a tento tlak je přímo závislý na vnitřní a vnější teplotě. V případě zahřátí a následného ochlazování balonku pomocí okolního vzduchu dochází ke snížení tlaku uvnitř balonku a rychlejšímu nasávání transportované kapaliny. Při zahřátí balonku obsahujícího kapalinu dochází naopak ke zvýšení tlaku plynů uvnitř a k následnému vyprazdňování obsahu balonku⁸.

Příprava chemických pomůcek, a to především práce se sklem by měla být při výuce studentů chemických oborů brána velice vážně, neboť se při chemických experimentech nejednou setkáváme s potřebou úpravy chemických aparatur.

2.5.2. Kapiláry

Kapiláry jsou hojně využívanou pomůckou v průběhu chemických experimentů, neboť umožňují snadný transport malého množství kapalin v průběhu práce ať už v mikro, či semimikrotechnice. Funkce kapilár je přímo závislá na kapilárním tlaku, který vzniká zakřivením povrchu kapaliny v kapiláře. Kapilární tlak je směřován do středu křivosti povrchu kapaliny. Tento jev nepůsobí na kapaliny, které mají svůj povrch zcela rovný. Jsou známy dva povrchy, a to povrch vypouklý a dutý. V případě vypouklého povrchu působí kapilární tlak do kapaliny. Dutý povrch je způsoben kapilárním tlakem působícím směrem ven z kapaliny²³.

V případě volného povrchu kapaliny kulovitého tvaru označujeme kapilární tlak jako p_k a vyjadřuje jej výpočet:

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

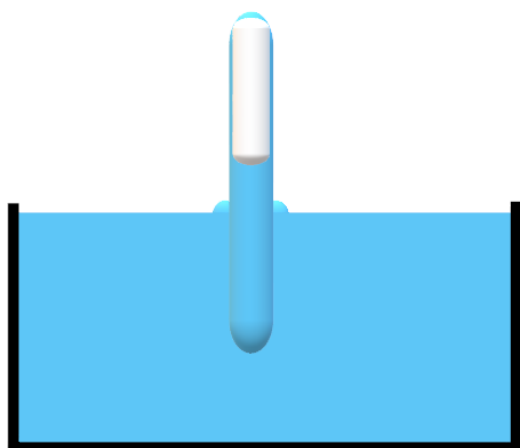
r ve výpočtu představuje poloměr kapiláry a sigma σ povrchové napětí kapaliny

V případě vložení kapiláry do kapaliny dochází ke dvěma jevům. Prvním z nich je kapilární elevace, při které dochází ke stoupaní hladiny kapaliny v kapiláře nad úroveň kapaliny v nádobě. Kapilární deprese představuje pokles hladiny v kapiláře oproti hladině kapaliny v nádobě. Při výpočtu výšky hladiny kapaliny v kapiláře pro případ kapilární elevace volíme vztah²³.

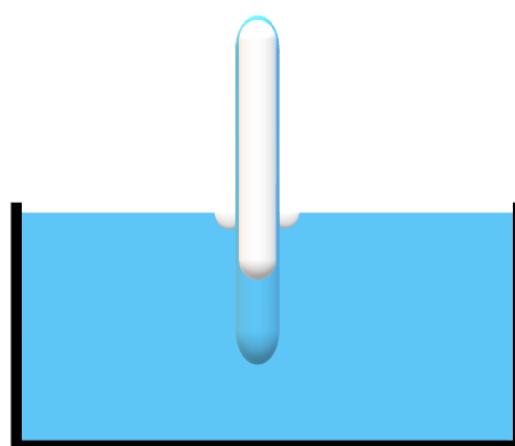
$$h = \frac{2\sigma}{\rho g R}$$

Ke kapilární elevaci dochází u kapalin s nižší hustotou jako je na příklad voda a ke kapilární depresi u kapalin s hustotou vysokou například rtuť²⁴.

Obrázek 12: Znázornění kapilární elevace a kapilární deprese.



Kapilární elevace H₂O



Kapilární deprese Hg

3. Experimentální část

V průběhu práce bylo využito dostupné vybavení školních laboratoří. Pod pojmem voda je myšlena voda destilovaná čili zbavená nežádoucích iontů destilačním přístrojem. Během práce byly užívány chemikálie o běžně dostupné čistotě.

3.1. Pomůcky

Na počátku práce bylo třeba připravit nezbytné pomůcky pro přemísťování kapalných látek. Těmito pomůckami jsou myšleny převážně skleněné balonky a kapiláry, které byly vytvořeny ze skleněných trubic o průměru 8–12 mm. Tyto nástroje značně usnadnily manipulaci s tekutinami a jejich následné uchování.

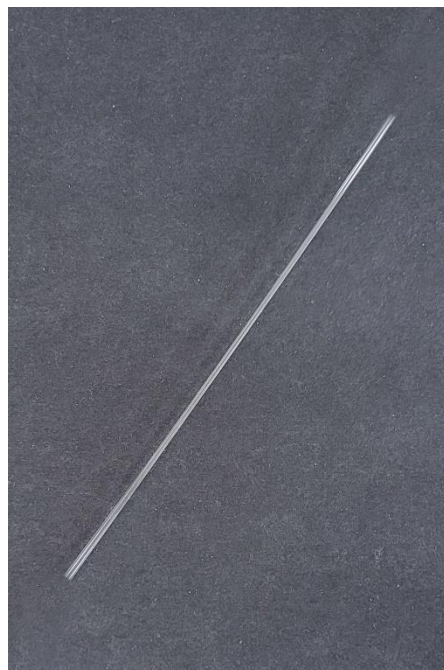
V průběhu práce bylo nutno zhotovit chromatografické desky využitě především v preparativní chromatografii. Chromatografické desky se skládají ze skleněných desek (20x20 cm) s vrstvou naneseného sorbentu. V tomto případě se jedná o silikagel.

3.1.1. Zhotovení kapiláry

Obrázek 13: Rozdíl mezi tvarem kapiláry a balónku.



balonky

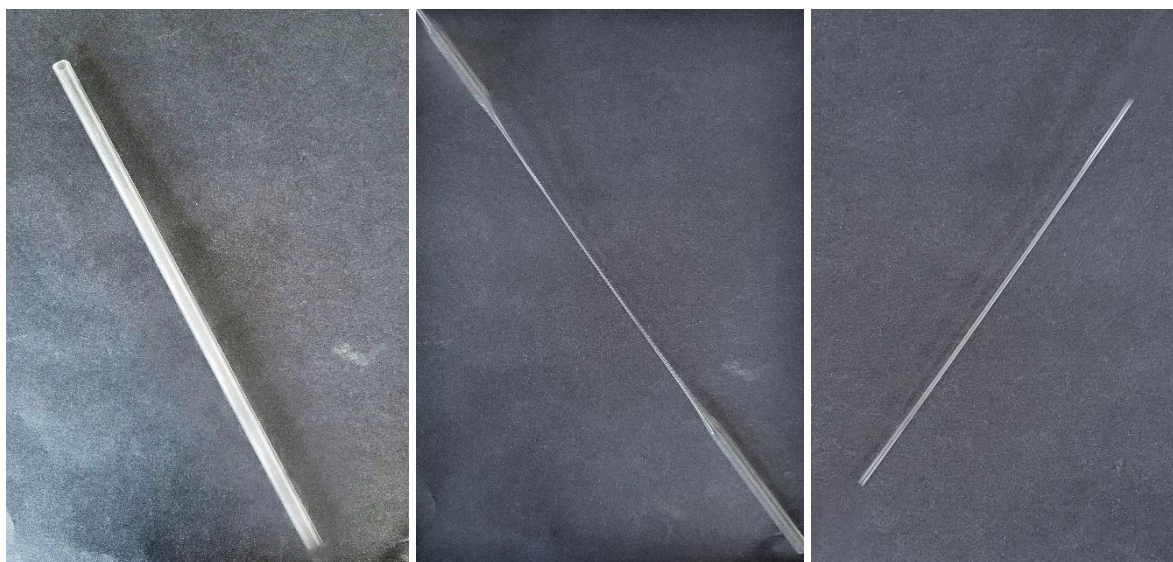


kapilára

Při zhotovení tenké kapiláry je potřeba dodržet několik zásad, pomocí nichž docílíme kvalitního výsledku. Pomůcky nutné k přípravě kapiláry jsou trubice vhodných rozměrů (průměr 8-12 mm), nůž na sklo a kahan s rovnoměrným plamenem. Trubice by měla být z měkkého skla, které se snáze tvaruje při teplotách plamene laboratorního kahanu. V případě použití trubic z tvrdého skla (Simax) je nutno využít speciální sklářský kahan, jehož plamen je sycen kyslíkem a dosahuje vyšších teplot.

