

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

**BETULIN V BŘEZOVÉ KŮŘE A NA NÍ PARAZITUJÍCÍCH
HOUBÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Matěj Žemlička

Učitelství chemie pro střední školy

Učitelství chemie pro SŠ (maior) - Učitelství matematiky pro SŠ (minor FAV)

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

Plzeň, 2024

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

V Plzni dne

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval panu doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce a jeho cenné rady. Dále bych rád poděkoval všem, kteří mě podporovali a pomáhali s gramatickou korekcí.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	2
ÚVOD	3
1 TEORETICKÁ ČÁST	4
1.1 BETULIN	4
1.1.1 Betulin v březové kůře	5
1.2 REZAVEC ŠIKMÝ (<i>INONOTUS OBLIQUUS</i>)	5
1.2.1 Betulin v rezavci šikmém	6
1.3 TROUDNATEC KOPYTOVITÝ (<i>FOMES FOMENTARIUS</i>)	7
1.4 LABORATORNÍ METODY	8
1.4.1 Extrakce	8
1.4.2 Destilace	9
1.4.3 Tenkovrstvá chromatografie	11
1.4.3.1 Retardační faktor	12
1.4.3.2 Adsorbenty	13
1.4.3.3 Rozpouštědla	13
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
2.1 ČAJ ČAGA	16
2.1.1 Přečištění betulinu jako srovnávacího standardu	19
2.1.1.1 Příprava desky pro preparativní chromatografii	22
2.2 REZAVEC ŠIKMÝ	23
2.2.1 Vodný extrakt rezavce šikmého	23
2.2.2 Ethanolový extrakt rezavce šikmého	24
2.2.3 TLC extraktů rezavce šikmého	25
2.3 TROUDNATEC KOPYTOVITÝ	29
2.3.1 Extrakce obsahových látek troudnatce kopytovitého	30
2.3.2 TLC extraktu troudnatce kopytovitého	30
2.4 ZÁVĚRY JEDNOTLIVÝCH TLC	31
3 DIDAKTICKÁ ČÁST	33
3.1 CHROMATOGRFIE NA ZÁKLADNÍCH ŠKOLÁCH	33
3.2 CHROMATOGRFIE NA STŘEDNÍCH ŠKOLÁCH	34
3.2.1 Výzkum výuky chromatografie na středních školách	38
ZÁVĚR	42
RESUMÉ	44
SEZNAM LITERATURY	46
SEZNAM OBRÁZKŮ	49
SEZNAM TABULEK	50
SEZNAM GRAFŮ	51

SEZNAM ZKRATEK

TLC	tenkovrstvá chromatografie
ZČU	Západočeská univerzita
RVP ZV	rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání
RVP G*	rámcové vzdělávací programy pro gymnázia
RVP SOV	rámcový vzdělávací program středního odborného vzdělávání
ŠVP	školní vzdělávací program
FPE	fakulta pedagogická
SŠ	střední škola

Úvod

Tato diplomová práce se zabývá studiem betulinu, který je obsažen v kůře břízy bělokoré a zároveň na ní parazitující houbě rezavce šikmého. Betulin je farmakologicky a biologicky aktivní látka, která začíná být pro tento průmysl čím dál více zajímavější. Izolace této látky a následné provedení jednoduchých TLC je zařazeno do laboratorního cvičení z organické chemie. Tato triterpenická látka je na katedře FPE ZČU zkoumána dlouhodobě.

Tato práce má na základě prostudované literatury a získaných zkušeností z předchozí bakalářské práce, zavedením základních laboratorních operací, ověřit přítomnost betulinu v parazitujících houbách. Úkolem je pomocí TLC ověřit, zda parazitující houby na březové kůře obsahují jako jednu z mnoha svých obsahových látek betulin a následně se pokusit o jeho izolaci.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 BETULIN

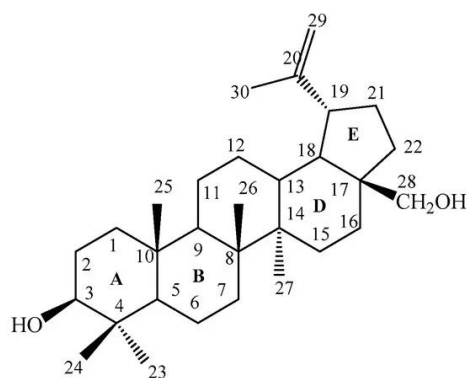
Betulin (lup-20(29)-en-3 β ,28-diol) patří mezi pentacyklické triterpenoidy a lze jej považovat za první biologicky aktivní látku, která byla extrahována z rostlinného zdroje v průmyslovém měřítku. Jedná se o bílý krystalický prášek bez zápachu. Je zcela nerozpustný ve vodě, odolný vůči kyslíku a slunečnímu záření. Betulin se vyznačuje nízkou rozpustností v nepolárních rozpouštědlech. Relativně dobrou rozpustnost má ve vroucích alkoholech, etheru nebo chloroformu¹.

Betulin se nejčastěji vyskytuje ve vnější kůře mnoha druhů bříz například: bříza bělokorá (*Betula pendula*), bříza pýřitá (*Betula pubescens*). Obsah betulinu ve vnější kůře se značně liší v závislosti na druhu břízy, stáří stromu, ročním období či místě růstu. Autoři tohoto článku uvádějí, že se jeho obsah pohybuje v 10 - 40% rozmezím¹.

Nejčastějšími metodami na získání betulinu je extrakce organickými rozpouštědly. Výsledný produkt obsahuje kromě betulinu i lupeol a jiné jejich významné deriváty. Proto je potřeba zavádět další čištění k jeho izolaci².

Ve struktuře betulinu lze nalézt tři aktivní pozice. Sekundární hydroxylová skupina na C-3, primární hydroxylová skupina na C-28 a dvojná vazba C=C na C-20. Je zde možné provádět chemické přeměny za účelem získání různých typů derivátů. Například oxidací hydroxylové skupiny C-28 může být betulin přeměněn na aktivnější derivát kyselinu betulinovou (kyselina 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-ová)¹.

Betulin společně s kyselinou betulinovou mají široké spektrum biologických a farmakologických aktivit, mezi které patří: protizánětlivé, antimalarikální, anti-HIV, antineoplastické, antimykotické a antimikrobiální účinky³.

Obrázek 1: Strukturální vzorec betulinu (převzato z ²⁾)

1.1.1 BETULIN V BŘEZOVÉ KŮŘE

Bříza je velmi známá svými léčivými vlastnostmi. Například olej vyráběný z březové kůry se využíval na léčbu kožních onemocnění jako je například ekzém či lupénka. Nebo k přípravě čajů z březové kůry již za domorodých Američanů, kteří tím léčili infekce trávicího traktu⁴.

Několik výzkumů odhalilo, že podstatnou část kůry a listů tvoří triterpenoidy, kterých existuje velká řada. Jednou z nich je lupeolová řada, která patří mezi farmalogicky významné látky. Součástí této řady je betulin a kyselina betulinová³.

Dehelean a kolektiv⁴ se ve své práci pokusili maximalizovat výtěžek betulinu z kůry břízy bělokoré (*Betula pendula*). Využili všech dostupných informací o extrakci březové kůry a podařilo se jim extrahovat přes 90 % této účinné látky.

Vnější část březové kůry tvoří betulin, který jí poskytuje bílou barvu. Rostliny syntetizují tento triterpen z důvodu ochrany před vnějším okolím a hromadí si jej výhradně na vnější části. Ochrana je především proti bakteriím a plísním, ale i proti hmyzu či houbám².

1.2 REZAVEC ŠIKMÝ (*INONOTUS OBLIQUUS*)

Rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) je parazitická stopkovýtusná houba z čeledi *Hymenochetaceae* (kožovkovité). Nejčastěji napadá dřeviny z listnatých stromů z rodu *Betula* (bříza). V menší míře napadá dřeviny z rodu *Quercus* (dub), *Populus* (topol) nebo *Alnus* (olše). Má šikmé póry, podle kterých pochází i jeho druhové jméno šikmý (*obliquus*).

Persoon v roce 1801 poprvé popsal a identifikoval rezavce šikmého a dal mu název *Boletus obliquus*. Současné pojmenování *Inonotus Obliquus* mu dal v roce 1942 Pilát⁵.

Tento druh houby je popisován prozatím pouze na severní polokouli. Nejčastější výskyt je zejména v Kanadě, na Ukrajině, na Sibiři, v Číně a také v Evropě, a to převážně severní a východní části kontinentu⁵.

Výtažky z rezavce šikmého se nejčastěji používají v čínské a ruské medicíně. Mají příznivé účinky na metabolismus lipidů a srdeční činnost. Zároveň je hojně využíván pro své antibakteriální, protizánětlivé, antioxidační a antitumorální účinky⁵.

Rezavec šikmý obsahuje velké množství sloučenin, které mají již zmíněné léčebné účinky. Patří sem polysacharidy, triterpeny a polyfenoly. Podle Nikitina⁶ bylo z rezavce šikmého izolováno asi 40 triterpenoidních sloučenin lanostanové řady. Mezi významnější patří lanosterol a jeho derivát inotodiol, který má antiproliferační vlastnosti. Dále pentacyklické triterpeny lupanové řady, mezi které patří již zmíněný betulin, lupeol a lupenon. A v neposlední řadě ve stopovém množství steroidní sloučeniny, mezi které například patří ergosterol a cholesterol⁶.

1.2.1 BETULIN V REZAVCI ŠIKMÉM

Podle kanadské studie⁷ je nejideálnějším obdobím pro sběr rezavce šikmého podzim. Tato studie zkoumala 3 vybrané stromy po celý rok a následně provedla sérii několika extrakcí. Extrakce vodou za laboratorních podmínek a za teploty 70 °C. A extrakce ethanolem za laboratorních podmínek a za teploty 50 °C. Tyto teploty byly zvoleny záměrně, aby se předešlo případnému přehřátí během extrakcí, a tím možné degradaci některých obsahových složek. Pro všechny extrakce bylo odváženo 1 g jemně rozemletého rezavce šikmého, který byl smíchán s 10 ml příslušného rozpouštědla a byl míchán po dobu 24 hodin. Vodné extrakty byly lyofilizovány a ethanolové extrakty byly odpařeny proudem vzduchu a poté vysušeny ve vakuu do konstantní hmotnosti. Betulin byl stanovován pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. A byl detekován při m/z 443,5 (cit.⁷).

Pro vodné extrakty byl betulin obsažen pouze v podzimovém sběru a pouze při extrakci za teploty 70 °C. Jeho koncentrace byla pouhých 0,6 ng/ml (cit.⁷).

Pro ethanolové extrakty byl betulin obsažen ve všech sběrech. Nejvíce byl obsažen v zimním sběru a v podzimovém sběru. Největší koncentrace dosahovala 90,49 ng/ml v zimním sběru při extrakci za laboratorních podmínek⁷.

Podle této studie bylo usouzeno využít těchto dvou rozpouštědel pro extrakci zkoumaného materiálu, tedy voda a ethanol. Dále bylo využito poznatku o jemném rozemletí rezavce šikmého.

1.3 TROUDNATEC KOPYTOVITÝ (*FOMES FOMENTARIUS*)

Troudnatec kopytovitý (*Fomes fomentarius*) je dřevokazná houba patřící do čeledi *Polyporaceae* (chorošovitě). Podle svého tvaru připomínajícího kopyto, dostala svůj druhový název kopytovitý. Jedná se o velmi lehkou a dlouholetou houbu, která může dorůst až do šířky 50 cm. Nejčastěji se v Evropě vyskytuje na listnatých dřevinách z rodu *Betula* (bříza) a *Fagus* (buk)⁸.

Podle Bal⁹ má troudnatec kopytovitý značné léčivé vlastnosti. V různých studiích se používají rozdílná rozpouštědla a stanovují se různé farmakologické účinky. Nejčastějšími rozpouštědly jsou voda a ethanol.

U ethanolových extraktů byly zjištěny antimikrobiální, protiplísňové a antioxidační účinky. U vodných extraktů byly zjištěny antioxidační, antimikrobiální, antibakteriální a protizánětlivé účinky⁹.

Závěrem těchto výsledků lze říci, že troudnatec kopytovitý má léčebný potenciál. Studie¹⁰ se mimo jiné zabývala obsahovými látkami. Bylo zjištěno, že dominantní složkou troudnatce kopytovitého jsou polysacharidy následovány proteiny, a v neposlední řadě i lipidy. Nejvíce obsaženou látkou mezi polysacharidy byl β -glukan a mannan.

