

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA  
BRNO

---

FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
Ústav přírodních léčiv

Laboratorní metody experimentální  
fytochemie

Karel Šmejkal, Jan Muselík, Petr Mokřý

---

BRNO 2013



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Obsah

1	Základní informace o rostlinných sekundárních metabolitech .....	5
1.1	Úvod .....	5
1.2	Hlavní třídy rostlinných sekundárních metabolitů .....	7
1.2.1	Charakteristika primárního a sekundárního metabolismu.....	7
1.2.2	Primární metabolity .....	7
1.2.3	Sekundární metabolity.....	7
1.2.3.1	Terpenoidy .....	8
1.2.3.2	Alkaloidy a další sloučeniny obsahující dusík .....	10
1.2.3.3	Fenolické sloučeniny .....	11
1.3	Funkce rostlinných sekundárních metabolitů .....	13
1.3.1	Rostlinné růstové hormony .....	13
1.3.2	Rostlinné pigmenty a vůně .....	14
1.3.3	Rostlinné odpuzovače býložravců.....	15
1.3.4	Rostlinné antifungální látky .....	15
1.3.5	Rostlinné látky s aktivitou živočišných hormonů .....	16
2	Metody izolace rostlinných sekundárních metabolitů.....	17
2.1	Základní přístupy a fytochemická literatura .....	17
2.2	Výběr a příprava rostlinného materiálu .....	20
2.2.1	Náhodný výběr .....	20
2.2.2	Využití etnobotanických informací .....	21
2.2.3	Využití chemotaxonomických informací .....	22
2.2.4	Sběr a sušení.....	22
3	Rozklad látek a tvorba artefaktů.....	24
4	Extrakce.....	25
4.1.1	Úvod.....	25
4.1.1.1	Difúzní koeficient .....	26
4.1.1.2	Difúzní plocha.....	27
4.1.1.3	Tloušťka difúzní vrstvy a koncentrační spád .....	27
4.1.2	Typy extrakce .....	27
4.1.3	Extrakce kapalinou .....	28
4.1.3.1	Periodické extrakce .....	29
4.1.3.2	Kontinuální extrakce .....	30
4.1.4	Superkritická fluidní extrakce (SFE).....	31
4.1.5	Destilace s vodní parou .....	34
4.1.6	Parní destilace-extrakce (SDE – steam distillation extraction) .....	36
4.1.7	Extrakce plynem z pevné fáze.....	37
4.2	Purifikace.....	39
4.2.1	Úvod.....	39
4.2.2	Rozdělování mezi nemísitelná rozpouštědla .....	39
4.2.3	Lyofilizace (mrazová sublimace) .....	43
4.2.4	Precipitace (srážení) .....	43
4.2.5	Krystalizace .....	44
4.3	Chromatografické metody .....	46
4.3.1	Principy separace látek v chromatografii .....	46
4.3.2	Tenkvrstvá chromatografie (TLC) .....	47
4.3.2.1	Detekční metody pro tenkovrstvou chromatografii .....	52
4.3.3	Teoretické základy kolonové chromatografie .....	55
4.3.3.1	Základní charakteristiky chromatografického procesu .....	56