Prvním krokem přípravy kapiláry je uříznutí vhodného kusu skleněné trubice, který měří přibližně 20 cm. Trubicí řežeme speciálním nožem na sklo, kterým na povrch skla vyryjeme malou štěrbinu, ve které poté dojde k lomu. Následně vzniklý kus skla uchopíme oběma rukama, přičemž jeho střed vložíme do plamene kahanu, tak aby byl v zóně s největším žářem. V bodě styku skla a plamene kahanu začne sklo měknout a pomalu přecházet do mírně zkapalněného stavu. V případě dosažení bodu optimální měkkosti skla táhneme pomalu ruce od sebe, přičemž se tahem vytvoří tenká trubička neboli kapilára. Vzniklou kapiláru následně vylomíme od tlusté trubice na stranách a poté je připravena k použití⁸.

Obrázek 14: Soubor obrázků znázorňující meziprodukty zhotovení skleněné kapiláry.



3.1.2. Zhotovení balónku

Prvním krokem je zahřátí skleněné trubice o délce 20 cm a její vytažení do tvaru tenké kapiláry, kterou po dokončení zatavíme. Následně je nutno kapiláru oddělit od jedné periferní části skleněné trubice a začátek kapiláry u druhé rovnoměrně zahřívát až do bodu měknutí skla. Po změknutí skla foukneme do skleněné trubice, přičemž se vytvoří vypouklá část skleněného balonku. Posledním krokem je zahřátí oblasti styku zbylé skleněné trubice s balonkem a vytažení této části do druhé kapiláry, kterou následně v dostatečné vzdálenosti přelomíme. Tímto způsobem zhotovíme balonek připravený k transportu a uchování kapalin⁸.

Obrázek 15: Meziprodukty a výsledný balonek.



tenká kapilára

vytvoření vypouklé části

vytažení druhé části trubice



výsledný balonek

3.1.3. Příprava skleněných desek pro metodu preparativní chromatografie

Prvním krokem bylo očištění několika skleněných desek o rozměrech 20x20 cm ethanolem, který zajistil vysokou čistotu a odmaštění skla použitého v průběhu analýzy. Poté byl připraven sorbent ve formě práškového silikagelu (20 g), který byl suspendován ve 45 mililitrech destilované vody.

Silikagel byl odvážen na laboratorní váze a následně převeden do suspenze v Erlenmeyerově baňce za pomoci destilované vody. Elektrická váha má nepopiratelnou výhodu v přesnosti měření a v možnosti vytárování (vynulování) nádob sloužících k rozpouštění a suspenzi látek. Erlenmeyerova baňka byla vytárována a následně do ní bylo vsypáno přesné množství silikagelu, ke kterému bylo přilito 45 ml destilované H₂O. Následovalo převedení sorbentu do suspenze a jeho vylití z Erlenmeyerovy baňky na připravenou skleněnou desku. Homogenního rozšíření sorbentu bylo dosaženo poklepáváním prsty na spodní stranu skleněné plochy. Posledním krokem bylo vyčkání do úplného zaschnutí silikagelu na chromatografických deskách.

Obrázek 16: Chromatografická deska (20x20cm) pokrytá zaschlým silikagelem²⁵.



3.2. Výběr rozpouštědla pro extrakci

Úvodem práce byl výběr vhodného organického rozpouštědla, které bylo užito k extrakci 23 – hydroxy betulinu z kůry jeřábu obecného. Bylo důležité zvolit takové rozpouštědlo, které ze vzorku vymývá největší množství extrahované látky.

Bylo přistoupeno k porovnávací metodě, kdy došlo k využití pěti lékovek, do kterých bylo vloženo malé množství předem odvážené kůry jeřábu obecného. Do jednotlivých lékovek byla následně přilita rozpouštědla methanol, ethanol, aceton a dioxan.

Tabulka 4: Obsah jednotlivých lékovek²⁵.

Vzorek	Název rozpouštědla	Kůra v gramech
1	methanol	0,9981
2	ethanol	1,0023
3	aceton	1,0026
4	dioxan	1,0069

Kůra v lékovkách byla louhována deset dní. Následně byla provedena metoda TLC (tenkovrstvá chromatografie), která nám poskytla údaje o vymývání extrahované látky jednotlivými rozpouštědly.

V průběhu chromatografie bylo nutno určit správné složení mobilní fáze. Následně byly testovány různé poměry vyvíjecí soustavy rozpouštědel mobilní fáze hexan – ethylacetát viz obrázek č. 17.

Jako nejvhodnější se prokázala soustava 10:3 hexan:ethylacetát.

Obrázek 17: Tenkovrstvá chromatografie látky v různých soustavách organických rozpouštědel n-hexan:ethyl-acetát (poměry rozpouštědel z levé strany 10:3, 1:1, 3:10, 1:0, 0:1)²⁵.