1.4 LABORATORNÍ METODY

1.4.1 EXTRAKCE

Extrakce využívá dělení látek přechodem do kapalné fáze, které byly původně v pevné fázi nebo v jiné kapalné fázi.¹¹

V této diplomové práci bylo využito pouze extrakce pevné fáze do kapalné. A pouze dvou typů extrakce: macerace a kontinuální extrakce v Soxhletově extraktoru.

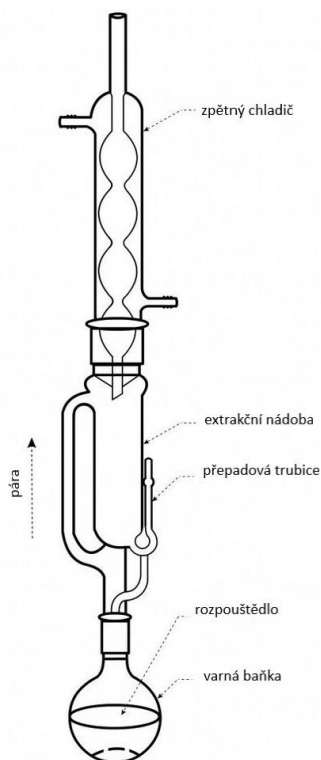
Účinnost extrakce pevné látky kapalinou je dána rozpustností a rychlostí přechodu látky z jedné fáze do druhé. Rozpustnost lze ovlivnit výběrem rozpouštědla. Rozpouštědlo vybíráme tak, aby do roztoku přecházela převážně žádaná sloučenina a ostatní látky zůstávaly v pevné fázi. Rychlost přechodu látky z pevné fáze do kapalné fáze je dána převážně rychlostí, kterou kapalina proniká do pevné fáze a rychlostí odstraňování látky ze styčné plochy. Heterogenní rovnováhy na rozhraní pevné a kapalné fáze lze dosáhnout obtížně. K rovnovážnému stavu lze dopomoci zvětšením povrchu pevné fáze, úpravou vzorku mletím, přiváděním stále čerstvého rozpouštědla na styčnou plochu, které může probíhat pouhým mícháním nebo při kontinuálních extrakcích neustálé čerstvým regenerovaným rozpouštědlem¹¹.

Macerace patří mezi nejjednodušší typy extrakce. Pevná fáze se smíchá s rozpouštědlem a zfiltruje se. Stupeň extrakce se zvýší namletím pevné látky, přebytkem rozpouštědla nebo mícháním. Opakovaná macerace menšími dávkami rozpouštědla poskytuje větší výtěžek než macerace provedená celým množstvím rozpouštědla. Pokud by se tento postup prováděl za zvýšené teploty, nazývá se digesce¹¹.

Kontinuální extraktory byly zkonstruovány z důvodu časté potřeby, aby rozpouštědlo bylo ve styku s materiálem po dobu několika hodin. Pracují periodicky a automaticky s relativně malým množstvím rozpouštědla. Velkým přínosem je, že kontinuální extraktory mohou pracovat bez soustavného dohledu¹¹.

Extraktor podle Soxhleta se skládá z varné baňky, extrakční nádoby a chladiče, které jsou vzájemně spojené zábrusovým spojem, které zajišťují větší bezpečnost. Korkový spoj je méně vhodný z důvodu úniku rozpouštědla. Kaučukový spoj je zcela nepřijatelný z důvodu napadání organickými rozpouštědly a následným znečištěním produktů¹¹.

Materiál k extrakci se umístí do extrakčního prostoru buďto ve speciální papírové patroně, nebo přímo do extrakčního prostoru, kde je potřeba zamezit úniku materiálu do varné baňky. Rozpouštědlo z varné baňky destiluje širokou spojovací trubicí. Ve zpětném chladiči dochází ke zkondenzování par. Rozpouštědlo následně kape na materiál umístěný v extrakčním prostoru. Po naplnění extrakčního prostoru do výše ohybu přepadové trubičky extrakt přeteče zpět do varné baňky a celý pochod se opakuje¹¹.



Obrázek 2: Schéma Soxhletova extraktoru (převzato z ¹²)

1.4.2 DESTILACE

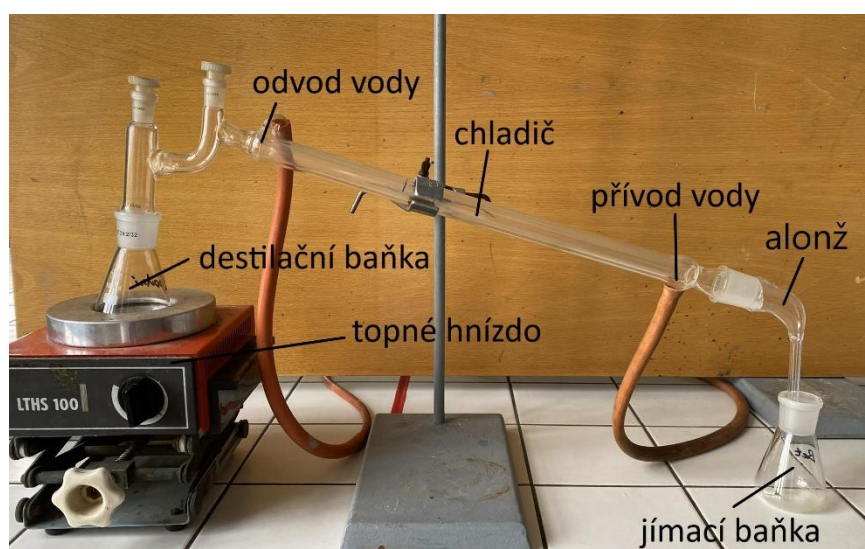
Destilace je dělicí pochod, který se zakládá na rozdílu složení kapaliny a páry, která je z ní vytvořena. Nejčastěji se využívá k čištění kapalných látek neboli k oddělení kapaliny od méně těkavých příměsí. Dále se destilace využívá k dělení směsí kapalných látek o různém bodu varu. Prostou destilací se převede kapalina dodáním tepla v páru, která je kondenzována v oddělené části přístroje. Úplné oddělení nastává jen tehdy, je-li příměs netěkavá nebo je-li rozdíl bodů varu přiměřeně velký (150 °C). Prosté destilace je vhodné využít k oddestilování rozpouštědla od zcela netěkavého zbytku¹¹.

Při destilování čisté látky je bod varu konstantní a nedochází k dělení, neboť složení kapalně i parní fáze je totéž¹¹.

Nejjednodušší zařízení se skládá z destilační baňky, nejčastěji kulovitěho tvaru, chladiče a jímadla. Jako nejvhodnější chladič lze použít Liebigův chladič. Jiné typy chladičů (kuličkový, spirálový aj.) se zpravidla nevyužívají, jelikož zadržují velké množství destilátu. Nejvýhodnější a nejvhodnější je práce s celoskleněnými aparaturami, které jsou opatřeny normalizovanými zábrusy. Díky tomu lze zamezit ztrátám, znečištění a opotřebení kaučukových či korkových materiálů¹¹.

Provedení destilace je jednoduché. Baňka se plní kapalinou maximálně do dvou třetin. K zamezení přehřívání destilované kapaliny se do baňky vkládá varný kamínek, tj. kousek porézního materiálu (např. porcelán). Varné kamínky jsou zdrojem bublinek vzduchu, které podporují klidný a pravidelný var. Bouchání kapaliny při utajeném varu může být velmi nebezpečné. Může docházet ke vzkypění kapaliny, které může u hořlavých látek způsobit požár¹¹.

V této diplomové práci bylo využíváno destilace k zahuštění ethanolových extraktů nebo k předdestilování ethanolu, aby bylo dosaženo co nejvyšší čistoty tohoto rozpouštědla.



Obrázek 3: Schéma destilační aparatury

1.4.3 TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE

Chromatografie patří mezi separační metody, které se používají k analytickým i preparativním účelům. Směs se dělí na základě odlišné migrace složek v systému stacionární (nepohyblivé) fáze a mobilní (pohyblivé) fáze. Mobilní fáze je tvořena kapalinou, potom se jedná o kapalinovou chromatografii, nebo plynem pro plynovou chromatografii. Stacionární fáze je pak tvořena buď pevnou látkou nebo kapalinou, která je zachycena na pevném porézním materiálu¹³.

Tenkovrstvá chromatografie patří mezi planární (plošné) chromatografie. Jako stacionární fáze je využíván jemnozrný sorbent. Nejčastější realizace tenkovrstvé chromatografie je jako adsorbční chromatografie, sorbent je fixovaný vhodným pojivem v tenké vrstvičce na podkladovou desku¹³.

Ke chromatografii lze přistoupit pouze, pokud je stacionární fáze dokonale suchá. Zkoumaná látka se převede na roztok, který se nanáší kapilárou na předem označený start. Terčík vytvořený dotykem kapiláry by měl být co nejmenší. Po odpaření rozpouštědla se deska vkládá do chromatografické komory, ve které nesmí být úroveň mobilní fáze vyšší, než je úroveň startu chromatografické desky. Aby nedocházelo k nežádoucím jevům, musí být komora po dobu vztlínání mobilní fáze uzavřena. Chromatografie se ukončí vyjmutím desky, když čelo mobilní fáze dospěje k několika milimetrům od okraje. Metod pro detekci existuje celá řada. Pro nebarevné organické látky a při použití silikagelu jako stacionární fáze lze využít vypálení na elektrickém vařiči. Postřík desky 10 % kyselinou sírovou tento proces zrychlí a zvýrazní. Kyselina sírová způsobí dehydrataci (zuhelnatění) organických látek¹³.

Uražená vzdálenost skvrn závisí na polaritě samotné látky a polaritě mobilní fáze. Látky, které jsou polárnější se více zadržují polárními skupinami stacionární fáze. Při použití mobilní fáze s vysokou polaritou urazí látka větší vzdálenost a zároveň se více rozmývá. Vzdálenost se vyjadřuje pomocí veličiny R_f (retardační faktor) viz podkapitola 1.4.3.1 (cit.¹³).

Preparativní tenkovrstvá chromatografie se od analytické liší v rozměrech, kdy nejčastější rozměr desky je 20 x 20 cm. Dalším rozdílem je způsob nanesení roztoku vzorku, který se nanáší jako souvislý proužek o šířce cca 3 mm. Nejčastěji se na chromatografickou desku nanáší balónkem nebo injekční stříkačkou. Metod pro detekci je velká řada stejně

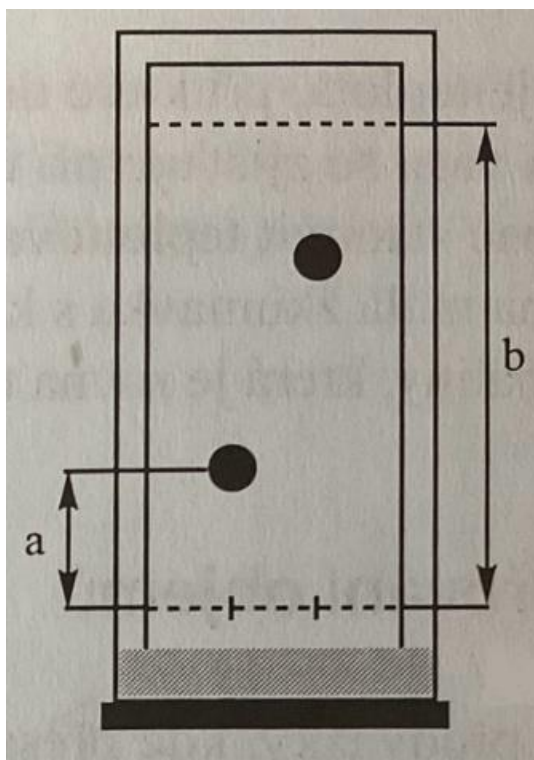
jako u analytického provedení. Pro nebarevné organické látky lze využít elektricky žhaveného odporového drátu. Dotyk se provádí kolmo na nanesený souvislý proužek. Místa, kde se nachází dělené směsi, v důsledku zuhelnatění organické látky, zhnědnou. Tato místa je nutné si označit, jelikož před sejmutím adsorbentu je nutné z desky odstranit zuhelnatěnou část. Pro izolaci jednotlivých dělených látek se využije chromatografických trubic k extrakci, kam se vsype rozmělněný označený pruh adsorbentu¹³.