4.3.3.2	Účinnost a rozlišení chromatografické separace.....	57
4.3.3.3	Optimalizace podmínek chromatografické separace .....	58
4.3.3.4	Vznik nesymetrických píků .....	59
4.3.4	Plynová chromatografie (GC) .....	60
4.3.4.1	Detekční metody pro plynovou chromatografii.....	63
	Detektor pomocí ionizace plamenem (FID – Flame Ionization Detector).....	63
	Detektor FT-infračervenou spektrofotometrií (FT-IR - Fourier Transform Infrared Detector).....	64
	Detekce hmotnostní spektrometrií (MS – Mass Spectrometric Detection).....	64
4.3.5	Klasická sloupcová kapalinová chromatografie.....	65
4.3.5.1	Flash chromatografie .....	66
4.3.5.2	Detekční metody pro sloupcovou chromatografii.....	67
4.3.6	Sorbenty pro kapalinovou chromatografii.....	67
4.3.6.1	Silikagel .....	67
4.3.6.2	Alumina.....	69
4.3.6.3	Modifikovaný silikagel .....	69
4.3.6.4	Polyamidy .....	70
4.3.6.5	Celulóza .....	71
4.3.6.6	Sephadex LH-20 .....	71
4.3.7	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	73
4.3.7.1	Detekční metody pro HPLC.....	77
	Spektrofotometrické detektory .....	77
	Fluorimetrické detektory .....	78
	Elektrochemické detektory.....	78
	Refraktometrické detektory .....	78
	Výparné detektory rozptylu světla (evaporative light scattering) .....	79
	Hmotnostní detektory .....	79
5	Metody identifikace rostlinných sekundárních metabolitů .....	80
5.1	Úvod .....	80
5.2	Spektroskopické metody.....	80
5.2.1	Infračervená spektroskopie (IČ).....	80
5.2.2	UV/Vis spektrofotometrie .....	85
5.2.2.1	Kvalitativní analýza .....	87
5.2.2.2	Kvantitativní analýza .....	87
5.3	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	89
5.3.1	Iontové zdroje.....	90
5.3.2	Hmotnostní analyzátoři .....	93
5.3.3	Detektory v MS .....	97
5.3.4	Využití hmotnostní spektrometrie .....	98
5.4	Nukleární magnetická resonance (NMR) .....	101
5.4.1	Princip NMR spektroskopie .....	101
5.4.2	Chemický posun .....	102
5.4.3	Instrumentace NMR a postup měření.....	103
5.4.4	Jednodimenzionální <sup>1</sup> H NMR .....	106
5.4.5	Jednodimenzionální <sup>13</sup> C NMR .....	110
5.4.6	Dvoudimenzionální <sup>1</sup> H a <sup>13</sup> C NMR.....	113
5.5	Rentgenová (RTG) difrakce .....	118
5.5.1	Vznik difraktovaného záření .....	119
5.5.2	Techniky měření a prezentace výsledků .....	121
5.5.3	Zdroje RTG záření a jeho detekce.....	123

6	Testování biologické aktivity .....	124
7	Použitá a doporučená literatura .....	128

# 1 Základní informace o rostlinných sekundárních metabolitech

## 1.1 Úvod

Zájem o rostlinné látky trvá od dávnověku. Rostliny byly využívány pro mnoho účelů, nejen jako zdroj potravy, ale i jako barviva, pro šamanské účely a pro jednoduchou medicínu. Mezi ty nejpoužívanější a nejzajímavější patřily rostliny s omamnými a halucinogenními vlastnostmi, případně rostliny jedovaté, jako jsou mák (*Papaver somniferum*), respektive opium, konopí (*Cannabis sativa*), rulík (*Atropa beladonna*), durman (*Datura stramonium*), oměj (*Aconitum* spp.) nebo bolehlav (*Conium maculatum*). Během antiky a starověku bylo poznání o využití léčivých rostlin rozšířeno, ale ve středověku stagnovalo a přetrvalo pouze jako součást lidové medicíny, případně v našich podmínkách v kláštrech. Až s postupem času a rozvojem průmyslu, vědeckých disciplín a nárůstem metodologie vhodné pro izolaci a analýzu byly objeveny první účinné rostlinné látky. Jako první byly izolovány alkaloidy. Byly nápadně silnou biologickou aktivitou, jejich izolace byla díky chemickým vlastnostem a vysokému obsahu v analyzovaném materiálu snadná, dnes by se dalo vzhledem k současným znalostem říci triviální. Některé příklady: 1806 Sertürner (Německo) izoloval morfin; 1817-1820 Pelletier a Caventou (Francie) izolovali několik krystalických alkaloidů, jako například strychnin, brucin, nebo chinin; kofein v roce 1819 Runge (Německo); nikotin v roce 1829 Posselt a Reimann; papaverin v roce 1848 Merck (Německo) a samozřejmě další. Pro studenty farmacie může být potěšující, že prvních izolací se intenzivně účastnili lékárníci. Nebyly to však pouze alkaloidy, které byly zkoumány. Už v roce 1664 Boyle (Anglie) zkoumal rostlinná barviva, jako jsou fialové anthokyany nebo žluté flavonoidy pro účely textilního průmyslu.