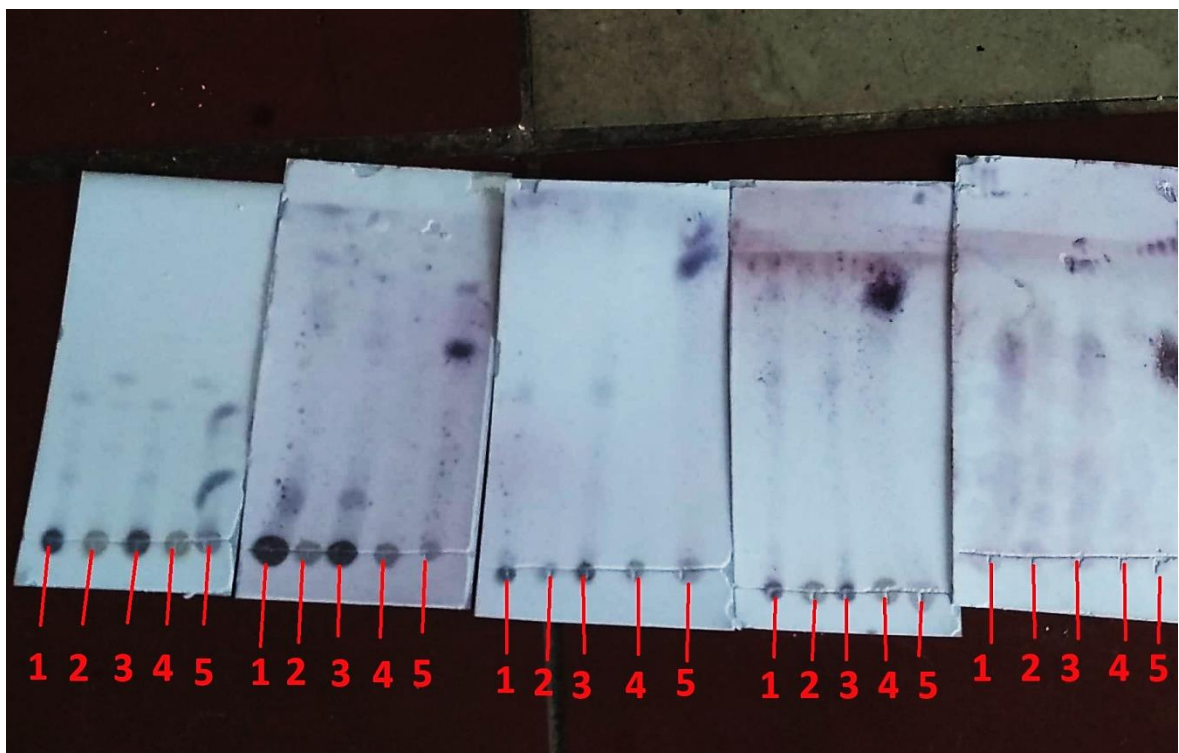
Stopa 1: kůra extrahovaná v methanolu

Stopa 2: kůra k extrahovaná v ethanolu

Stopa 3: kůra extrahovaná v chloroformu

Stopa 4: kůra extrahovaná v acetonu

Stopa 5: kůra extrahovaná v dioxanu



3.2.1. Tenkovrstvá chromatografie jednotlivých vzorků

Na počátku experimentu bylo třeba ustříhnutí plíšků chromatografické folie o vhodném rozměru (6 x 3 cm). Pro práci byl využit chromatografický plíšek DC – AlufolienKieselgel 60 F254 se silikagelovou povrchovou úpravou. Po vystřížení plíšků o vhodných rozměrech byl vyznačen start a na tento start bylo vyryto 5 bodů sloužících pro nanesení jednotlivých chromatografovaných vzorků. Mezi vyrytými body byly dodržovány optimální odstupy, aby nedošlo k překrytí drah vzlínání (při průměru stopy cca 3 mm měřily rozestupy mezi středy stop přibližně 6 mm).

Nanášení vzorků probíhalo za pomoci předem připravených skleněných kapilár, přičemž pomocí kapiláry bylo vždy nasáto rozpouštědlo s vylouhovaným vzorkem a přesunuto na příslušný vyrytý bod. Po nanesení vzorku byl kontaminovaný konec kapiláry odlomen a pokračovalo se v nanášení vzorku následného. Poslední bod byl osazen vzorkem betulinu pro následné porovnání výsledků chromatografie.

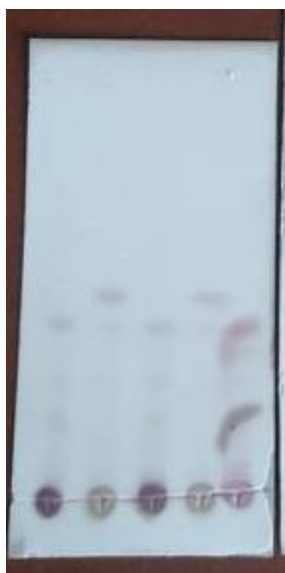
Dalším krokem byla příprava mobilní fáze (vyvíjecí chromatografické soustavy). Pro tyto účely byla zvolena skleněná vanička, do které se následně aplikovala rozpouštědla hexan a ethyl-acetát v poměru 10:3. Tento poměr byl předem testován (obrázek č.18) a uznán jako nejlepší poměr pro optimální vzlínání organického vzorku chromatografickou destičkou. Pro upřesnění byla vyvíjecí nádoba naplněna 1 ml hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu.

Do připravené vyvíjecí soustavy byl posléze pomocí pinzety vložen chromatografický plíšek s nanesenými vzorky. Vyvíjecí nádobu bylo třeba v průběhu vlínání překrýt skleněnou destičkou z důvodu zamezení úniku par rozpouštědel, které se podílely na samotném vzlínání chromatografovaného vzorku.

Finálním krokem byla detekce stopy vzlínání vzorku. Detekce byla provedena velice jednoduchým způsobem, a to vyjmutím plíšku z vyvíjecí soustavy a jeho postříkáním 10% roztokem kyseliny sírové. Po zaschnutí kyseliny byla stopa vzlínání vypálena na vařiči s přepínačem, neboť organické látky při reakci s kyselinou sírovou uhelnatí a tato stopa se následně při vystavení vysoké teplotě zabarví černě.

Obrázek 18: Testování vhodného poměru rozpouštědel mobilní fáze TLC²⁵.

Hexan:ethylacetát = a) 10:3, b) 1:1, c) 3:10, d) 1:0 a e) 0:1, pozice jednotlivých rozpouštědel.



a)



b)



c)



d)



e)

Výtěžnost testovacích vzorků

V případě dokončení chromatografie všech vzorků bylo přistoupeno k oddestilování rozpouštědel v jednotlivých lékovkách za pomoci topné spirály a zatavené kapiláry nahrazující varný kamínek. Jednotlivé vzorky v lékovkách byly položeny na síťku ležící na vařiči s přepínačem a jejich obsah byl oddestilován téměř k suchu. Po téměř kompletním odpaření rozpouštědel byly vzorky přesunuty do laboratorní sušárny (120 °C) pro dosažení konstantní hmotnosti. Zatavená kapilára má výhodu v jejím jednoduchém vyjmutí v případě ukončení odpařování rozpouštědla, přičemž neovlivňuje výsledné vážení jako varný kamínek.

V případě vysušení vzorku do konstantní hmotnosti v chemické sušárně následovalo vážení na laboratorní digitální váze. Nesporná výhoda laboratorní digitální váhy oproti její analogové alternativě je možnost tárování nádob, v nichž se zkoumaný vzorek nachází. Lékovky byly ještě před započnutím experimentu zváženy a následně byly jejich hmotnosti odečteny od hmotností výsledných vzorků.

Tabulka 5: Hmotnosti vzorků v příslušných rozpouštědlech²⁵

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

Tabulka 6: Procentuální výtěžky jednotlivých vzorků v lékovkách²⁵.

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

Na základě porovnání pomocí TLC bylo rozhodnuto, že nejvhodnějšími rozpouštědly pro zpracování velkého množství kůry v Soxhletově extraktoru jsou methanol a dioxan. Po porovnání ceny, dostupnosti v laboratoři a čistotě výsledného produktu došlo k upřednostnění methanolu nad druhým jmenovaným rozpouštědlem (viz obr. č. 18 destička a).

3.2.2. Preparativní TLC vzorků

Po vysušení a zvážení vzorků se přistoupilo k využití preparativní tenkovrstvé chromatografie. Počátkem této metody bylo rozpuštění vysušených vzorků ve 2 ml methanolu. Rozpuštěné vzorky byly následně přemístěny na předem připravené chromatografické desky převrstvené silikagelem.

Obsah balonku byl nanesen na spodní část skleněné desky přibližně 3 cm nad spodním okrajem. Kapalina v balonku vytvořila souvislou čáru začínající a končící přibližně 2 centimetry od okrajů chromatografické desky (viz obr. č. 19).

Obrázek 19: Chromatografická deska s naneseným vzorkem²⁵.



Následným krokem bylo vložení chromatografické desky do vyvíjecí soustavy. Vyvíjecí soustavu v tomto makro měřítku představovalo skleněné akvárium, které bylo naplněno poměrným množstvím 10:3 hexanu a ethylacetátu. Poté došlo k překrytí a zatížení stropu akvária skleněnou deskou (zamezení úniku par rozpouštědel) a následnému pozorování vztlínání mobilní fáze fází stacionární.

3.2.3. Retenční faktor a jeho využití v experimentu

Po vysušení skleněných preparativních desek bylo nutno vyměřit jednotlivé zóny vzorků, které roznesla mobilní fáze po sorbentu. Následně byly změřeny vzdálenosti zón od startu (nanesený vzorek na preparativní desce, viz obr. č. 19).

Retenčním faktorem jsme schopni přepočítat vzdálenosti jednotlivých chromatografovaných zón z malé chromatografické destičky (hliníková destička pokrytá silikagelem) na velkou preparativní skleněnou desku (20x20 cm) pokrytou sorbentem.