1.4.3.1 Retardační faktor

Retardační faktor se značí R_F a jedná se o bezrozměrnou veličinu, která nabývá hodnot od 0 do 1, kde látky zůstávající na startu mají hodnotu 0 a látky postupující s čelem rozpouštědla mají hodnotu 1 (cit.¹³).

R_F -hodnota látky je poměrem vzdálenosti, kterou urazí skvrna od startu za určitý časový interval a vzdálenosti, kterou urazí od startu čelo rozpouštědla za stejný časový interval¹¹.

Je dán vztahem $R_F = \frac{\text{vzdálenost středu skvrny od startu}}{\text{vzdálenost čela rozpouštědla od startu}} = \frac{a}{b}$



Obrázek 4: Vyhodnocení chromatogramu R_F (převzato z ¹⁴)

1.4.3.2 Adsorbenty

Adsorbenty jsou látky, které lze využít při chromatografii jako stacionární (nepohyblivé) fáze. Vhodný adsorbent musí splňovat značnou řadu požadavků. Mezi nejdůležitější požadavek patří co největší kapacita neboli musí mít co největší aktivní povrch. Velký aktivní povrch je dán značnou pórovitostí, což například platí pro nejvíce využívaný silikagel, nebo vysokou disperzí neboli nepatrnou velikostí částic. Dalším požadavkem je stejnoměrnost zrnění, které způsobuje lepší průchodnost a zároveň lepší dělení látek. Pokud by adsorbent měl různé velikosti zrn, docházelo by ke zvýšenému odporu, jelikož menší zrna by vyplňovala mezery mezi většími zrny¹¹.

Velmi důležitým požadavkem je inertnost adsorbentu. Nesmí se v použitém rozpouštědle rozpouštět nebo s ním dokonce reagovat. Zároveň nesmí reagovat s kteroukoliv ze zkoumaných složek, či působit na některou ze složek jako katalyzátor¹¹.

Poslední požadavek je na selektivnost adsorbentu, která má způsobit co největší rozdíly v adsorptivitě jednotlivých látek. Pokud by byl materiál příliš aktivní, poutal by pevně veškeré látky a tím se neprojeví rozdíly mezi látkami. A naopak, pokud by byl adsorbent málo aktivní, nedocházelo by k žádnému dělení¹¹.

Adsorbentů je velká řada a lze je rozdělit do dvou skupin podle jejich vlastností: polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní). Polární adsorbenty, jak je z názvu patrné, mají značnou afinitu k vodě a polárním rozpouštědlům. Jsou tvořeny převážnou většinou adsorbentů (například oxidy, hydroxidy aj.). Nepolární adsorbenty mají značnou afinitu k nepolárním rozpouštědlům a patří mezi ně různé druhy aktivního uhlí¹¹.

Při této diplomové práci byl využíván pouze silikagel, který patří mezi polární adsorbenty s vysokou adsorbční schopností a zároveň patří mezi nejběžněji využívaný adsorbent.

1.4.3.3 Rozpouštědla

Rozpouštědla jsou látky, které lze využít při chromatografii jako mobilní (pohyblivé) fáze. Rozpouštědla jsou též zachycována adsorbentem, proto značnou mírou ovlivňují pevnost adsorpce dělených látek. Platí: čím více je rozpouštědlo polární, tím pevněji je

zachycováno v polárním adsorbentu. Pro nepolární látky funguje tato zákonitost opačně. Molekuly adsorbované látky a rozpouštědla mezi sebou soutěží v adsorpci na aktivním povrchu. Čím více je adsorpční látka polárnější než použité rozpouštědlo, tím pevněji je poutána. Proto byla roku 1940 sestavena tzv. eluotropická řada, o jejíž sestavení má největší zásluhu Trappe. Tato řada je sestavena z běžných rozpouštědel podle klesající adsorptivity na polárních adsorbentech viz tabulka č. 1 (cit.¹¹).

Tabulka 1: Eluotropická řada podle Trappeho (převzato z ¹¹)

Rozpouštědlo	Rozpustnost vody v rozpouštědle (g ve 100 g)	Povrchové napětí voda – rozpouštědlo (dyn/cm)	Dielektrická konstanta
Voda	∞	-	81,0
Methanol	∞	-	31,2
Ethanol	∞	-	25,8
Propanol	∞	-	22,2
Aceton	∞	-	21,5
Ethyl-acetát	3,0	6,3	6,1
Ethylether	1,3	9,7	4,4
Chloroform	0,1	27,7	5,2
Methylenchlorid	-	-	-
Benzen	0,06	32,6	2,3
Toluen	0,04	36,0	2,3
Trichlorethylen	0,02	-	-
Tetrachlormethan	0,01	43,4	2,2
Cyklohexan	0,01	-	2,0
N-hexan	0,007	50,4	1,88

Nejvýše postavená rozpouštědla v eluotropické řadě jsou nejvýhodnějšími eluenty. A nejnižší postavená rozpouštědla jsou vhodná pro jemnější chromatografické dělení¹¹.

Jako u adsorbentů platí pro rozpouštědla několik požadavků. Prvním zásadním požadavkem je, aby dělené látky byly v daném rozpouštědle rozpustné. Druhým požadavkem je, aby dělené látky na adsorbentu nebyly poutány příliš málo, ani příliš pevně. V prvním případě by veškeré látky vzlínaly s čelem rozpouštědel. Naopak v druhém případě by veškeré látky zůstaly na startu¹¹.

Pokud je potřeba rozdíly mezi jednotlivými členy eluotropické řady zmenšit, používá se směs dvou rozpouštědel. Přídavky polárnějšího rozpouštědla k méně polárnímu je nutné stupňovat velice pomalu. Směs se rychle blíží k vlastnostem polárnějšího rozpouštědla¹¹.

Je nutné, aby při chromatografii bylo využíváno pouze rozpouštědel v maximální čistotě¹¹.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část bude věnována především vzorku rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*), který byl již využíván v předchozí bakalářské práci¹⁵. Veškeré snahy o nalezení dalšího vzorku, který by se nacházel v jiné lokalitě byly neúspěšné. Lze tedy říci, že rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) je na území Karlovarského kraje, specifitěji v lokalitě okolí Bečova nad Teplou, velmi raritní. Snaha o nalezení dalšího vzorku trvala cca 1,5 roku. Po nastudování odborných článků bylo zjištěno, že nejčastějším výskytem rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*) je východní a severní část Evropy. V článku⁵ je popisován výskyt na území Francie. Podle článku¹⁶ je výskyt této parazitující houby v České republice situován převážně v horských oblastech s chladnějším a vlhčím podnebím.

2.1 ČAJ ČAGA

V návaznosti na předchozí bakalářskou práci bylo usouzeno, že by bylo vhodné prozkoumat zakoupený čaj „Čaga fytočaj“, který je složen z drcené plodnice rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*). Země původu tohoto čaje je Rusko. Uváděný postup přípravy výrobcem: 1,5 – 2 g drcených plodnic zalít cca 200 ml vroucí vody a opatrně vařit po dobu 15 – 20 minut.

Pro extrakci čaje bylo využito poznatku ze článku⁷, že betulín do vody téměř nepřechází. Proto bylo rozhodnuto, že vodný extrakt nebude v tomto případě studován.

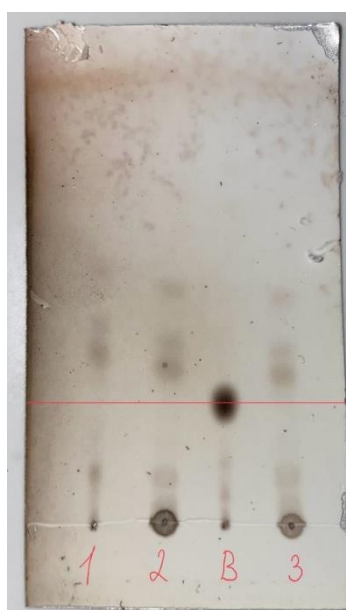
Byly naplněny tři lékovky malým množstvím zmíněného čaje. Do jednotlivých označených lékovek bylo přidáno 10 ml různých rozpouštědel (viz tabulka č. 2).

Tabulka 2: Obsahy jednotlivých lékovek

Číslo vzorku	Hmotnost prázdné lékovky (g)	Hmotnost naplněné lékovky (g)	Navážka čaje Čaga (g)	Rozpouštědlo – 10 ml
1	16,5214	16,5214	0,9998	Chloroform
2	16,2175	17,2177	1,0002	Methanol
3	16,3008	17,3006	0,9998	Ethanol

Čaj umístěný v lékovkách byl louhován v jednotlivých rozpouštědlech 14 dní s občasným protřepáním. Po extrakci bylo přistoupeno k metodě TLC, aby bylo prokázáno, jestli čaj Čaga obsahuje zkoumaný betulin či nikoliv. Při metodě TLC bylo využito poznatků z předcházející bakalářské práce¹⁵, a proto bylo využito hliníkové fólie „Silikagel 60 F254“ s tloušťkou vrstvy 0,2 mm. A jako mobilní fáze pro vyvíjení soustavy obsahující betulin se v předchozí bakalářské práci¹⁵ osvědčila soustava n-hexan:ethyl-acetát (10:3).

Na chromatografické destičce se nenacházela stopa ve stejné úrovni jako stopa betulinu (viz obr. č. 5).



Obrázek 5: TLC extraktů čaje "Čaga fytočaj" n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (zleva chloroform, methanol, betulin, ethanol)

Proto bylo usouzeno, že dále bude zkoumán pouze ethanolický extrakt, který bude porovnán s betulinem a s ethanolovým extraktem z předchozí bakalářské práce¹⁵. Následné TLC bylo prováděno tak, že vzorky byly nanесeny kapilárou na chromatografickou destičku, dále byly vzorky ponechány k samovolnému odpaření po několik minut. Dále byla destička vložena do vyvíjecí soustavy a nechala se vyvíjet do určité výšky. Po vyjmutí destičky z vyvíjecí soustavy byla destička ponechána několik minut k samovolnému odpaření veškeré mobilní fáze. Po odpaření se tento postup zopakoval ještě dvakrát. Tedy výsledná chromatografická destička byla vyvíjena třikrát za sebou a následně byla postříkána 10% kyselinou sírovou a dále byla vložena na topnou spirálu, aby se vypálila stopa vztlínání jednotlivých vzorků.

Nejdříve tento postup byl využit pro vyvíjecí soustavu n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (viz obr. č. 6). Potom pro soustavu n-hexan:ethyl-acetát (10:1) (viz obr. č. 7).



Obrázek 6: TLC ethanolového extraktu čaje n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (Č- čaj, B- betulin, R- rezavec šikmý)



Obrázek 7: TLC ethanolového extraktu čaje n-hexan:ethyl-acetát (10:1) (Č- čaj, B- betulin, R- rezavec šikmý)

Kvůli třem stopám betulinu vzniklo podezření na jeho čistotu. Proto bylo usouzeno, že by bylo vhodné tento používaný betulin jako chemicky čistou látku přezkoumat a zjistit, zda je doopravdy čistý a neobsahuje i jiné látky, které by mohly znehodnotit veškeré zkoumání, zda jednotlivé vzorky obsahují betulin. Této problematice bude věnována podkapitola 2.1.1.

Závěrem lze říci, že prokazatelná stopa, která by byla v úrovni s betulinem, nebyla nalezena. Podle získaných teoretických znalostí by se dalo uvažovat, že betulin je buď vázaný a bylo by nutné tyto extrakty zhydrolizovat. Nebo metoda TLC není dostatečná k prokázání betulinu, který by se podle článku⁷ měl nacházet v řádech nanogramů na jeden mililitr ethanolového extraktu rezavce šikmého.

2.1.1 PŘEČIŠTĚNÍ BETULINU JAKO SROVNÁVACÍHO STANDARDU

Pro přečištění využívaného betulinu jako srovnávacího standardu bylo využito metody preparativní TLC. U vzorku využívaného pro srovnávání a zároveň při laboratorním

cvičení z organické chemie na katedře chemie FPE ZČU se předpokládá, že se jedná o 100% čistý betulin.