Jako vědecká disciplína byla fytochemie zavedena a upevněna na světových univerzitách na přelomu 19. a 20. století a rozvíjela se díky zlepšujícím se schopnostem hlavně organických chemiků krystalizovat látky ze složitějších směsí a také je identifikovat, hlavně pomocí metod tzv. chemické degradace. Zkoumány byly také první biosyntetické cesty. Do roku 1957 bylo známo okolo 2 750 rostlinných látek, vyjma alkaloidů. Zahrneme-li do tehdejšího výčtu alkaloidy, bylo popsáno přes 5 000 rostlinných metabolitů. Z toho je vidět skutečně obrovský význam typických vlastností alkaloidů (krystalické látky, bazický charakter, výrazná biologická aktivita) pro jejich izolaci a popis.

Po druhé světové válce došlo ke změně celé řady fytochemických přístupů. Do praxe byla zavedena celá řada nově vyvinutých identifikačních metod, zdokonalených během války. Nejvýznamnější bylo zavedení sofistikovaných chromatografických technik. Vylepšená chromatografická separace umožnila izolovat i látky, které ne právě snadno krystalizovaly, případně byly amorfního charakteru. Spektrální analytické techniky umožnily rychlou identifikaci izolovaných látek oproti zdlouhavé degradační proceduře a navíc umožnily pracovat s miligramovými množstvími oproti dřívějším gramům. V současné době je tak známo přes 200 000 přírodních sloučenin a jejich počet stále roste.

## 1.2 Hlavní třídy rostlinných sekundárních metabolitů

### 1.2.1 Charakteristika primárního a sekundárního metabolismu

Látky izolované z rostlin mohou být rozděleny na primární a sekundární metabolity podle toho, jakým způsobem se syntetizují, jsou-li v rostlinách ubikvitární, a také podle toho, jestli hrají v rostlinném metabolismu esenciální roli. Primárními metabolity se zabývá biochemie, sekundární metabolity jsou předmětem studia farmakognosie. Zde se omezíme pouze na základní definice.

### 1.2.2 Primární metabolity

Mezi **primární metabolity** řadíme běžné cukry, proteinogenní aminokyseliny, puriny a pyrimidiny nukleových kyselin, chlorofyl a běžná rostlinná barviva, jednoduché tuky a jednoduché nízkomolekulární karboxylové kyseliny. Jsou to látky, které jsou v rostlinách víceméně všudypřítomné, účastní se základních metabolických pochodů, tzv. **primárního rostlinného metabolismu**, a pro život rostlin i jiných živých organismů jsou nezbytné.

### 1.2.3 Sekundární metabolity

**Sekundární metabolity** jsou sloučeniny vznikající na základě prekurzorů pocházejících z primárního metabolismu. Jejich distribuce mezi rostlinnými čeleděmi, často i druhy, je pouze limitovaná, nejsou přítomné ubikvitárně (taxonomická restrikce). Rostlina pro jejich syntézu využívá specializované enzymové systémy, jejich tvorba je označována jako **sekundární metabolismus**. Jejich úloha v životě rostlin je do značné míry neznámá, uvažuje se o jistých zvýhodněních v boji o život. O již odhalených funkcích sekundárních metabolitů se zmíníme dále.

Výše zmíněná kritéria pro zařazení látky mezi primární nebo sekundární metabolity mají své limity. Přírodní látky mohou mít svůj význam v primárním metabolismu (např. některé strukturně speciální mastné kyseliny), a současně mohou být výskytem limitovány na

jednu čeleď. Některé látky mohou být za sekundární metabolity označovány v podstatě neprávem, protože zjištění jejich ubikvitárnosti brání limity detekčních metod. Takovou látkou byl například skvalen, do jisté doby považovaný za sekundární metabolit vyskytující se pouze v játrech žraloků, dnes známý jako základní prekurzor steroidů a vyšších terpenů.

Po izolaci nového sekundárního metabolitu nastává v současnosti problém s jeho pojmenováním. Jeho **chemické pojmenování** bývá příliš složité pro praktické využití, na druhou stranu takový chemický popis struktury přináší maximum možných informací. V počátcích fytochemie bylo hojně využíváno **triviální pojmenování**. Látka byla pojmenována podle rostlinného druhu, z kterého byla získána (alkaloid strychnin - rod *Strychnos*, alkaloid atropin – rod *Atropa*) apod. Bylo využíváno i pojmenování podle autora látky (alkaloid peletierin – Pelletier), nebo podle významné vlastnosti izolované látky (alkaloid morfin – podle boha snění Morphea, diacetylmorfin – heroin – „heroické“ analgetikum). Je celkem jasné, že i tento systém má s narůstajícím počtem různých přírodních látek a jejich derivátů své limity, proto je v současnosti zřejmě nejvýhodnější používat **semitriviální pojmenování**, případně indexování látek pomocí čísel nebo písmen abecedy (příkladem může být směs azadirachtinů A-G nebo ginsenosidů Rb1, Rb2, Rc atd.).