Pomocí tohoto postupu bylo zjištěno, ve kterých částech skleněné desky se nachází námi cílené látky. Výlevné zóny vzorků byly následně sejmuty špachtlí a naplněny do skleněných kolon opatřených vatovou špičkou, která zabraňovala vysypání, či vymytí sorbentu se vzorkem.

Vzorec pro výpočet retenčního faktoru

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

V_m představuje vzdálenost chromatografované skvrny od startu

V_r představuje vzdálenost čela preparativní desky od startu

R_f představuje retenční faktor

Obrázek 20: Porovnání malé chromatografické destičky (6 x 3 cm) a velké preparativní skleněné desky (20 x 20 cm).



chromatografická destička

preparativní skleněná deska

Výpočty:

1) Malá chromatografická destička

V_m (a) = 0.5 cm (vzdálenost první skvrny od startu)

V_m (b) = 2 cm (vzdálenost druhé skvrny od startu)

V_r = 4,55 cm (vzdálenost čela od startu)

$$Rf = \frac{V_m}{V_r}$$

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

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

2) Velká skleněná chromatografická deska (20 x 20 cm)

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

$R_f(a) = 0,10989$

$R_f(b) = 0,4395$

$$V_m = R_f \cdot V_r$$

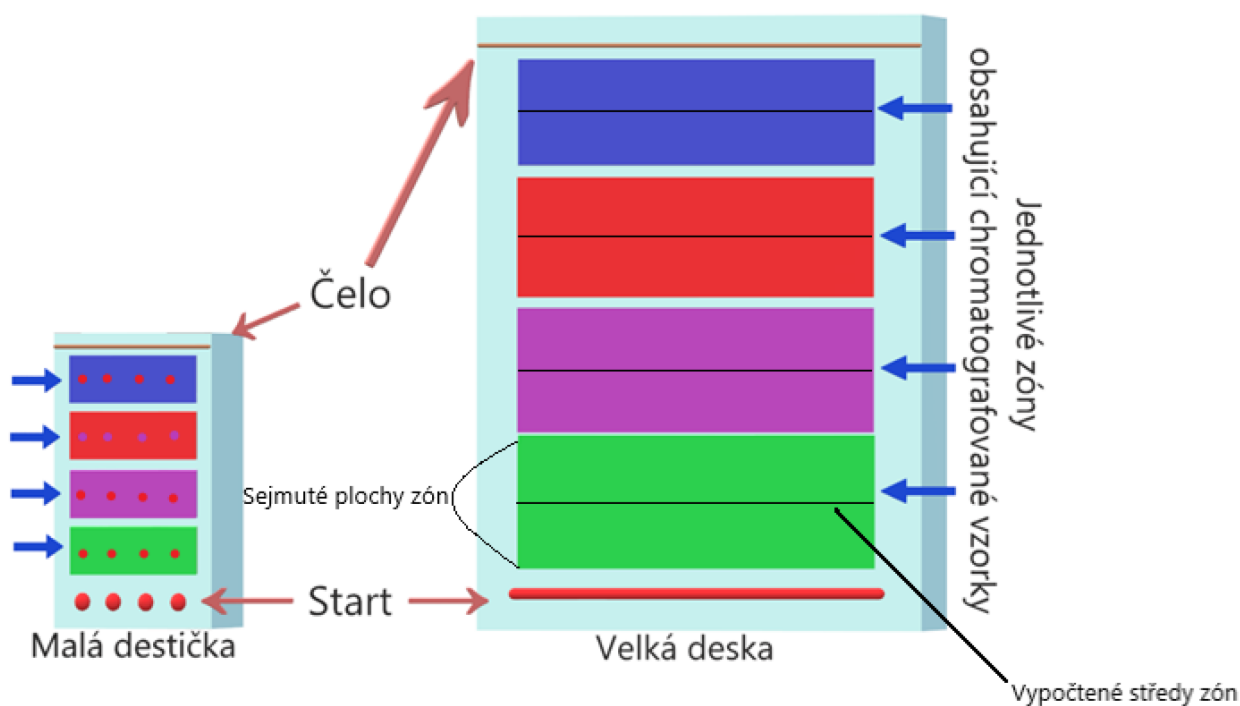
a) $V_m = 0,10984 \cdot 23,5 = 2,6$ cm

b) $V_m = 0,4395 \cdot 23,5 = 10,3$ cm

Pomocí tohoto výpočtu určíme vzdálenost zón vymyté látky od startu.

Obrázek 21: Přepočet R_f a indikace stop ocelovým drátem.

- a) Obrázek znázorňuje malou chromatografickou destičku a velkou preparativní desku s výlevnými zónami po přepočtu R_f .



b) Preparativní deska eluovaná směsí n-hexan a ethyl-acetát (10:3) po vypálení zahřátým ocelovým drátem (průměr 4 mm).



žhavení ocelového drátu



proces vypalování stopy vzorku



výsledná vypálená stopa

3.2.4. Zpracování vzorků získaných preparativní chromatografií

Prvním krokem preparativní chromatografie bylo vyznačení příslušných zón vymytých látek na skleněných preparativních deskách. Tyto zóny byly následně sejmuty za pomoci špachtle do skleněných kolon vždy po jedné zóně do jedné kolony.

Dosud využívaná metoda značení výskytu jednotlivých látek elektricky žhaveným ocelovým drátem (cit²²) byla modifikována využitím nad plynovým kahanem ohřátého ocelového drátu. Jako vyvíjecí nádoba pro skleněnou desku 20x20 cm bylo použito akvárium překryté molitanem vloženým do polyetylenové folie a zatížené skleněnou deskou.

Kolony byly označeny symboly vrch, střed a spodek pro přehlednost práce a následně zality 50 ml elučního činidla (ethanolu). Po několika hodinách eluční činidlo vymoilo ze sejmutých zón jednotlivé frakce obsahující cílené látky. Frakce byly jímány do předem zvážených Erlenmeyerových baněk obsahujících varný kamínek pro zamezení efektu utajeného varu. Tato metoda byla užitá pro zpracování všech vzorků.

Druhým krokem bylo vysušení vymytých vzorků pomocí destilační aparatury. Po destilaci byly vzorky vysušeny v laboratorní sušárně do konstantní hmotnosti při 120 °C.

Následovalo vážení finálních vzorků, které vznikly po vysušení výsledných produktů do konstantní hmotnosti. Výsledné hodnoty představuje tabulka č. 7.

Tabulka 7: Hmotnosti a procentuální výtěžky jednotlivých frakcí²⁵.

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

4 B	51,418 g	51,437 g	0,019 g	1,9 %
4 C	51,535 g	51,599 g	0,064 g	6,4 %
5 A	130,254 g	130,302 g	0,048 g	4,8 %
5 B	125,799 g	upadla	upadla	upadla
5 C	123,202 g	123,291 g	0,088 g	8,8 %

Z hodnot v tabulce č. 7 lze vypočítat, že největšího množství 23 - hydroxy betulinu dosáhneme užitím rozpouštědla č. 1 a 5. Louhování kůry v methanolu a dioxanu poskytlo největší procentuální výtěžnost naší chtěné látky.

Dle obrázku č. 18 destička A bylo vypočítáno, že nejčistší produkt vymývá rozpouštělo methanol. Jedná se tedy o přímý důkaz pro upřednostnění tohoto rozpouštědla před dioxanem.

3.2.5. Výběr optimálního rozpouštědla

Z dostupných experimentálních dat bylo možno vyvodit druh rozpouštědla, které se jeví jako nejvhodnější k extrakci 23 – hydroxy betulinu z březové kůry. Jednoznačně nejvyššího procentuálního výtěžku o nejvyšší čistotě s přihlédnutím k dostupnosti a ekonomické stránce věci bylo dosaženo při použití rozpouštědla methanol, který byl využit k extrakci velkého množství kůry, což je proces popsáný v následujícím odstavci.