Na připravenou suchou chromatografickou desku bylo balónkem rovnoměrně nanášeno 19,9 mg betulinu v 1 ml chloroformu. Takto připravená deska se vložila do „akvária“, ve kterém byla mobilní fáze pro vyvíjení desky. Jako vyvíjecí soustava byla využita soustava n-hexan:ethyl-acetát (10:3). Bylo odměřeno 100 ml n-hexanu a 30 ml ethyl-acetátu. Chromatografická deska byla vyvíjena dohromady třikrát, vždy mezi jednotlivými vyvíjeními byla ponechána k samovolnému odpaření. Po třetím vyvíjení byla deska ponechána k dokonalému vyschnutí zhruba 24 hodin. Následně byla zhruba uprostřed a kolmo na nanášený vzorek vypálena čára rozžhavenou tyčí. Kolem vypálené čáry bylo vybráno malé množství vzorků, které byly nanášeny kapilárou pomocí chloroformu na chromatografickou destičku (viz obr. č. 8 a 9). Destička byla postříkána 10% kyselinou sírovou a následně vypálena na topné spirále. Prokazatelnou stopu poskytly vzorky pouze z míst 3 a 4 (viz obr. č. 9).



Obrázek 8: Preparativní TLC betulinu



Obrázek 9: Sledování obsahu látek v jednotlivých odběrech

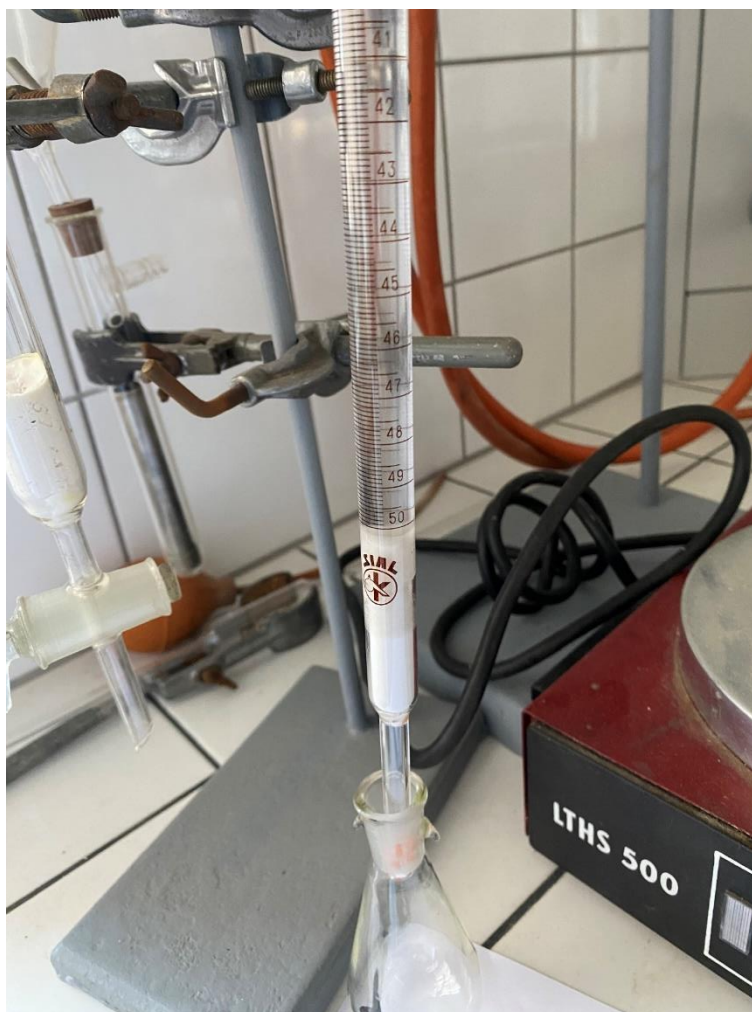
Dále byly zkoumány jen vzorky z místa 3 a 4, jestli se jedná o stejnou látku či nikoliv. Bylo provedeno analytické TLC a podle proložené vodorovné čáry lze říci, že oba dva vzorky se nachází ve stejné výšce, jedná se tedy o stejnou látku (viz obr. č. 10).



Obrázek 10: Porovnání obsahových látek z vybraných odběrů

Vypálený proužek vzniklý žhavenou tyčí byl odebrán a vyhozen, jelikož by znehodnotil vymývání adsorbovaných látek. Následně bylo odebráno široké pásmo, kde vznikla stopa. Tento materiál byl rozmělněn ve třecí misce a následně byl nasypán do chromatografické trubice s předem vloženým smotkem vaty. Mírnými poklepy byl ze sloupce nasypaného materiálu vypuzen vzduch. Do chromatografické trubice bylo dále nalito 40 ml n-hexanu a ethyl-acetátu a bylo ponecháno k vymytí obsahové látky v materiálu do předem zvážené Erlenmayerovy baňky s varným kamínkem (viz obr. č. 11). Extrakt byl následně destilací zahuštěn a byl ponechán v sušárně k dosušení do konstantní

hmotnosti. Následně bylo zváženo 19,1 mg betulinu. Chybějící rozdíl mohl zůstat v balónku či v sytkém materiálu v chromatografické trubici.



Obrázek 11: Vymytí adsorbovaných látek

Takto získaný betulin se bude používat jako srovnávací standard a bude vnímán jako čistý.

2.1.1.1 Příprava desky pro preparativní chromatografii

K přípravě chromatografické desky pro preparativní chromatografii bylo potřeba skleněné desky o rozměrech 20 cm x 20 cm. Je důležité, aby deska byla čistá a především suchá. Následně bylo odváženo 20 g silikagelu 60 G dodávaného společností MERCK, který byl rozpuštěný v cca 45 ml destilované vody. Skleněná deska byla položena na dlaň ruky a byla na ní nalita připravená suspenze. Při nalévání je důležité nalévat směs opatrně po celé

délce a šířce skleněné desky. Poté byla pohybem ruky směs rozlita do míst, která zůstala suchá. Po pokrytí celé desky směsí bylo několikrát poklepáno zespoda desky, aby byl veškerý silikagel se sádrou rozprostřen rovnoměrně po celé desce.

Takto připravená deska na preparativní chromatografii byla ponechána minimálně 24 hodin schnout. Po dobu schnutí se nesmí s deskou manipulovat, aby nanesená směs zůstala nadále rovnoměrně rozprostřená.

2.2 REZAVEC ŠIKMÝ

Po prostudování zahraničních článků, které byly věnovány obsahovým látkám v rezavci šikmém, byla usouzena extrakce ethanolem a vodou.

Pro vodný extrakt bylo využito vysušeného materiálu, který byl používán v předchozí bakalářské práci¹⁵. Jednalo se o vzorek číslo 2, který byl sbírán a určen Mgr. Janem Kořuhou. Sběr proběhl 5.1.2021 v lokalitě Světce u Tachova.

Pro extrakci ethanolem bylo využito nového materiálu ze stejného vzorku číslo 2.

2.2.1 VODNÝ EXTRAKT REZAVCE ŠIKMÉHO

65 g nahrubo drceného materiálu bylo v 500 ml kádince zalito 350 ml destilované vody a za občasného míchání a doplňování vyvařené vody hodinu udržováno ve varu. Kádinka s materiálem byla ponechána k vychladnutí na laboratorní teplotu. Následně byl extrakt přefiltrován do čisté předem zvážené Erlenmayerovy baňky s varným kamínkem, běžnou samovolnou filtrací přes filtrační papír (viz obr. č. 12).



Obrázek 12: Filtrace vodného extraktu rezavce šikmého

Přefiltrovaný extrakt byl dále přiveden k varu, aby byla odpařena většina vody. Odparek byl následně ponechán v sušárně při teplotě 105 °C, aby byl vysušen do konstantní hmotnosti. Baňka byla po vychladnutí zvážena. Celkově po odečtení prázdné baňky s varným kamínkem o hmotnosti 132,458 g od hmotnosti baňky po extrakci, která činí 136,994 g, bylo vypočteno, že vodou bylo extrahováno 4,536 g obsahových látek z rezavce šikmého. Výtěžek této extrakce je 6,98 %.

2.2.2 ETHANOLOVÝ EXTRAKT REZAVCE ŠIKMÉHO

Podle článku ⁷ bylo usouzeno, že by bylo vhodné nový extrakt co nejvíce rozmělnit. Proto byl materiál nejdříve nadrcen na menší kousky a dále byl rozmělněn pomocí ručního kávového mlýnku na jemné mletí, což by mělo odpovídat hrubosti menší než 1 mm.

S takto připraveným materiálem byly naplněny 2 patrony pro následnou extrakci v Soxhletově extraktoru (viz tabulka č. 3). První patrona byla promývána ethanolem po dobu 24 hodin. Po vyschnutí první patrony byla vložena do extraktoru druhá patrona, která byla promývána stejnou náplní z předešlé extrakce po dobu dalších 24 hodin.

Tabulka 3: Navážky patron pro extrakci

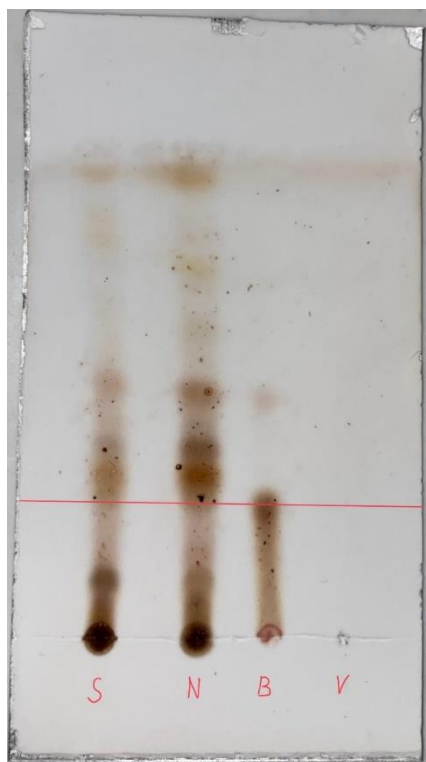
Číslo patrony	Hmotnost patrony s vatou (g)	Hmotnost plné patrony (g)	Navážka rezavce šikmého (g)
1	5,471	18,709	13,238
2	4,695	17,955	13,260

Obsah baňky po extrakci byl destilován a následně dosušen v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Baňka byla po vychladnutí zvážena. Celkově po odečtení prázdné baňky s varným kamínkem o hmotnosti 194,404 g od hmotnosti baňky po extrakci, která činí 195,798 g, bylo ethanolem extrahováno 1,394 g obsahových látek z rezavce šikmého. Výtěžek této extrakce je 5,26 %.

2.2.3 TLC EXTRAKTŮ REZAVCE ŠIKMÉHO

Při metodě TLC bylo využito veškerých poznatků, které byly již popsány v kapitole 2.1. Byla tedy využita vyvíjecí soustava n-hexan:ethyl-acetát (10:3).

Na chromatografickou destičku pomocí chloroformu bylo kapilárou nanášeno zleva: ethanolový extrakt z předcházející bakalářské práce¹⁵; nově vyhotovený ethanolový extrakt; betulin; vodný extrakt (viz obr. č. 13). Poté byla destička vložena do vyvíjecí soustavy.



Obrázek 13: TLC extraktů rezavce šikmého n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (S- v bakalářské práci¹⁵, N- nově vyhotovený, B- betulin, V- vodný)

Podle obrázku neposkytl vodní extrakt žádnou detekovatelnou stopu, proto byl nadále vynechán a nebude se s ním dále pokračovat. Ethanolový extrakt poskytl slabou stopu, která se nachází ve stejné úrovni jako stopa poskytnutá betulinem. Respektive koncentrace této látky, která se nachází ve stejné úrovni jako betulin, je slabší než koncentrace látky těsně nad ní.

Nelze se 100% jistotou říci, jestli by se u detekované stopy mohlo jednat přímo o betulin. Proto bylo dále přistoupeno k preparativní chromatografii ethanolového extraktu. Nejdříve bylo zapotřebí vyhotovit novou preparativní desku viz podkapitola 2.1.1.1.