Pro třídění a klasifikaci přírodních látek je v současnosti používán také **biosyntetický systém**. Ten vychází z rozdělení látek na skupiny podle biosyntetických cest a prekurzorů, které jsou pro jejich biosyntézu rostlinou používány. Tento systém má ovšem také svoje limity vyplývající z omezených vědomostí o biosyntetickém původu nově izolovaných nebo velmi složitých molekul. Někdy také pro biosyntézu není využíván pouze jeden, ale několik různých prekurzorů pocházejících z rozdílných oblastí primárního metabolismu. Pro zjednodušené účely tohoto textu rozdělíme sekundární metabolity do tří hlavních skupin: na 1) **terpenoidy**, 2) **alkaloidy a dusíkaté sloučeniny nealkaloidní povahy** a 3) **fenolické látky**.

### 1.2.3.1 Terpenoidy

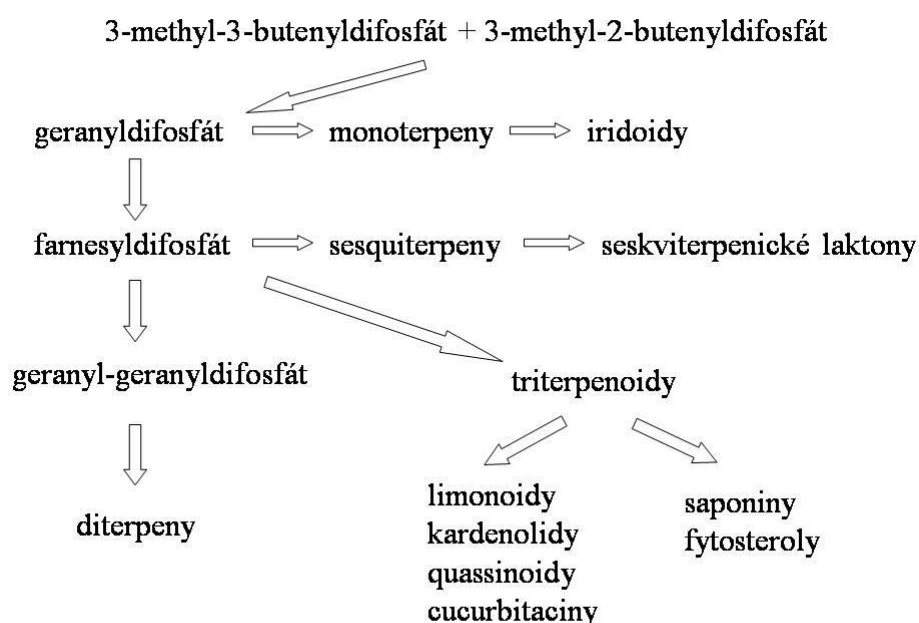
Terpenoidy neboli izoprenoidy jsou obvykle lipofilní sloučeniny charakterizované podle biosyntetického původu jako látky odvozené od 3-methyl-3-butenyldifosfátu nebo 3-methyl-2-butenyldifosfátu.





Obr. 1: 3-methyl-3-butenyldifosfát a 3-methyl-2-butenyldifosfát

Nalézány jsou zejména v žláznatých trichomech rostlin, v exsudátech pupenů, v květech a v pryskyřicích. Po chemické stránce jsou to obvykle cyklické nasycené nebo nenasycené (s různým stupněm saturace) uhlovodíky, různě oxidované (alkoholy, ketony, apod.). Podle počtu biosynteticky spojených 5-ti uhlíkových izoprenoidních jednotek je dělíme na monoterpeny (C10), seskviterpeny (C15), diterpeny (C20) a triterpeny (C30). Jejich biosyntetický vztah je ve stručnosti uveden na následujícím obrázku (Obr. 2).