3.3. Extrakce 23 - hydroxy betulinu

3.3.1. Extrahování 23 - hydroxy betulinu

Před využitím samotné extrakce s použitím Soxhlethova extraktoru bylo nutno kůru jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*) vyčistit pod tekoucí vodou, vysušit do konstantní hmotnosti a následně nalámat na malé fragmenty, které bylo možno vložit do extrakčních patron Soxhlethova přístroje. Samotná kůra byla předem zvážena, abychom mohli v pozdější fázi práce zhodnotit účinnost popsané metody (viz tabulka č. 8).

Tabulka 8: Celková hmotnost kůry po vysušení a hmotnost sušiny pro jednotlivá plnění patrony extraktoru²⁵.

Celková hmotnost kůry	1. plnění patrony	2. plnění patrony	3. plnění patrony
120,805 g	37,505 g	40,1 g	43,2 g

Samotná extrakce počala naplněním patrony kůrou a jejím následným vložením do Soxhletova extraktoru, který obsahoval ve varné baňce objem methanolu (250 ml extraktor, 500 ml destilační baňka). Methanol byl zahříván pomocí topného hnízda a do varné baňky bylo přidáno několik varných kamínků zabraňujících vzniku efektu utajeného varu. Patrony byly v průběhu extrakce třikrát vyměněny a samotný proces trval přibližně 24 hodin. Cyklickému ději, v průběhu, kterého se rozpouštědlo odpařuje a následně jeho páry kondenzují ve zpětném chladiči se přezdívá reflux.

Druhým krokem bylo oddestilování rozpouštědla a následné vysušení extraktu. Pro tyto účely byla využita destilační aparatura, v níž došlo k oddestilování přebytečného rozpouštědla. Vzniklý produkt byl vysušen do konstantní hmotnosti při 120 °C v laboratorní sušárně.

Produkt byl nazván produktem nezmýdelněným, neboť v průběhu experimentu následně došlo k jeho zmýdelnění za pomoci ethanického roztoku hydroxidu sodného. Poslední část této fáze práce zahrnovala vážení vysušeného vzorku a následný výpočet % výtěžku vztaženého k celkové hmotnosti plněné kůry jeřábu obecného do extraktoru.

Tabulka 9: Výtěžek extrakce v Soxhletově extraktoru²⁵.

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

Dle tabulky č. 9 bylo extrakcí vzorku methanolem získáno 20,6552 g látky, což po vztažení k celkové hmotnosti louhované kůry poskytlo 17,09 % výtěžnost nezmýdelněné látky.

Obrázek 22: *Nezmýdelněný vzorek vzniklý po extrakci kůry jeřábu obecného methanolem²⁵.*



3.3.2. Zmýdelnění vzorku

Nezbytným krokem pro izolaci 23 – hydroxy betulinu o relativní čistotě bylo zmýdelnění vzorku vzniklého extrakcí popsanou v minulém odstavci. Pro tyto účely bylo odebráno 5 g nezmýdelněného vzorku, který byl posléze zpracován pomocí ethanolickeho roztoku hydroxidu sodného.

3.3.3. Výpočet množství ethanolického roztoku NaOH pro zmýdelnění vzorku

V neposlední řadě bylo nutno výsledný nezmýdelněný vzorek saponifikovat (zmýdelnit). Za tímto účelem bylo odebráno 5 g nezmýdelněného vzorku (viz předchozí kapitola), který byl následně vystaven ethanolickému roztoku hydroxidu sodného.

Pro dodržení korektního postupu bylo přistoupeno k výpočtu množství rozpouštědla potřebného k proběhnutí této reakce. Samotné množství rozpouštědla bylo vztaženo k práci Lawrieho¹², kterému se podařilo vyextrahovat 80 gramů vzorku, jenž následně zmýdelnil 1,5 litry methanolického roztoku hydroxidu sodného.

V našem případě využijeme roztoku ethanolického, který by měl poskytnou velice podobné výsledky experimentu.

Výpočet byl proveden pomocí přímé úměry, která nám poskytla objem ethanolického roztoku NaOH potřebného k saponifikaci vzorku.

Výpočet objemu ethanolického roztoku NaOH potřebného ke zmýdelnění vzorku

a)

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

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

Přepočít množství etanolu potřebného k přípravě ethanolického roztoku hydroxidu sodného pro 21 g extraktu pomocí údajů obsažených v práci¹².

b)

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

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

Přepočít množství etanolu k přípravě ethanolického roztoku hydroxidu sodného (m(NaOH) = 5g) pro 5g nezmýdelněného vzorku pomocí údajů obsažených v práci¹².

3.3.4. Proces zmýdelnění vzorku

Prvním krokem byla příprava ethanolickeho roztoku hydroxidu sodného, který byl zhotoven rozpuštěním pěti gramů hydroxidu sodného ve 93,75 mililitrech ethanolu. Důraz byl kladen na dokonalé rozpuštění pevného hydroxidu sodného.

5g nezmýdelněného materiálu bylo ve 250 ml baňce smíseno se 100 ml ethanolickeho roztoku NaOH a po nasazení zpětného chladiče zahříváno k varu po dobu 3 hodin. Poté byla směs zředěna vodou a extrahována vytřepáváním 3 x 50 ml diethyletherem v dělicí nálevce.

Směs byla následně vysušena síranem sodným a znovu oddělena do předem zvážené baňky. Nakonec bylo oddestilováno rozpouštědlo a vzorek byl vysušen do konstantní hmotnosti v laboratorní sušárně²⁵.

Tabulka 10: Výtěžnost zmýdelňovacího procesu²⁵.

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

Obrázek 23: Zmýdelněný vzorek²⁵.



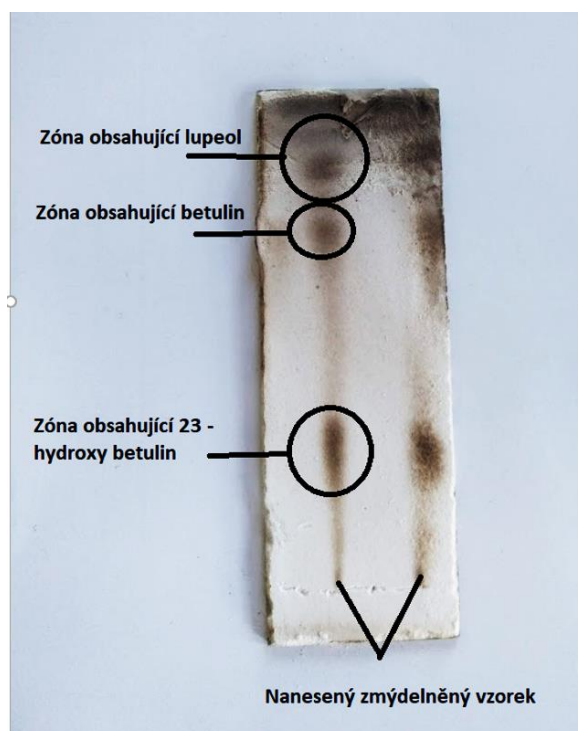
3.3.5. Preparativní tenkovrstvá chromatografie zmýdelněného materiálu

K získání čistého 23 – hydroxy betulinu byla použita preparativní tenkovrstvá chromatografie. Metoda začíná přenesením malého množství saponifikovaného materiálu do lahvičky. 78 mg zmýdelněného materiálu se rozpustí ve 2 ml diethyletheru a nanese se na desku potaženou silikagelem.