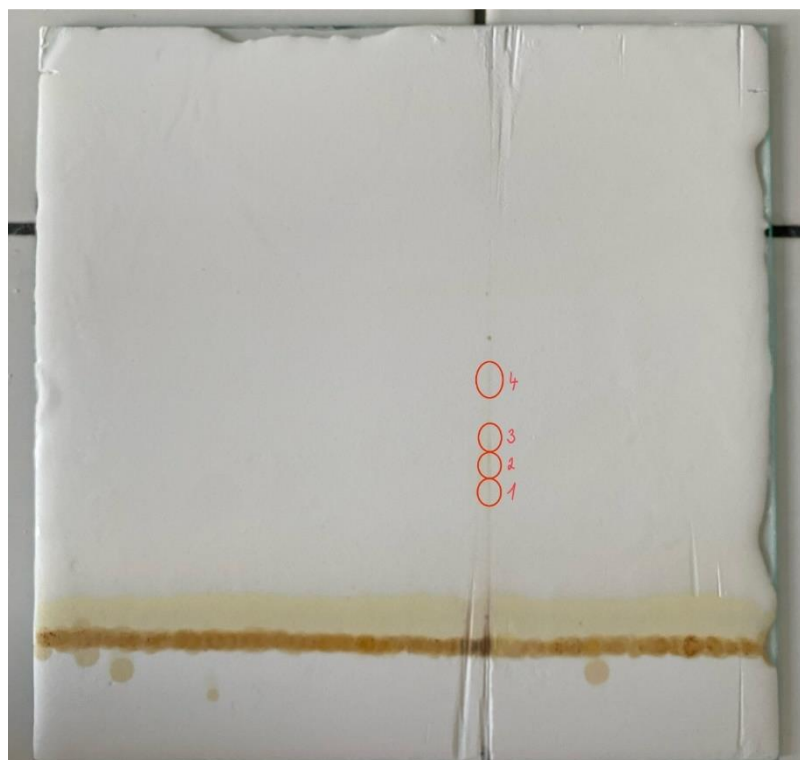
Na preparativní chromatografii bylo do lékovky odváženo 70 mg ethanolového extraktu. Dále bylo přidáno 2 ml chloroformu. Lékovka byla po dobu 5 minut protřepávána, aby se rozpustilo co největší množství extraktu.

Na suchou preparativní desku bylo balónkem rovnoměrně nanášeno veškeré množství z lékovky. Deska byla dále vložena do „akvária“, ve kterém byla mobilní fáze pro vyvíjení desky. Jako vyvíjecí soustava byla využita soustava n-hexan:ethyl-acetát (10:3). Bylo odměřeno 50 ml n-hexanu a 15 ml ethyl-acetátu. Chromatografická deska byla

ponechána k vyvíjení. Po ukončení chromatografie byla deska vyjmuta a ponechána k samovolnému odpaření. Po vyschnutí desky byla zhruba uprostřed a kolmo na nanesený vzorek vypálena čára žhaveným drátem.

Byly detekovány 2 větší stopy, proto bylo využito výpočtu retardačního koeficientu z předchozí TLC. Pomocí výpočtu byla velká spodní stopa rozdělena na 3 části (viz obr. č. 14).

Příklad výpočtu R_F pro skvrnu poskytnutou betulinem na obr. č. 14. Pomocí pravítka byla změřena vzdálenost středu skvrny od startu, která měřila 1,2 cm. Dále byla změřena vzdálenost čela rozpouštědla od startu, která měřila 4 cm. Po dosazení do vzorce byla vypočtena hodnota $R_F = 0,3$. Následně byla vypočtena přibližná vzdálenost pro preparativní desku. Změřená vzdálenost čela rozpouštědla od startu činila 15 cm. Pomocí vzorce bylo dopočteno, že by se vodorovný pás betulinu měl nacházet ve vzdálenosti 4,5 cm od startu.



Obrázek 14: Preparativní TLC ethanolového extraktu rezavce šikmého

Vypálený proužek vzniklý žhaveným drátem byl odebrán a vyhozen, jelikož by znehodnotil vymývání adsorbovaných látek. Následně byla odebrána 4 pásma, kde vznikly stopy. Nejdůležitějším pásem pro následné zkoumání byl pás č. 1, ve kterém by se podle retardačního faktoru měl nacházet betulin. Každý pás byl rozmělněn a následně byl

nasypán do označených chromatografických trubic s předem vloženým smotkem vaty. Mírnými poklepy byl ze sloupce nasypaného materiálu vypuzen vzduch. Chromatografické trubice byly naplněny predestilovaným ethanolem. Ethanol vymýval obsahové látky v materiálu do předem zvážených Erlenmayerových baněk s varným kamínkem (viz tabulka č. 4). Následně po vymytí byly jednotlivé extrakty zahuštěny destilací a dále byly ponechány k dosušení v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení byly baňky zváženy a bylo vypočteno, kolik miligramů bylo extrahováno (viz tabulka č. 4).

Tabulka 4: Izolace obsahových látek

Číslo baňky	Hmotnost baňky s varným kamínkem (g)	Přidané množství ethanolu (ml)	Hmotnost baňky s varným kamínkem po vysušení (g)	Hmotnost obsahových látek (mg)
1	71,577	47	71,580	3
2	77,226	23	77,229	3
3	75,051	26	75,052	1
4	74,792	30	74,793	1

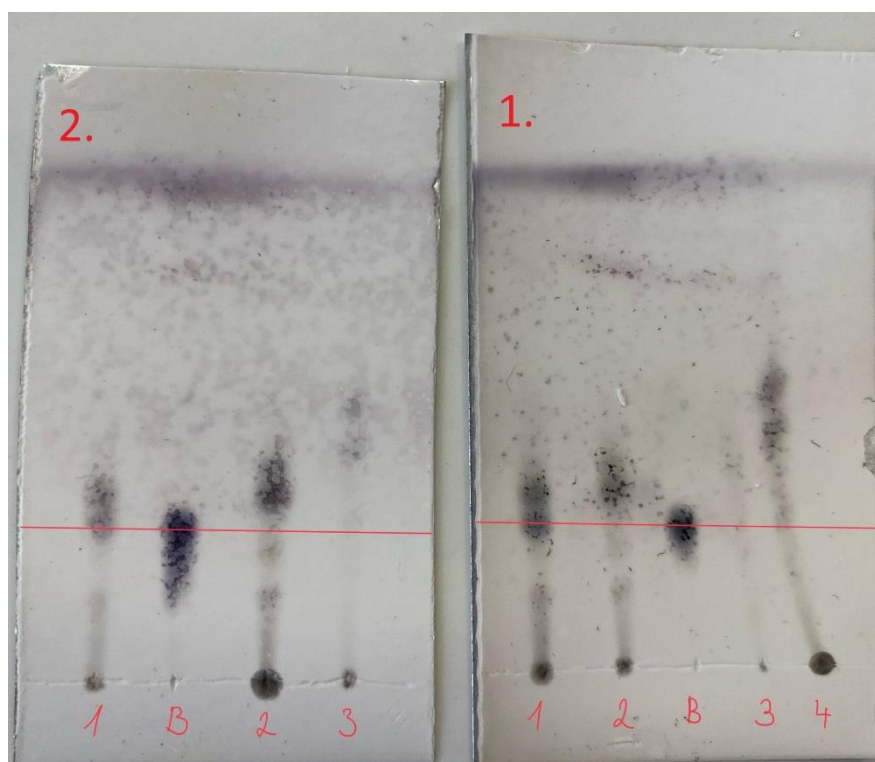
Ze 70 mg ethanolového extraktu bylo pomocí preparativní TLC izolováno 8 mg obsahových látek. Většina extraktu se pomocí chloroformu nerozpustila.

Po preparativní chromatografii bylo přistoupeno ke kontrolnímu TLC. Předmětem zkoumání bylo, zda látka, vypočtena podle retardačního faktoru, je betulín. Veškeré očíslované vzorky byly nanášeny pomocí chloroformu a pro veškeré TLC byla využita soustava n-hexan:ethyl-acetát (10:3).

V první kontrolní TLC byly naneseny vzorky v pořadí viz obr. č. 15. Pravá strana je značně zdeformována nejspíše okrajovým jevem, který mohl být způsoben poničením TLC destičky na pravé straně. Avšak na levé straně destičky, kde byly naneseny vzorky z 1. a 2. baňky, je výsledný chromatogram nezdeformovaný. Lze si zde povšimnout, že stopa vzniklá

u vzorku z 1. baňky je prokazatelně ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta čistým betulinem.

Jelikož první kontrolní TLC bylo zprava zdeformované, bylo provedeno 2. TLC, na které byly nanесeny vzorky v pořadí viz obr. č. 15. Byl záměrně vynechán vzorek č. 4, který poskytoval stopy příliš daleko od startu a nemohl obsahovat stopu shodnou se stopou betulinu. 2. kontrolní TLC je již bez deformací a lze si zde povšimnout stopy u vzorku z baňky č. 1, která je ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta betulinem.



Obrázek 15: Kontrolní TLC n-hexan:ethyl-acetát (10:3) rezavce šikmého

2.3 TROUDNATEC KOPYTOVITÝ

Nejčastěji nacházenou parazitující houbou na stromech břízy bělokoré byl troudnatec kopytovitý. Sběr proběhl 28. 11. 2023 v lokalitě Bečov nad Teplou. Tento materiál byl sbírán Bc. Matějem Žemličkou a určen byl Mgr. Jiřím Koutem, Ph.D.

2.3.1 EXTRAKCE OBSAHOVÝCH LÁTEK TROUDNATCE KOPYTOVITÉHO

Materiál troudnatce kopytovitého byl nejprve nadrcen na menší kousky v rozměrech cca 2–3 mm. S takto připraveným materiálem byla naplněna patrona, která byla uzavřena vatou. Celková navážka materiálu činila 11,025 g. Pro extrahování obsahových látek troudnatce kopytovitého bylo přistoupeno k extrakci v Soxhletově extraktoru. Jako rozpouštědlo k vymývání obsahových látek byl zvolen ethanol. Z předešlých zkušeností a již zmiňovaných odborných článků je ethanol nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrahování betulinu ze všech přírodnin, které ho obsahují. Patrona byla promývána ethanolem po dobu 24 hodin.

Obsah baňky po extrakci byl následně zahuštěn pomocí destilace a dosušen v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Baňka byla po vychladnutí zvážena. Celkově po odečtení prázdné baňky s varným kamínkem o hmotnosti 171,984 g od hmotnosti baňky po extrakci, která činila 173,477 g, bylo ethanolem extrahováno 1,493 g obsahových látek z troudnatce kopytovitého. Výtěžek této extrakce je 13,54 %.

2.3.2 TLC EXTRAKTU TROUDNATCE KOPYTOVITÉHO

Pro metodu TLC bylo využito veškerých poznatků, které byly již popsány v kapitole 2.1. Jako mobilní fáze byla použita směs n-hexan:ethyl-acetát (10:3).

Na připravenou chromatografickou destičku bylo kapilárou nanášeno zleva: ethanolový extrakt troudnatce kopytovitého; betulin; ethanolový extrakt rezavce šikmého. Veškeré vzorky byly nanášeny pomocí chloroformu. Následně byla destička vložena do vyvíjecí aparatury s mobilní fází. Po vystoupení mobilní fáze několik milimetrů od horního okraje, byla chromatografická destička vyjmuta z vyvíjecí nádoby. Následně byla postříkána 10% kyselinou sírovou a vypálena na elektrickém vařiči.

Podle obrázku č. 16 lze jednoznačně říci, že poskytnutá stopa u vzorku troudnatce kopytovitého není ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta čistým betulinem. Zároveň deformovaná pravá strana vlivem okrajového jevu nemá žádný vliv na celkový závěr, jelikož vzorek ethanolového extraktu rezavce šikmého byl volen pouze za účelem možného srovnání, které není nikterak zásadní.



Obrázek 16: TLC troudnatce kopytovitého n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (T- troudnatec kopytovitý, B- betulin, R- rezavec šikmý)

Výsledek TLC vyšel podle očekávání, jelikož nebylo nalezeno informace, že by troudnatec kopytovitý měl obsahovat betulin jako jednu ze svých obsahových látek. Podle obrázku č. 16 lze s jistotou potvrdit, že bylo ethanolem extrahováno několik látek, kde žádná z nich není betulin.

2.4 ZÁVĚRY JEDNOTLIVÝCH TLC

Pro čaj „Čaga fytočaj“ nebylo pomocí TLC prokázáno, že by se nějaká stopa obsahových látek nacházela ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta čistým betulinem. Zároveň výrobce neudává, ve kterém ročním období proběhl sběr rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*). Podle článku⁷ bylo zjištěno, že roční období sběru má veliký vliv na obsah betulinu v rezavci šikmém. Pro přesnější určení, zda tento čaj obsahuje betulin či nikoliv, by bylo vhodné provést extrakci v Soxhletově extraktoru s větším množstvím materiálu a následně provést TLC ještě jednou. Výrobce na obalu neudává jakékoliv informace o obsahových látkách.

Pro rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*) bylo pomocí TLC prokázáno, že stopa jedné z obsahových látek se nachází ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta čistým betulinem.