Obr. 2: Zjednodušený přehled jednotlivých tříd terpenoidů a jejich biosyntetický vztah

Počet 5-ti uhlíkových biosyntetických jednotek souvisí s těkavostí terpenů, látky do 15-20 uhlíků mají poměrně nízkou teplotu varu a jsou často zodpovědné za charakteristický zápach nebo příjemnou vůni. Jak ze skupiny monoterpenů, tak ze skupiny seskviterpenů je možno vyčlenit podskupiny látek, takzvané iridoidy a seskviterpenické laktony (s laktonovým kruhem). Iridoidy patří mezi látky často hořké chuti (používané jako amara) nebo látky sloužící jako prekurzory v biosyntéze alkaloidů. Skupina seskviterpenických laktonů reprezentovaná více než 3 000 sloučeninami je obzvláště významná, typická pro rostliny čeledi Asteraceae. Mezi diterpeny můžeme najít například giberelliny, což jsou rostlinné

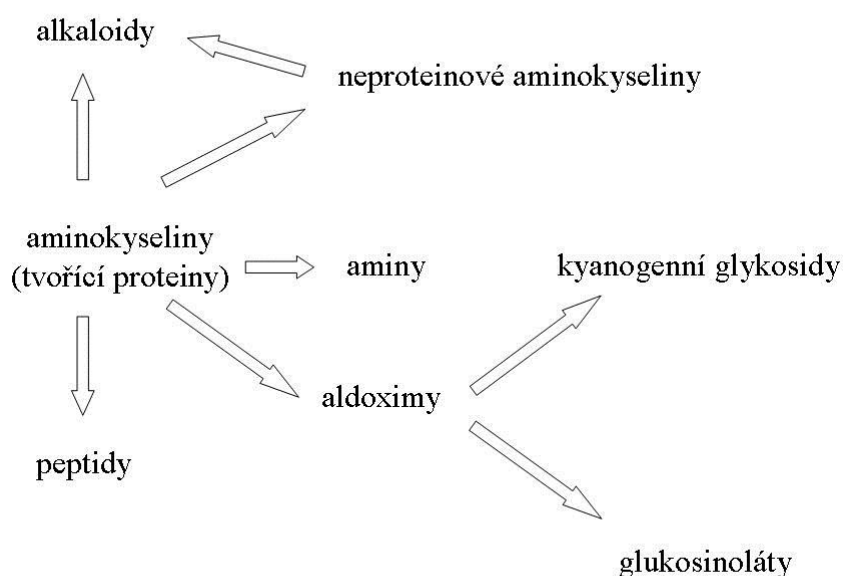
růstové hormony, nebo kyseliny tvořící základ pryskyřic. Pro triterpenoidní struktury jsou typické saponiny (látky s pěnivými a hemolytickými schopnostmi), fytosteroly, kardioaktivní glykosidy a další.

### **1.2.3.2 Alkaloidy a další sloučeniny obsahující dusík**

Alkaloidy jsou pravděpodobně nejznámějšími dusíkatými sekundárními metabolity izolovanými z rostlin. Právě alkaloidy jsou organické báze, u kterých je dusík jako součást struktury obvykle zabudovaný ve formě 5-ti nebo 6-ti členného kruhu. Jejich prekurzorem je omezená skupina aminokyselin (např. ornitin, lysin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan). Existují i další látky velmi příbuzné alkaloidům, tzv. protoalkaloidy a pseudoalkaloidy, které však nesplňují všechny výše popsané náležitosti, tj. např. dusík není součástí heterocyklu, nebo jsou to látky tvořené jinými mechanismy než z omezeného počtu aminokyselinových prekurzorů.

Další skupinou dusíkatých přírodních látek jsou kyanogenní glykosidy. Jsou to látky strukturně poměrně odlišné, společným rysem je dusík po hydrolýze uvolňovaný ve formě nitrilu. Jsou to látky typické např. pro čeleď Rosaceae, jejich další výskyt je taxonomicky poměrně limitován. Jinou skupinou jsou glukosinoláty, strukturně charakterizovány přítomností dvojnás vazby mezi dusíkem a uhlíkem, přičemž na dusíkový atom je dále přes síru vázán cukerný zbytek, obvykle glukosa. Glukosinoláty jsou typické pro rostliny Brassicaceae a po částečné hydrolýze a transformaci jsou zodpovědné za typický štiplavý pach a chuť těchto rostlin (hořčice).