Zmýdelněný materiál (78 mg) byl rozpuštěn ve 2 ml diethyletheru a nanesen na skleněnou preparativní desku rovnoměrně převrstvenou sorbentem. Následně byla deska umístěna do akvária obsahující mobilní fázi (hexan:ethylacetát 1:1). Po uzavření víka došlo ke vzlínání eluentu po chromatografické desce směrem vzhůru, přičemž vymyté látky obsadily jednotlivé horizontální oblasti (zóny) na preparativní desce.

Vzdálenosti různých oblastí (hlavně oblastí obsahujících 23 - hydroxy betulin) byly vypočteny pomocí R_f na základě chromatografických destiček potažených silikagelem s nanesenými vzorky (viz kapitola 3.2.3).

Obrázek 24: Chromatografická destička využita k výpočtu R_f^{25} .



Posléze byly horizontální chromatografické zóny obsahující vymyté látky sejmuty za pomoci špachtle do předem připravených kolon ve spod ucpaných pomocí vaty, aby nedocházelo k úniku sejmutého sorbentu. Kolony se vzorky byly následně promyty 50 ml ethanolu, což poskytlo 3 frakce, které byly jímány do předem zvážených Erlenmeyerových baněk.

Z jednotlivých frakcí bylo následně oddestilováno rozpouštědlo, čehož bylo dosaženo pomocí destilační aparatury. Po ukončení destilace byly vzorky dosušeny v laboratorní sušárně do konstantní hmotnosti a posléze chromatografovány metodou TLC.

Metodou TLC byla získána informace o obsahu 23 – hydroxy betulinu v jednotlivých frakcích. Nejvíce 23 – hydroxy betulinu obsahuje frakce č.2 (po přihlédnutí k hmotnostem vzorku). Procentuální výtěžnost jednotlivých frakcí je znázorněna v tabulce č. 11.

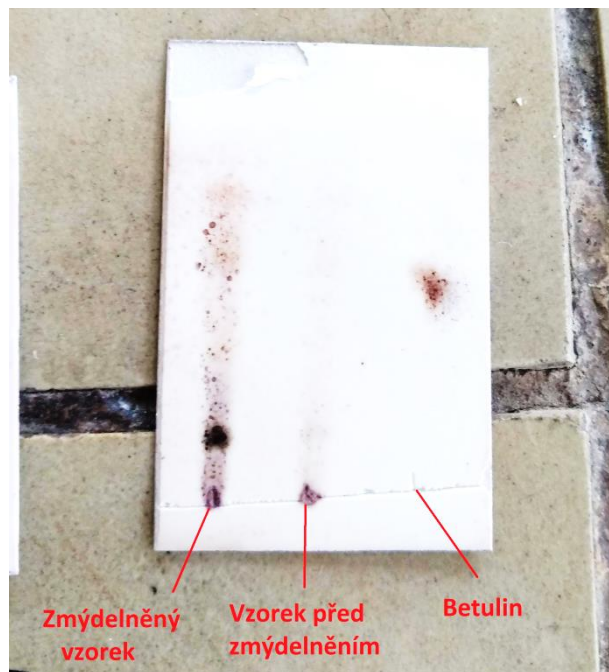
Tabulka 11: Hmotnost frakcí preparativní chromatografie a zisk 23 - hydroxy betulinu vztahený k hmotnosti vstupní kůry jeřábu obecného²⁵.

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

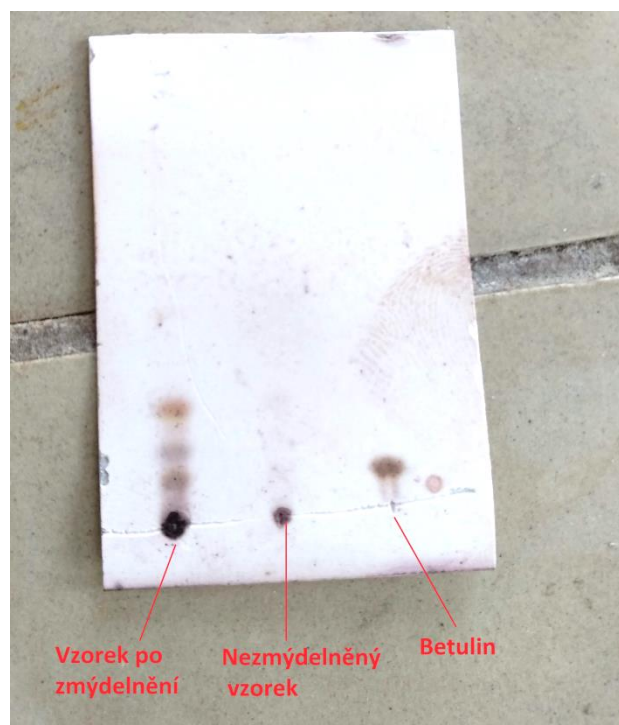
Bylo zjištěno, že ze 78 mg původního zmýdelněného materiálu bylo eluováno 74,7 mg materiálu a procentuální výtěžek činil 95,7 %. Tabulka č. 11 znázorňuje zisk 1,3 g vzorku, který obsahoval téměř čistý 23 - hydroxy betulin. Získaný 23 – hydroxy betulin představuje 1,07 % hmotnosti extrahované kůry²⁵.

3.4. Porovnání TLC meziproductů a zmýdelněného vzorku

Obrázek 25: TLC zmýdelněného, nezmýdelněného vzorku a betulinu v soustavě 1:1 / hexan:ethyl-acetát²⁵

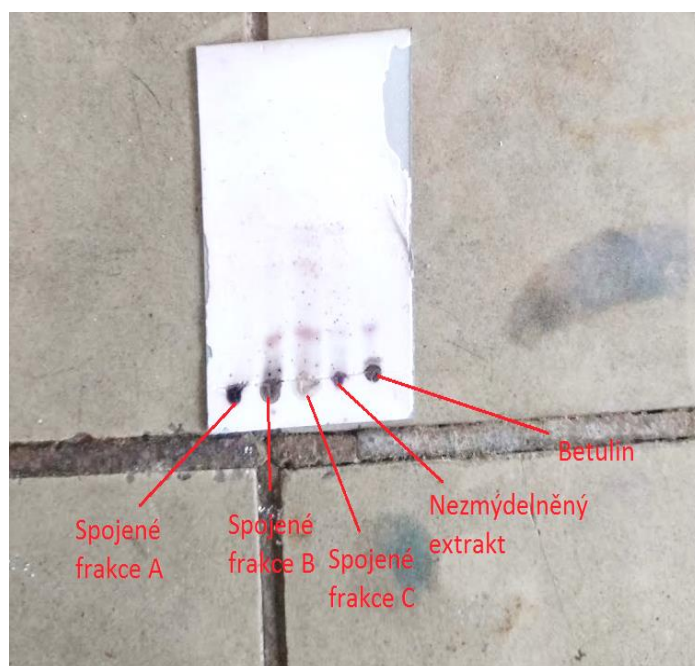


Obrázek 26: TLC zmýdelněného, nezmýdelněného vzorku a betulinu v soustavě 10:3 / hexan:ethyl-acetát²⁵.

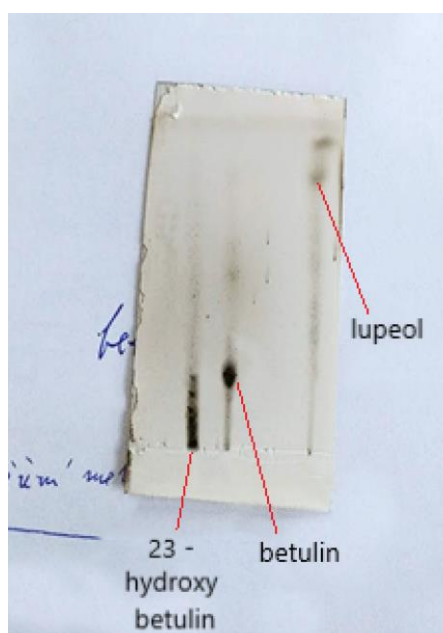


Jak znázorňují obrázky č. 25 a 26, zmýdelněné vzorky vykazovaly více chromatografických stop než vzorky před zmýdelněním. Z obrázku č. 28 je patrné, že zmýdelněný podíl obsahuje polárnější látky než betulin. Systém 1:1 je pro tento typ chromatografické analýzy vhodnější, protože dokáže eluovat látky ve větším a lépe detekovatelném rozsahu.