Proto bylo přistoupeno k preparativní TCL, aby se odizolovala pouze část, kde se tato obsahová látka vyskytuje. Po následném přezkoumání pomocí analytického provedení TLC se ověřilo, že rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) obsahuje stopu, která je ve stejné úrovni jako betulin. Se značnou pravděpodobností lze říci, že tato houba obsahuje betulin jako jednu z mnoha svých biologicky a farmakologicky aktivních látek. Tato metoda ověření je pro vědecké výzkumy slabá, bylo by nutné zavést například kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kterou bohužel katedra chemie FPE ZČU nedisponuje. Poskytované stopy v úrovni čistého betulinu byly u všech TLC oproti jiným stopám obsahových látek velice slabé, lze tedy usuzovat, že je betulin v rezavci šikmém obsažen ve velmi malém množství.

Pro ethanolový extrakt troudnatce kopytovitého (*Fomes fomentarius*) nebyl pomocí TLC prokázán obsah betulinu jako jedné z jeho obsahových látek. Nebyla nalezena stopa ve stejné úrovni jako stopa poskytnuta čistým betulinem. Na rozdíl od předchozích TLC byl tento neúspěch očekávaný, jelikož neexistuje žádná zmínka o tom, že by tato houba obsahovala betulin jako jednu ze svých biologicky aktivních látek.

3 DIDAKTICKÁ ČÁST

Didaktická část bude věnována především k zavedení jednoduchých chromatografií pro laboratorní cvičení z chemie na základních a středních školách. Závěr této části bude věnován k vyhodnocení dotazníků o výuce chromatografie probíhající na středních školách.

3.1 CHROMATOGRAFIE NA ZÁKLADNÍCH ŠKOLÁCH

Podle RVP ZV patří oddělování složek směsí mezi očekávané výstupy žáků na základních školách. Rozpis učiva v RVP ZV avšak přímo nezmiňuje chromatografii. Je zde zmíněno pouze usazování, filtrace, destilace, krystalizace, sublimace. V doporučené minimální úrovni výstupů pro žáka se speciálními vzdělávacími potřebami je toto téma o oddělování složek vynecháno¹⁷.

Z pohledu dvou učebnic využívaných na základních školách si lze povšimnout, že chromatografie patří do výuky chemie v 8. ročníku základní školy.

Podle učebnice Nová škola je chromatografie metoda k oddělování složek směsí založená na rozdílné schopnosti se vázat ke dvěma látkám, se kterými jsou ve styku. Jedna látka je pevná a druhá rozpouštědlo. Zároveň tato učebnice uvádí demonstrační „oddělování potravinářských barviv ze směsi chromatografií na křídě“, který je doprovázen několika obrázky¹⁸.

V učebnici Základy praktické chemie 1 pro 8. ročník je pro chromatografii vyčleněn pouze demonstrační pokus „oddělení složek směsi potravinářských barviv papírovou chromatografií“. Bohužel tato učebnice neuvádí žádnou definici, ale pouze vysvětlení pokusu¹⁹.

Návrh chemického experimentu k demonstraci chromatografie (inspirováno z²⁰):

Základem chemického experimentu k demonstraci chromatografie je křída, která je zde využita jako stacionární fáze a ethanol sloužící jako mobilní fáze. Pro tento pokus je potřeba pouze jakákoliv průhledná nádoba, například kádinka. Na křídu se nanese proužek barevné či černé fixy cca 1 cm od kraje. Následně se do nádoby naleje malé množství ethanolu, zhruba 0,5 cm od dna nádoby. Křída se postaví do nádoby a ponechá se vyvíjet

do určité výšky. Pokud byla barva fixy tvořena různými barvami, jednotlivé barvy se oddělí. Ze zkušenosti je vhodné použít černou, hnědou nebo zelenou barvu. Tento experiment je vhodný pro děti základních škol, avšak je třeba dbát zvýšené opatrnosti, jelikož ethanol je hořlavina a zároveň je potřeba dohlédnout, aby jej žáci nechtěli pít.



Obrázek 17: Chromatografie černého fixu na křídě (ethanol)

Chromatografie by na základních školách neměla být opomíjena. Lze využít jednoduchého demonstračního pokusu k motivaci žáků. A zároveň lze tento pokus zavést do výuky, aby si žáci sami vyzkoušeli, jak funguje chromatografie. Z těchto dvou běžně dostupných učebnic je patrné, že popis chromatografie jako jednu z metod oddělování složek ze směsi je velmi základní. Avšak pro pochopení této problematiky lze říci, že je dostačující.

3.2 CHROMATOGRRAFIE NA STŘEDNÍCH ŠKOLÁCH

V RVP G* oddělování složek směsi v očekávaných výstupech není uvedeno. Ve vymezeném učivu soustavy látek a jejich složení by se na teoretické bázi dalo uvažovat, že lze zavést ke složení i oddělování složek ze směsí²¹.

Po prostudování ŠVP dvou různých gymnázií bylo zjištěno, že se téma chromatografie, respektive oddělování složek směsi, vyskytuje pouze u jednoho.

První české gymnázium v Karlových Varech tento očekávaný výstup ve svém ŠVP neuvádí. Jedná se o všeobecné gymnázium, kde je časová dotace povinné výuky chemie 7 klasických vyučovacích hodin, 2 hodiny laboratorní výuky a 1 půlená hodina pro procvičování ve čtyřech ročnících²².

Naopak Gymnázium, Plzeň, Mikulášské náměstí 23 tento očekávaný výstup ve svém ŠVP uvádí jak pro všeobecné zaměření, tak i pro obor matematika a přírodní vědy. Avšak chromatografie není uvedena v očekávaném výstup jako forma oddělování složek směsi. Časová dotace výuky chemie je pro všeobecné zaměření 6 klasických vyučovacích hodin a 2 hodiny laboratorní výuky ve třech ročnících a pro obor matematika a přírodní vědy 8 klasických vyučovacích hodin a 2 hodiny laboratorního cvičení ve čtyřech ročnících^{23, 24}.

Z pohledu učebnic využívaných na gymnáziích si lze povšimnout, že chromatografie patří do výuky prvního ročníku gymnázia. Podle učebnice Odmaturuj! z chemie je chromatografie metoda k oddělování složek směsi na rozdíl jejich vlastností vzhledem ke dvěma nemísitelným fázím. K oddělování složek dochází při pohybu mobilní fáze (rozpouštědlo) podél stacionární fáze (pórovitý materiál)²⁵.

Podle učebnice Přehled středoškolské chemie je chromatografie metoda selektivního dělení složek směsi, která je založena na odlišných vlastnostech (rozpuštnost, adsorpce, chemické afinitě aj.) jednotlivých složek ke dvěma nemísitelným fázím, se kterými je směs ve styku. Nepohyblivá fáze – stacionární (pórovitý nebo práškovitý adsorpční materiál, ionexy, gely, kapalina zakotvená na pórovitém nosiči). Pohyblivá fáze – mobilní (rozpouštědlo, nosný plyn). Tato učebnice navíc rozděluje chromatografii podle dělicího principu na rozdělovací, adsorpční, afinitní – ionexová, gelová. A dále z hlediska provedení na sloupcovou, kapilární, papírovou, tenkovrstvou, plynovou, kapalinovou²⁶.

V RVP SOV pro obory H a M, speciálně myšleno veškerá lycea a chemické obory, je oddělování složek směsí uvedeno v očekávaných výstupech. Nejsou zde blíže specifikované metody^{27, 28}.

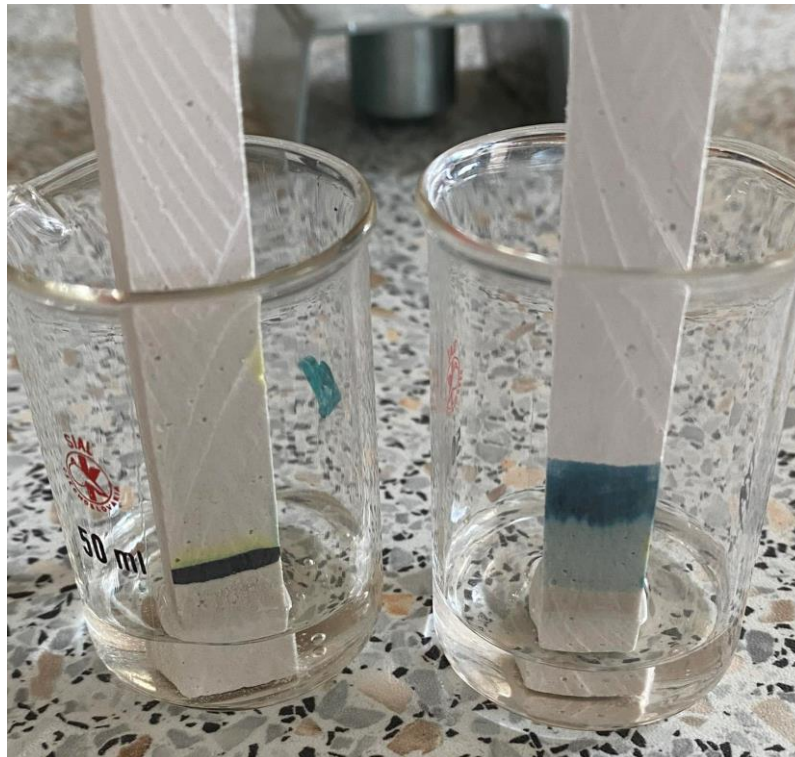
Z pohledu učebnice Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření si lze povšimnout, že je zahrnuto do výuky téma oddělování složek směsi. Avšak chromatografie zde není uvedena²⁹.

Návrh laboratorního cvičení:

1. Úkol: Složení barvy fixu (inspirováno z²⁰)

Tento chemický pokus je úplně stejný jako pokus popisovaný v kapitole 3.1. Rozdíl je v použitých rozpouštědlech pro mobilní fázi. V 1. případě se provede chromatografie fixů za pomoci ethanolu a v druhém případě za pomoci vody. Ideálně za použití jak lihových fixů, tak i standartních fixů. Žák má za úkol pomocí dostupných informačních zdrojů vysvětlit, proč se barva lihového fixu neunáší vodou. Lihové fixy jsou tvořeny inkoustem na bázi ethanolu. Ethanol je proti vodě méně polární, proto je více zadržován u startu a barva tedy není unášena čelem rozpouštědla.

Je třeba dbát zvýšené opatrnosti, jelikož ethanol je hořlavina a žáci by jej mohli chtít ochutnávat.



Obrázek 18: Chromatografie černého fixu na křídě (vlevo - voda; vpravo - ethanol)

2. Úkol: Složení potravinářského barviva (inspirováno z ³⁰)

Základem tohoto experimentu je chromatografický papír vyráběný z celulózy. A jako mobilní fáze je zde využito 5% roztoku NaCl. Postup je velmi jednoduchý. Na chromatografický papír asi 1 cm od okraje se pomocí kapátka nanese vodorovná čára potravinářského barviva. Průměr skvrn by neměl být větší než cca 3 mm. Je velice důležité, aby veškeré skvrny uschnuly před vložením do vyvíjecí aparatury. Vyvíjecí aparatura je složena z větší kádinky a hodinového sklíčka, kterým se tato kádinka uzavře. Po vyschnutí skvrn se chromatografický papír vloží do předem připravené vyvíjecí aparatury s roztokem NaCl, hladina roztoku nesmí být vyšší než čára barviva. Velmi účinné je využití zeleného a fialového barviva.