Je třeba poznamenat, že výskyt dusíkatých sekundárních metabolitů je taxonomicky poměrně omezený. Dusíkaté látky navíc často vznikají z proteinogenních aminokyselin, takže vždy existuje kompetice o dusík s jinými biochemickými procesy, jako je např. syntéza proteinů. Obvykle jsou také koncentrace sekundárních dusíkatých metabolitů v rostlinách podstatně nižší. Je to dáno jejich komplikovanějším metabolismem, silnou biologickou aktivitou (rostlina se nesmí zahubit sama) a také tím, že koncentrace těchto látek bývají v závislosti na rostlinném orgánu nebo pletivu značně rozdílné (např. vyšší koncentrace v zásobních orgánech).



Obr. 3: Zjednodušený přehled dusíkatých rostlinných metabolitů a jejich biosyntetický vztah

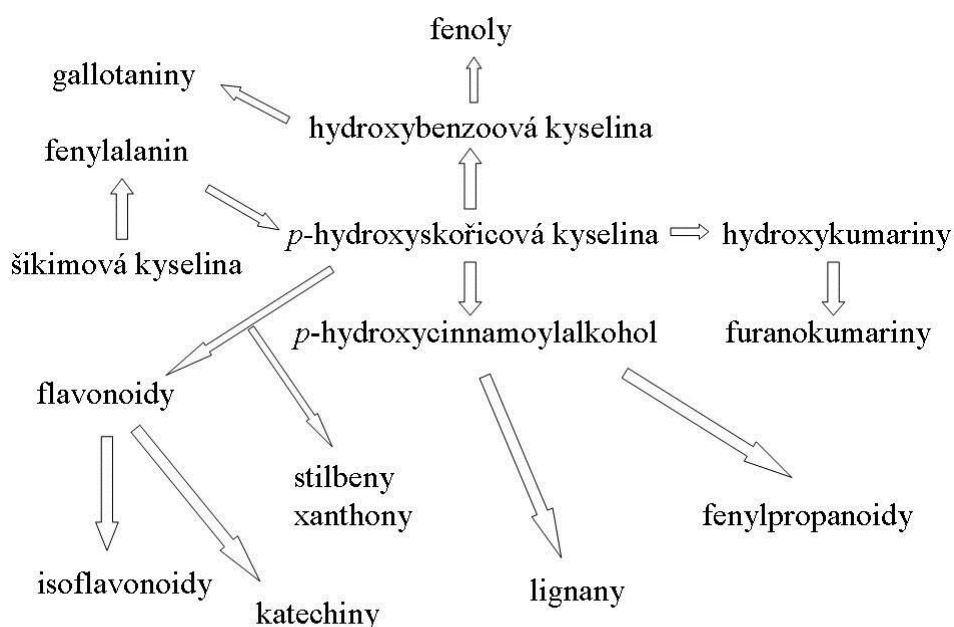
### 1.2.3.3 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou aromatické látky nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin (hydroxyl může být i substituovaný, např. methylem nebo cukerným zbytkem). Biosynteticky jsou tyto látky obvykle založené na tzv. šikimátové nebo acetátové cestě. Šikimátová cesta zjednodušeně představuje metabolismus založený na tvorbě sedoheptulosy, její transformaci na kyselinu šikimovou a následně fenylalanin. Ten je deaminován na kyselinu *p*-hydroxyskořicovou a z ní následně vzniká celá řada fenolických sloučenin. Acetátová cesta vede ke vzniku fenolů spojováním acetátových jednotek (ve formě malonyl-CoA) a následnou cyklizací. Obě dvě tyto biosyntetické cesty se mohou křížit a dávat vznik kombinovaným fenolickým sloučeninám, mezi něž patří např. flavonoidy. Stručné schéma tvorby a přeměny fenolických sloučenin najdete na obrázku 4. Různé třídy fenolických látek se liší také svojí molekulovou hmotností - jednoduché látky typu např. kyseliny benzoové ve stovkách, přes různé pigmenty typu anthokyaninů v jednotkách tisíců, až po polymerní kondenzované tanniny v desítkách tisíc daltonů.