Obrázek 27: Spojené frakce A, B a C – nezmýdelněný extrakt a betulin²⁵.



Obrázek 28: Chromatografie vzorků a jejich následné porovnání s betulinem.



Největšího podílu vymyté látky dosahují spojené frakce C, jak vyplývá z obrázku č. 27. Na obrázku č. 28 můžeme pozorovat porovnání jednotlivých frakcí zmýdelněné látky a betulinu. Ze získaných informací je patrné, že první stopa obsahuje množství znečištěného 23 – hydroxy betulinu.

3.5. Porovnání dříve provedených izolací s navrhovaným postupem

Na závěr práce je nutno porovnat výtěžnost navrhované metody extrakce a izolace 23 – hydroxy betulinu s ostatními autory, kteří se touto problematikou zabývali. Toto porovnání představuje tabulka č. 12.

Tabulka 12: Porovnání hmotností a procentuální výtěžnosti předkládané metody s jinými autory²⁵.

Autor	Hmotnost vstupní kůry	m nezmýdelněné látky po extrakci v Sox. extraktoru	% výtěžek nezmýdelněné látky	% zmýdelněný vz.	% výtěžek 23 - hydroxy betulinu
Lawrie ¹²	1814 g	80 g	4,41 %		
Richtr ²⁰	180 g	5,3 g	10,8 %		2,9 %
Konopa	120,805 g	20,6552 g	17,09 %	3,5 %	1 %

Tabulka jednoznačně dokazuje menší hmotnostní i procentuální výtěžnost navrhované metody zabývající se extrakcí 23 – hydroxy betulinu. Z průběhu experimentu je možno říci, že není třeba postupné extrakce jeřábové kůry různými rozpouštědly, ale účinná a časově méně náročná je přímá extrakce methanolem s následným zmýdelněním a chromatografickou izolací 23 – hydroxy betulinu. Přímá extrakce vzorku methanolem je tedy jednoznačně prakticky využitelná metoda.

Během této práce došlo k extrakci kůry jeřábu obecného pomocí rozpouštědla methanol. Následně byl vzorek zmýdelněn za pomoci ethanolickeho roztoku hydroxidu sodného, což byl oproti ostatním autorům představeným v práci nově užitý postup. Zmýdelněný vzorek byl nanesen na skleněné preparativní desky, vyvíjen ve vyvíjecí soustavě, vložen do skleněných kolon a poté eluován ethanolem. Vzniklé frakce byly chromatografovány, což prokázalo přítomnost 23 – hydroxy betululinu o relativní čistotě. Výsledek procesu prokázal funkčnost navrhované metody.

V tabulce se nacházejí proškrtnutá místa, která představují nedostatek informací, či jiné užití metody v práci autorů. Práce²⁰ vycházela z práce¹², která nebyla úhrnně hmotnostně vyhodnocena.

4. Závěr

Tato diplomová práce, jež navazuje na bakalářskou práci autora započala výběrem vhodného rozpouštědla pro extrakci 23 – hydroxy betulinu z kůry jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*). Po důkladném chromatografování a analyzování různých extrakčních činidel bylo vybráno na základě analytické metody tenkovrstvé chromatografie rozpouštědlo methanol.

Předložená kvalifikační práce se opírá o práce^{12,20}.

V průběhu předložené práce se podařilo získat 3,5 % materiálu, který na základě chromatografie TLC metodou vykazuje značný obsah 23 – hydroxy betulinu. Kůra byla nejdříve extrahována methanolem v Soxhletově extraktoru a vzniklý vzorek byl následně zmýdlen, což poskytlo již zmíněných 3,5 % látky (vztaženo k původní hmotnosti sušené jeřábové kůry).

Postup extrakce surové kůry methanolem a následné zpracování methanolického extraktu prokazuje vhodnost použití navrženého postupu k získání 23 – hydroxy betulinu semimikrotechnikou.

Pro další práci ve školské praxi by bylo vhodné využívat v makroměřítku připravený hydrolyzát (23 – hydroxy betulin). Základní využití by mohlo spočívat v TLC extraktu a jeho hydrolyzátu.

Práce je z důvodu pedagogického zaměření katedry doplněna o didaktické poznatky pojící se především s laboratorními metodami užitými v průběhu bádání. V textu lze nalézt vzorovou vyučovací hodinu na téma isoprenoidních látek, jež je obsahem chemických seminářů vybraných gymnázií a je ukotveno v jejich kurikulárních dokumentech. Vyučovací jednotka byla doplněna o vhodné didaktické metody, formy výuky a následnou reflexi s vhodnou alterací.

5. Resumé

This diploma thesis, which builds on the author's bachelor thesis, began with the selection of a suitable solvent for the extraction of 23 – hydroxy betulin from the bark of rowan (*Sorbus aucuparia*). After thorough chromatography and analysis of the various extraction agents, the solvent methanol was selected on the basis of the analytical method of thin-film chromatography.

The submitted qualification thesis is based on works^{12,20}.

In the course of the submitted work, 3.5% of the material was obtained, which, based on TLC chromatography, shows a significant content of 23 – hydroxy betulin. The bark was first extracted with methanol in a Soxhlet extractor and the resulting sample was subsequently saponified, which provided the already mentioned 3.5% of the substance (related to the original weight of the dried crane bark).

The procedure of extraction of the raw bark with methanol and subsequent processing of the methanolic extract demonstrates the suitability of using the proposed procedure to obtain 23 – hydroxy betulin by semi-microtechnics.

For further work in school practice, it would be appropriate to use a macro-scale hydrolysate (23 – hydroxy betulin). The basic use could be in TLC extract and its hydrolysate.

Due to the pedagogical focus of the department, the thesis is supplemented by didactic knowledge related mainly to laboratory methods used in the course of research. In the text we can find a sample lesson on the topic of terpenoid (isoprenoid substances), which is the content of chemical seminars of selected grammar schools and is anchored in their curricular documents. The teaching unit was supplemented by appropriate didactic methods, forms of teaching and subsequent reflection with appropriate alteration.

6. Seznam použité literatury

1. Pacák, J.; Stručné základy organické chemie. Praha:SNL, 1975.
2. McMurry, J.; Organická chemie. Brno: VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
3. Chemická skupina Betulinines: [online]. Triterpeny. [2019-05-28]. Dostupné na WWW: <http://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>
4. Liu, J.; Sun, F.; Zhang, H.; Cai, H.; Yao, H.; et al.; Synthesis and Biological Evaluation of Novel Furozan-Based Nitric Oxide-Releasing Derivatives of 23-Hydroxy Betulinic Acid and 3-oxo-23-hydroxybetulinic acid as Potential Anti-Tumor Agents. *Med chem* 5: 028-036, DOI:10.4172/2161-0444.1000239, 2015.
5. Benešová, M.; Pfejferová, E.; Satrapová H.; Odmaturuj! z chemie. 2., přeprac. vyd. Brno: Didaktis, c2014. Odmaturuj! ISBN 9788073582326.
6. Balada, J.; Rámcový vzdělávací program pro gymnázia: RVP G. Praha: Výzkumný ústav pedagogický v Praze, c2007. ISBN 9788087000113.
7. ŠVP Biskupské gymnázium Brno a mateřská škola [online]. Barvičova 85, Brno 602 00, 2020 [cit. 2022-03-31].
8. Richtr, V.; Semimikrotechnika v organické chemii. Plzeň: PF, ZČU; 1993.
9. Sobotníková, J.; Extrakce [online]. 15.7.1996, 5 [cit. 2022-02-20]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
10. Dušek, B.; Kapitoly z didaktiky chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 9788070807361.
11. Klinotová E., Klinot J., Máca B., Trnka T., Všeček V.: Základní cvičení z organické chemie. Univerzita Karlova, Praha 1980.
12. Lawrie, W.; McLean, J.; Taylor, G. R.; *J. Chem. Soc.* 1960, 4303.
13. Složení barviv ve fixech [online]. Portál PŘF UK pro podporu výuky chemie na SŠ a ZŠ [cit. 2022-06-19]. ISSN studiumchemie.cz. Dostupné z: <https://studiumchemie.cz/experiment/slozeni-barviv-ve-fixech/>
14. Herout, V.; Keil, B.; Protiva, M.; Hudlický, M.; Ernest, I.; Gut, J.; Laboratorní technika organické chemie. Praha: Nakladatelství Československé Akademie věd, 1954.

15. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Ionexová chromatografie [online]. c2021 [citováno 27. 03. 2022]. Dostupný z WWW: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Ionexov%C3%A1_chromatografie&oldid=20042951>
16. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Gelová chromatografie [online]. c2021 [citováno 27. 03. 2022]. Dostupný z WWW: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Gelov%C3%A1_chromatografie&oldid=20310600>
17. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Plynová chromatografie [online]. c2021 [citováno 27. 03. 2022]. Dostupný z WWW: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Plynov%C3%A1_chromatografie&oldid=20263869
18. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: HPLC [online]. c2022 [citováno 27. 03. 2022]. Dostupný z WWW: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=HPLC&oldid=21012165>
19. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: [online]. Chromatografie na tenké vrstvě. [cit 28. 05. 2019]. Dostupné na WWW: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Chromatografie_na_tenk%C3%A9_vrstv%C4%9B&oldid=16724749>
20. Richtr, V.; Triterpenoidy substituované v kruhu B. Kandidátská disertační práce, 1987.
21. Mikeš, O. a kol.; Laboratorní chromatografické metody. Praha: SNTL, 1980.
22. Richtr, V.; Kraitr, M.; Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. In Chemie. XX. Plzeň: Západočeská univerzita, 2004. ISBN 80-7043-296-9.
23. Králová, M.; Techmania Science Center: Eduportál: [online]. Kapilární jevy.
24. Wikipedie: Otevřená encyklopedie: [online]. Kapilára. [2019-05-21]. Dostupný na WWW: <<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Kapil%C3%A1ra&oldid=17118208>>
25. Konopa, M.; Optimalizace zpracování triterpenoidních sloučenin kůry jeřábu obecného. Plzeň, 2020. Bakalářská práce. ZČU.

7. Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: MOLEKULA 23-HYDROXY BETULINU.	3
OBRÁZEK 2: MOLEKULA BETULINU.	4
OBRÁZEK 3: UKÁZKA Z UČEBNICE ODMATURUJ Z CHEMIE 1.	5
OBRÁZEK 4: UKÁZKA Z UČEBNICE ODMATURUJ Z CHEMIE 2.	6
OBRÁZEK 5: UKOTVENÍ ISOPRENOIDŮ V RVP.	7
OBRÁZEK 6: UKOTVENÍ ISOPRENOIDŮ V ŠVP BISKUPSKÉHO GYMNÁZIA BRNO.	9
OBRÁZEK 7: SCHÉMA A POPIS SOXHLETOVA EXTRAKTORU.	16
OBRÁZEK 8: DESTILAČNÍ APARATURA.	17
OBRÁZEK 9: CHROMATOGRAFIE BARVY FIXU.	19
OBRÁZEK 10: DESTIČKA S NANESENÝM SORBENTEM A STOPOU ANALYZOVANÉHO VZORKU.	22
OBRÁZEK 11: APARATURA PRO ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE.	23
OBRÁZEK 12: ZNÁZORNĚNÍ KAPILÁRNÍ ELEVACE A KAPILÁRNÍ DEPRESE.	30
OBRÁZEK 13: ROZDÍL MEZI TVAREM KAPILÁRY A BALÓNKU.	31
OBRÁZEK 14: MEZIPRODUKTY ZHOTOVENÍ SKLENĚNÉ KAPILÁRY.	32
OBRÁZEK 15: MEZIPRODUKTY A VÝSLEDNÝ BALONEK.	33
OBRÁZEK 16: CHROMATOGRAFICKÁ DESKA (20X20CM) POKRYTÁ ZASCHLÝM SILIKAGELEM.	34
OBRÁZEK 17: CHROMATOGRAFIE LÁTKY V RŮZNÝCH SOUSTAVÁCH ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL.	36
OBRÁZEK 18: TESTOVÁNÍ VHODNÉHO POMĚRU ROZPOUŠTĚDEL MOBILNÍ FÁZE TLC.	38
OBRÁZEK 19: CHROMATOGRAFICKÁ DESKA S NANESENÝM VZORKEM.	40
OBRÁZEK 20: POROVNÁNÍ MALÉ CHROMATOGRAFICKÉ DESTIČKY A VELKÉ SKLENĚNÉ DESKY.	42
OBRÁZEK 21: PŘEPOČET RF A INDIKACE STOP OCELOVÝM DRÁTEM.	43
OBRÁZEK 22: NEZMÝDELNĚNÝ VZOREK PO EXTRAKCI KŮRY METHANOLEM.	48
OBRÁZEK 23: ZMÝDELNĚNÝ VZOREK.	50
OBRÁZEK 24: CHROMATOGRAFICKÁ DESTIČKA VYUŽITA K VÝPOČTU RF.	51
OBRÁZEK 25: TLC ZMÝDELNĚNÉHO, NEZMÝDELNĚNÉHO VZORKU A BETULINU V SOUS. 1:1.	53
OBRÁZEK 26: TLC ZMÝDELNĚNÉHO, NEZMÝDELNĚNÉHO VZORKU A BETULINU V SOUS. 10:3.	53
OBRÁZEK 27: SPOJENÉ FRAKCE A, B, C – NEZMÝDELNĚNÝ EXTRAKT A BETULIN.	54
OBRÁZEK 28: CHROMATOGRAFIE VZORKŮ A JEJICH NÁSLEDNĚ POROVNÁNÍ S BETULINEM.	54

8. Seznam tabulek

TABULKA 1 : TERPENOIDNÍ SLOUČENINY DLE POČTU ISOPRENOVÝCH JEDNOTEK.	2
TABULKA 2: ČASOVÝ A OBSAHOVÝ HARMONOGRAM VÝUKOVÉ JEDNOTKY.	12
TABULKA 3: ELUOTROPNÍ ŘADA ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL.	27
TABULKA 4: OBSAH JEDNOTLIVÝCH LÉKOVEK.	35
TABULKA 5: HMOTNOSTI VZORKŮ V PŘÍSLUŠNÝCH ROZPOUŠTĚDLECH.	39
TABULKA 6: PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽKY JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ V LÉKOVKÁCH.	39
TABULKA 7: HMOTNOSTI A PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽKY JEDNOTLIVÝCH FRAKČÍ.	45
TABULKA 8: CELKOVÁ HMOTNOST KŮRY PO VYSUŠENÍ.	47
TABULKA 9: VÝTĚŽEK EXTRAKCE V SOXHLETOVĚ EXTRAKTORU.	47
TABULKA 10: VÝTĚŽNOST ZMÝDELŇOVACÍHO PROCESU.	50
TABULKA 11: HMOTNOST FRAKČÍ PREPARATIVNÍ CHROMATOGRAFIE.	52
TABULKA 12: POROVNÁNÍ HMOTNOSTÍ A PROCENTUÁLNÍ VÝTĚŽNOSTI S JINÝMI AUTORY.	55