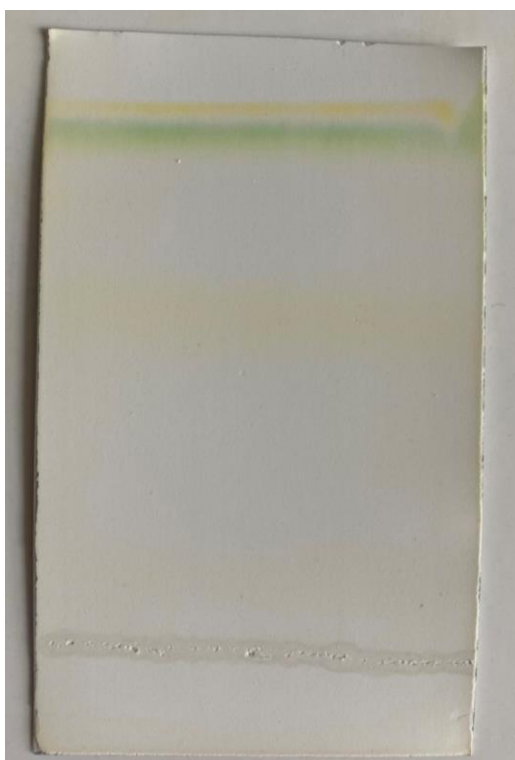
Obrázek 19: Chromatografie zeleného potravinářského barviva (chromatografický papír)

3. Úkol: TLC barviv listí (inspirováno z ³¹)

Základem tohoto experimentu je jakákoliv dostupná TLC destička a diethylether jako mobilní fáze. Postup je oproti předchozím úkolům více náročný, avšak pro žáky stále zvládnutelný. Ve třecí misce se natrhané listí smíchá společně s pískem a malým množstvím acetonu. Tato směs se několik minut tře. Následně se směs zfiltruje. Vzniklým přefiltrovaným roztokem se například pomocí kapátka asi 1 cm od okraje

nanese na chromatografickou destičku cca 3 mm vodorovný proužek. Poté se destička vloží do předem připravené vyvíjecí aparatury s přiměřeným množstvím diethyletheru (cca 0,5 cm od dna). Příkladem jednoduché vyvíjecí aparatury je dostatečně velká kádinka uzavřená hodinovým sklíčkem. Několik milimetrů před horním okrajem se destička vyndá a vyhodnotí. Lze vyhodnocovat ihned, jelikož vzniká barevný chromatogram.

Je třeba dbát zvýšené opatrnosti, aceton a diethylether jsou těkavé a hořlavé látky.

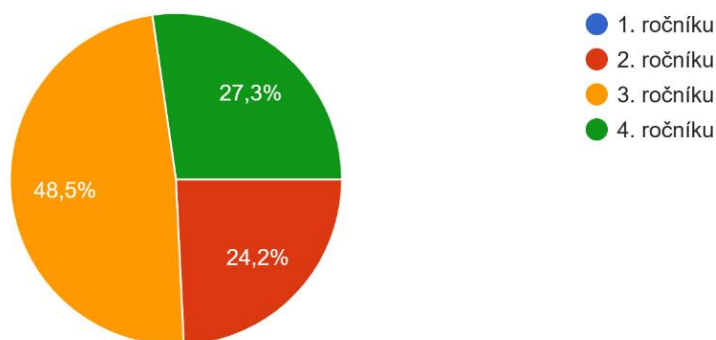


Obrázek 20: TLC barviv listí (silufol)

3.2.1 VÝZKUM VÝUKY CHROMATOGRAFIE NA STŘEDNÍCH ŠKOLÁCH

Pro výzkum, zda se na středních školách vyučuje chromatografie, bylo zvoleno metody dotazníku. Výzkum probíhal pouze na území Karlovarského kraje a bylo osloveno 5 různých středních škol.

Největší počet respondentů byl ze 3. ročníků a druhými nejčastějšími respondenty byly žáci 4. ročníku středních škol viz graf č. 1.

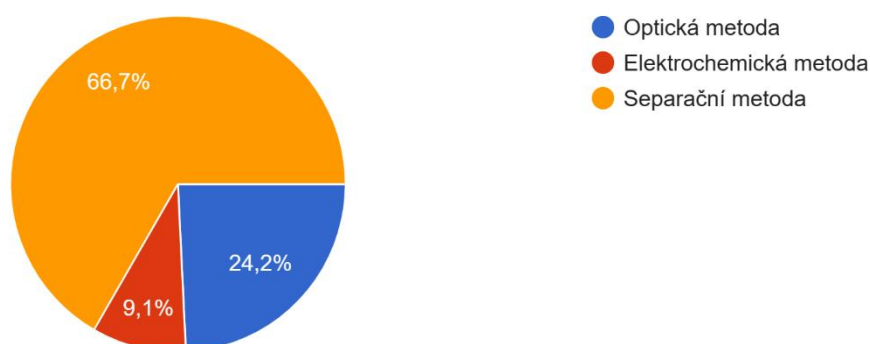


Graf 1: Zastoupení jednotlivých ročníků SŠ

Jediná oslovená střední odborná škola se tohoto dotazníku nezúčastnila, proto 100 % dotazovaných je z gymnázií.

Pomocí dotazníku bylo zjištěno, že ve všech školách probíhá laboratorní výuka. Zároveň bylo zjištěno, že 66,7 % dotazovaných by uvítalo větší množství laboratorní výuky. Z těchto výsledků je patrné, že žáci v dnešní době jeví zájem o praktickou formu vyučování chemie. Dalo by se říci, že díky laboratorní výuce si žáci více upevní naučené teoretické poznatky.

Další otázkou bylo zjišťováno, zda žáci umí zařadit chromatografii podle fyzikálně-chemických metod. Žáci měli na výběr ze třech možností: optická metoda; elektrochemická metoda; separační metoda. Odpovědi všech respondentů jsou uvedeny v grafu č. 2. 66,7 % žáků zvolilo odpověď separační metoda, která je zároveň i správnou odpovědí.



Graf 2: Zařazení chromatografie podle fyzikálně-chemických metod

Další otázkou bylo, aby žáci vlastními slovy popsali, na jakém principu je založená chromatografie. 30,3 % respondentů odpovědělo „nevím“. 21,2 % respondentů odpovědělo, že principem je rozdělování barev. Tento miskoncept vznikl nejspíše tím, že

žáci mohli vidět demonstrační pokus, který byl již popsán v kapitole 3.1 nebo 3.2, a upevnili si pouze poznatek, že se jedna barva rozdělila na více různých barev. Velmi častou odpovědí bylo, že princip chromatografie je založen na různé afinitě složek směsi k jednotlivým fázím. Občasně bylo i zdůrazněno, že se jedná o mobilní (pohyblivou) a stacionární (pevnou) fázi. Tyto odpovědi byly nejvíce očekávané.

Poslední dvě odpovědi, které nejlépe vystihly princip chromatografie, byly velice překvapivé. Lze říci, že tito dva žáci nejspíše jeví o chemii vyšší zájem. První odpověď: „2 fáze (nepohyblivá a pohyblivá), složky, které mají větší afinitu v mobilní fázi jdou více dopředu, ty, které v nepohyblivé se zdržují“. Druhá odpověď: „Kombinace pohyblivé a stacionární fáze. Každá látka má jinou afinitu k daným fázím. Urazí jinou vzdálenost od startu“.

Vzhledem k této diplomové práci, ve které byla prováděna chromatografie pouze pro bezbarvé látky, které se musely následně postříkat kyselinou a vypálit na topné spirále, aby byly zviditelněny, další otázka zjišťovala, jestli lze použít metodu chromatografie i pro bezbarvé látky. Žáci se již od základní školy setkávají s chromatografií pouze tak, že dělí různé barvy, ať už na zmíněné křídě či filtračním papíře. 60,6 % respondentů odpovědělo, že chromatografii lze použít i na bezbarvé látky. Bylo by vhodné, aby všichni učitelé chemie, pokud se rozhodnou zařadit chromatografii do výuky, při demonstračním pokusu či pouze výkladu alespoň zmínili, že lze použít i bezbarvé látky, které se musí následně detekovat jinou metodou.

Předposlední otázka zjišťovala, jestli se žáci setkali s chromatografií při laboratorní výuce chemie. 48,5 % žáků odpovědělo, že ano. Na tuto otázku navazovala poslední otázka, aby žáci, kteří se již setkali s chromatografií, popsali, o co se jednalo.

Vybrané odpovědi žáků:

„Na křídě se na každý bok namaloval fixem proužek rozdílných barev. Poté se křída postavila do mělké vody. Po chvíli jsme mohli pozorovat z jakých odlišných barev je každá původní barva tvořena.“

„Pokus s křídou/papírek a tečky nakreslené fixou+ líh, popsání témata, postupu -> ukázka u učitelského stolu -> studenti si to sami ve dvojicích vyzkoušeli.“

„Na filtrační papír jsme po jeho obvodu nanесли několik puntíku černým fixem a zakápli jsme tekutinou (myslím, že to byl líh) a pak jsme pozorovali, jak se černý fix rozpívá na různé barvy.“

„Ve škole jsme si ukazovali chromatografii na křídě, na níž byl namalovaný barevnou fixou proužek, následně jsme křídou položili do ethanolu (mobilní fáze) a sledovali, jak se například hnědá barva, dělí na její základní barvy, na základě rozdílné přilnavosti k fázím.“

Z těchto odpovědí lze jednoznačně říci, že nejčastějším provedením chromatografie je pokus, který používá křídou jako stacionární fázi a ethanol či vodu jako mobilní fázi. Tento postup byl již popsán v kapitolách 3.1 a 3.2.

Závěrem lze říci, že žáci mají ve velké míře alespoň základní povědomí o chromatografii. Zároveň je chromatografie zahrnuta do výukových témat středních škol gymnaziálního typu v Karlovarském kraji, i když není uvedena v RVP G*.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce vycházela ze tří vzorků parazitujících hub na bříze bělokoré. Prvním vzorkem byl zakoupený rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) ve formě čaje, který je prodáván pod názvem „Čaga fytočaj“. Druhým vzorkem byl rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*), který byl sbírán 5.1.2021 v lokalitě Světce u Tachova, jednalo se o vzorek s označením č. 2. Třetím vzorkem byl troudnatec kopytovitý (*Fomes fomentarius*), který byl sbírán 28. 11. 2023 v lokalitě Bečov nad Teplou.

Na počátku této práce byla prostudována odborná literatura o těchto parazitujících houbách, převážně se jednalo o zahraniční studie. Na základě získaných informací bylo usouzeno, že veškeré vzorky budou co nejvíce rozmělněny a extrahovány převážně ethanolem.

Malé množství vzorku čaje „Čaga fytočaj“ bylo extrahováno ethanolem, methanolem a chloroformem. Následně bylo provedeno srovnávací TLC s čistým extraktem betulinu. Při této metodě neposkytl žádný extrakt stopu, která by se nacházela ve stejné úrovni jako stopa betulinu. Pro tento vzorek by bylo vhodné zavést kontinuální extrakci většího množství v Soxhletově extraktoru a provést srovnávací TLC ještě jednou.

Podle studie ⁷ byl druhý vzorek rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*) extrahován 24 hodin ethanolem a další část byla extrahována vodou vařením tohoto vzorku po dobu jedné hodiny. Následně byl ethanolový extrakt zahuštěn destilací a vysušen do konstantní hmotnosti s výtěžkem 5,26 % a vodný extrakt byl zahuštěn odpařením a vysušen do konstantní hmotnosti s výtěžkem 6,98 %. A následně bylo provedeno srovnávací TLC s čistým betulinem. Vodný extrakt neposkytl žádnou stopu, proto mu již nebylo věnováno více pozornosti. Ethanolový extrakt poskytl stopu ve stejné úrovni jako byla poskytnuta stopa čistým betulinem. Proto bylo provedeno preparativní TLC, aby byly jednotlivé látky izolovány. Pomocí výpočtu R_f bylo odebráno široké pásmo, kde by se měl vyskytnout čistý betulin. Následně bylo provedeno další srovnávací TLC, které potvrdilo, že ethanolový extrakt poskytuje stopu ve stejné úrovni jako stopa betulinu. Lze říci, že metodou TLC bylo prokázáno, že rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) obsahuje betulin jako jednu z mnoha svých biologicky a farmakologicky aktivních látek.

Třetí vzorek troudnatce kopytovitého (*Fomes fomentarius*) byl extrahován ethanolem po dobu 24 hodin. Následně byl extrakt zahuštěn pomocí destilace a vysušen do konstantní hmotnosti s výtěžkem 13,54 %. Bylo provedeno srovnávací TLC s čistým extraktem betulinu. Nebyla poskytnuta žádná stopa, která by se nacházela ve stejné úrovni jako stopa čistého betulinu. Lze říci, že pomocí metody TLC bylo zjištěno, že troudnatec kopytovitý (*Fomes fomentarius*) neobsahuje betulin jako svojí obsahovou látku, což koresponduje s prostudovanou literaturou.

Závěr této diplomové práce se věnuje výuce chromatografie na základních a středních školách a její obsažení v učebnicích. Dále bylo navrženo několik chemických experimentů na téma chromatografie, které lze zavést do laboratorní výuky, nebo jen jako demonstrační pokus pro žáky. V poslední řadě proběhl výzkum pomocí dotazníku na středních školách Karlovarského kraje, kde bylo zjištěno, že ve všech zúčastněných školách probíhá laboratorní výuka chemie. 66,7 % žáků správně zařadilo chromatografii mezi separační metody. 51,5 % žáků odpovědělo, že „netuší“ co chromatografie znamená, nebo mají pouze ukotvený miskoncept, že chromatografie je metoda rozdělení barev. 60,6 % žáků odpovědělo, že pomocí chromatografie lze dělit i bezbarvé látky. Na závěr bylo vybráno několik pokusů, které žáci prováděli na svých hodinách chemie.

RESUMÉ

Tato diplomová práce je rozdělena do třech částí – teoretické, experimentální a didaktické.

Teoretická část této práce obsahuje popis dvou parazitujících hub na bříze bělokoré – rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) a troudnatec kopytovitý (*Fomes fomentarius*). Dále se zabývá popisem betulinu a jeho obsažení v březové kůře a rezavci šikmém (*Inonotus obliquus*). V teoretické části jsou dále popisovány i použité laboratorní metody.

Experimentální část se zabývá extrakcí obsahových látek ze tří zkoumaných vzorků – čaj z rezavce šikmého „Čaga fytočaj“; rezavec šikmý; troudnatec kopytovitý. Dále provedením srovnávací TLC s čistým extraktem betulinu. Pro vzorek rezavce šikmého následně izolace obsahových látek pomocí preparativní chromatografie.

Didaktická část se zabývá zakotvením chromatografie v příslušných RVP a její výukou na základních a středních školách. Dále je v této práci navrženo několik možností provedení chromatografie jako chemický experiment ve výuce chemie. Na závěr této části je proveden výzkum o chromatografii a její výuce na středních školách.

This thesis is divided into three parts - theoretical, experimental and didactic.

The theoretical part of this thesis contains a description of two parasitic fungi on white birch – rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*) and troudnatec kopytovitý (*Fomes fomentarius*). Furthermore, it deals with the description of betulin and its content in birch bark and *Inonotus obliquus*. The theoretical part also describes the laboratory methods used.

The experimental part deals with the extraction of the contents of three samples – tea „Čaga fytočaj“; *Inonotus obliquus*; *Fomes fomentarius*. Further by performing comparative TLC with pure betulin extract. Subsequently, the isolation of the contents was performed by preparative chromatography for the *Inonotus obliquus* sample.

The didactic part deals with the embedding of chromatography in the relevant RVP and its teaching in primary and secondary schools. Furthermore, several possibilities of

performing chromatography as a chemical experiment in chemistry education are proposed in this work. Finally, this section concludes with research on chromatography and its teaching in secondary schools.

SEZNAM LITERATURY

1. Takibayeva A. T. et al.: Methods of Analysis and Identification of Betulin and Its Derivatives. *Molecules* 28(16), 5946 (2023). Dostupné z: doi:10.3390/molecules28165946. ISSN 1420-3049. Staženo 20.3.2024.
2. Demets O. V., Takibayeva A. T., Kassenov R. Z., Aliyeva M. R.: Methods of Betulin Extraction from Birch Bark. *Molecules* 27(11), 3621 (2022). Dostupné z: doi:10.3390/molecules27113621. ISSN 1420-3049. Staženo 20.3.2024.
3. Rastogi S., Pandey M. M., Kumar Singh Rawat A.: Medicinal plants of the genus Betula—Traditional uses and a phytochemical–pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 159, 62-83 (2015). Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2014.11.010. ISSN 03788741. Staženo 20.3.2024.
4. Dehelean C. A., Șoica C., Ledeți I., Aluaș M., Zupko I., Gălușcan A., Cinta-Pinzaru S., Munteanu M.: Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chemistry Central Journal* 6(1), 137 (2012). Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-6-137. ISSN 1752-153X. Staženo 20.3.2024.
5. Géry A. et al.: Chaga (Inonotus obliquus), a Future Potential Medicinal Fungus in Oncology? A Chemical Study and a Comparison of the Cytotoxicity Against Human Lung Adenocarcinoma Cells (A549) and Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Integrative Cancer Therapies* 17(3), 832-843 (2018). Dostupné z: doi:10.1177/1534735418757912. ISSN 1534-7354. Staženo 20.3.2024.
6. Nikitina S. A., Khabibrakhmanova V. R., Sysoeva M. A.: Composition and biological activity of triterpenes and steroids from Inonotus obliquus (chaga). *Biomeditsinskaya Khimiya* 62(4), 369-375 (2016). Dostupné z: doi:10.18097/PBMC20166204369. ISSN 2310-6905. Staženo 20.3.2024.
7. Wontcheu Fotso Y. A., Ghazi S., Belkaid A., Soucy J., Tremblay L., Lamarre S., Clarisse O., Touaibia M.: Extraction, Chemical Composition, Antiradical Capacity, and Photoprotective Effect of Inonotus obliquus from Eastern Canada. *Nutraceuticals* 3(3), 380-402 (2023). Dostupné z: doi:10.3390/nutraceuticals3030029. ISSN 1661-3821. Staženo 20.3.2024.
8. Gaudreau G., Ribordy A., Ribordy F. X., Tremblay M.: Fomes fomentarius. *Dans Actes de la 11e Journée Sciences et Savoirs*, 195-204 (2005). Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/30500526>. ISBN 0-88667-060-8. Staženo 22.3.2024.
9. Bal C., Akgül H.: Pharmacological properties of Fomes fomentarius. *International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, November 22-23, 2018*, Proceeding book, 1195-1198. Ankara - Turkey 2018. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/329592051_Pharmacological_properties_of_Fomes_fomentarius. Staženo 22.3.2024.
10. Pylkkänen R. et al.: The complex structure of Fomes fomentarius represents an architectural design for high-performance ultralightweight materials. *Science Advances* 9(8), 5417 (2023). Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.ade5417. ISSN 2375-2548. Staženo 22.3.2024.
11. Keil B. a kol.: *Laboratorní technika organické chemie*. ČSAV, Praha 1954.

12. Sitholé B., Shirin S., Ambayec B.: Analysis and Fate of Lipophilic Extractives in Sulphite Pulps. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 30(1), 31-47 (2010). Dostupné z: doi:10.1080/02773810903370404. ISSN 0277-3813. Staženo 23.3.2024.
13. Richtr V., Kraitr M.: *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*. Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, Plzeň 2004.
14. Janků Z.: *Školní pokusy z organické chemie*. Karolinum, Praha 2008. ISBN 978-80-246-1555-4.
15. Žemlička M.: *Studium obsahových látek rezavce šikmého. Bakalářská práce*. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2022.
16. Lee M. W., Hur H., Chang K. Ch., Lee T. S., Ka K. H., Jankovsky L.: Introduction to Distribution and Ecology of Sterile Conks of *Inonotus obliquus*. *Mycobiology* 36(4), 199-202 (2008). Dostupné z: doi:10.4489/MYCO.2008.36.4.199. ISSN 1229-8093. Staženo 23.3.2024.
17. *Rámcový vzdělávací program pro základní vzdělávání*. Dostupné z: <https://www.edu.cz/rvp-ramcove-vzdelavaci-programy/ramcovy-vzdelavaci-program-pro-zakladni-vzdelavani-rvp-zv/>, staženo 24.3.2024.
18. Mach J., Plucková I., Šibor J.: *Chemie: úvod do obecné a anorganické chemie, 4.* aktualizované vydání. Nová škola - Duhová řada, Brno 2016. ISBN 9788072896950.
19. Beneš P., Pumpr V., Banýr J.: *Základy praktické chemie 1: pro 8. ročník základní školy*, 3. upravené vydání. Fortuna, Praha 2021. ISBN 9788073731656.
20. *Složení barviv ve fixech*. Dostupné z: <https://studiumchemie.cz/experiment/slozeni-barviv-ve-fixech/>, staženo 26.3.2024.
21. *Rámcové vzdělávací programy pro gymnázia*. Dostupné z: <https://www.edu.cz/rvp-ramcove-vzdelavaci-programy/ramcove-vzdelavaci-programy-pro-gymnazia-rvp-g/>, staženo 27.3.2024.
22. *RVP G* - ŠVP chemie VG*. Dostupné z: <https://gymkvary.cz/system/files/dokumenty/Aktualizovan%C3%BD%20C5%A0VP%20chemie%20VG%20%28v%C4%8Detn%C4%9B%20%C3%BApln%C3%A9ho%20zn%C4%9Bn%C3%AD%29%202023%20-%20203.pdf>, staženo 27.3.2024.
23. *RVP G* - ŠVP čtyřleté, osmileté a šestileté studium se zaměřením matematika a přírodní vědy vyšší stupeň gymnázia denní studium*. Dostupné z: https://www.mikulasske.cz/wp-content/uploads/2023/09/SVP2324v_mpr.pdf, staženo 27.3.2024.
24. *RVP G* - ŠVP čtyřleté, osmileté a šestileté studium s všeobecným zaměřením vyšší stupeň gymnázia denní studium*. Dostupné z: https://www.mikulasske.cz/wp-content/uploads/2023/09/SVP2324v_vse.pdf, staženo 27.3.2024.
25. Benešová M., Pfeiferová E., Satrapová H.: *Odmaturuj! z chemie, 2.* přepracované vydání. Didaktis - Odmaturuj!, Brno 2014. ISBN 978-80-7358-232-6.
26. Vacík J. a kol.: *Přehled středoškolské chemie, 4.* vydání. SPN – pedagogické nakladatelství. Praha 1999. ISBN 80-7235-108-7.
27. *Rámcový vzdělávací program pro obor vzdělání 28 – 52 – H/01 Chemik*. Dostupné z: <https://www.edu.cz/rvpsov/ciste/28-52-H01.pdf>, staženo 29.3.2024.

28. *Rámcový vzdělávací program pro obor vzdělání 78 – 42 – M/03 Pedagogické lyceum*. Dostupné z: <https://www.edu.cz/rvpsov/ciste/78-42-M03.pdf>, staženo 29.3.2024.
29. Blažek J., Fabini J.: *Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření*. SPN - pedagogické nakladatelství. Praha 1999. ISBN 80-7235-104-4.
30. *Složení potravinářských barviv*. Dostupné z: <https://studiumchemie.cz/experiment/slozeni-potravinarskych-barviv/>, staženo 28.3.2024.
31. Váňová A.: *Planární chromatografie v experimentální výuce chemie. Diplomová práce*. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2022.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec betulinu (převzato z ²).....	5
Obrázek 2: Schéma Soxhletova extraktoru (převzato z ¹²).....	9
Obrázek 3: Schéma destilační aparatury	10
Obrázek 4: Vyhodnocení chromatogramu R _F (převzato z ¹⁴).....	12
Obrázek 5: TLC extraktů čaje "Čaga fytočaj" n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (zleva chloroform, methanol, betulin, ethanol)	17
Obrázek 6: TLC ethanolového extraktu čaje n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (Č- čaj, B- betulin, R- rezavec šikmý).....	18
Obrázek 7: TLC ethanolového extraktu čaje n-hexan:ethyl-acetát (10:1) (Č- čaj, B- betulin, R- rezavec šikmý).....	19
Obrázek 8: Preparativní TLC betulinu	20
Obrázek 9: Sledování obsahu látek v jednotlivých odběrech.....	21
Obrázek 10: Porovnání obsahových látek z vybraných odběrů	21
Obrázek 11: Vymytí adsorbovaných látek	22
Obrázek 12: Filtrace vodného extraktu rezavce šikmého.....	24
Obrázek 13: TLC extraktů rezavce šikmého n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (S- v bakalářské práci ¹⁵ , N- nově vyhotovený, B- betulin, V- vodný).....	26
Obrázek 14: Preparativní TLC ethanolového extraktu rezavce šikmého	27
Obrázek 15: Kontrolní TLC n-hexan:ethyl-acetát (10:3) rezavce šikmého	29
Obrázek 16: TLC troudnatce kopytovitého n-hexan:ethyl-acetát (10:3) (T- troudnatec kopytovitý, B- betulin, R- rezavec šikmý)	31
Obrázek 17: Chromatografie černého fixu na křídě (ethanol).....	34
Obrázek 18: Chromatografie černého fixu na křídě (vlevo - voda; vpravo - ethanol)	36
Obrázek 19: Chromatografie zeleného potravinářského barviva (chromatografický papír).....	37
Obrázek 20: TLC barviv listí (silufol).....	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Eluotropická řada podle Trappeho (převzato z ¹¹)	14
Tabulka 2: Obsahy jednotlivých lékovek	17
Tabulka 3: Navážky patron pro extrakci	25
Tabulka 4: Izolace obsahových látek.....	28

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zastoupení jednotlivých ročníků SŠ	39
Graf 2: Zařazení chromatografie podle fyzikálně-chemických metod	39