Mezi typické vlastnosti polyfenolů patří jejich schopnost ionizace. Mnoho z fenolických sloučenin (zvláště šikimátového původu) má schopnost chelatace s

dvojmocnými nebo trojmocnými kovy. Některé anthokyaniny se v rostlinách vyskytují v chelátech se železem nebo hořčíkem. Fenolické látky s *ortho*- nebo *para*-hydroxylovými skupinami se snadno oxidují na odpovídající chinony.

Většina polyfenolů je potenciálně toxická, proto je rostliny obvykle ukládají ve vakuolách ve formě glykosidů nebo sulfátů (sloučeniny rozpustné ve vodě). Takových glykosidů jedné fenolické látky mohou být desítky, např. pro flavonolový aglykon kvercetin bylo popsáno více než 130 různých glykosidů. Na druhou stranu lipofilní polyfenoly jsou obvykle vylučovány na povrch rostliny ve formě různých exudátů nebo jsou lokalizovány v povrchových pletivech, pravděpodobně z důvodů ochrany rostlin před požírači, infekcí nebo vlivem vnějšího prostředí.



Obr. 4: Zjednodušený přehled rostlinných polyfenolů a jejich biosyntetických vztahů

### 1.3 Funkce rostlinných sekundárních metabolitů

Zjistit pravou funkci sekundárního metabolismu rostlin bylo a je poměrně obtížné. Prvním problémem je rozlišit mezi primárním a sekundárním metabolismem. Ještě poměrně nedávno byla např. kyselina šikimová považována za sekundární metabolit japonského stromu *Illicium anisatum* (podobný problém se vyskytl např. u již jednou zmiňovaného skvalenu). Některé látky také mohou svou úlohu hrát jak v primárním, tak sekundárním metabolismu. Příkladem mohou být některé neproteinogenní aminokyseliny, které slouží jako ochrana proti herbivorům a současně jako jakýsi zásobní „metabolický pool“ pro transformaci dusíku. Taková recyklace dusíku se může objevit i u alkaloidů, je pozorována např. u kofeinu. Další komplikací je multifunkčnost sekundárních metabolitů. Např. kyselina salicylová je považována za jednu ze signálních látek produkovaných rostlinami ve stresové situaci. Současně může u některých rostlin (např. *Calla*) fungovat jako látka stimulující produkci tepla během opylování. Dále je kumulována v listech různých vrb (*Salix* spp.) jako látka proti požíračům. Navíc je produkována a uvolňována v *Quercus falcata* jako látka působící allelopaticky na sousední rostliny. Zřejmě největším problémem při identifikaci funkcí sekundárních metabolitů je komplexnost směsí, ve kterých se tyto látky vyskytují. Například z *Catharanthus roseus*, madagaskarského barvíčku, bylo izolováno v různých koncentracích více než 80 alkaloidů. Těkávé směsi monoterpenů a seskviterpenů, tzv. silice, bývají složené z desítek až stovek látek, apod. Tato komplexnost může být zapříčiněná nedokonalým systémem biosyntézy, kdy celá řada meziproductů a vedlejších produktů doprovází hlavní syntetizovaný metabolit. Existují ale i důkazy o tom, že akumulace směsi látek je pro rostlinu výhodnější než syntéza látky jednotlivé. Typicky toto platí pro různé antifungální, antibakteriální nebo insekticidní sloučeniny. V následujících podkapitolách se budeme věnovat vybraným známým funkcím rostlinných sekundárních metabolitů.

#### 1.3.1 Rostlinné růstové hormony

Jednou z poměrně dobře objasněných funkcí sekundárních metabolitů je kontrola růstu a vývoje. Struktury a funkce takových látek byly analyzovány až v posledních desítkách let, protože tyto sloučeniny se vyskytují ve velmi nízkých množstvích a také jejich účinek je

detekován pomocí biologických testů v mikro až nanomolárních koncentracích. Význam a funkce jednotlivých rostlinných hormonů jsou intenzivně zkoumány. V současnosti je popsáno 7 skupin rostlinných hormonů založených na ethylenu, kyselině indolyl-3-octové, gibberellinech, cytokininech, abscisové kyselině, brassinosteroidech a polyamidech. Pro tyto látky, s výjimkou ethylenu, platí, že se vyskytují v různých strukturních variantách v různých rostlinných druzích. Často se nacházejí také v konjugované formě jako jakási zásobní sloučenina, např. deriváty indolyl-3-octové kyseliny v konjugaci s arabinosou, galaktosou, glukosou nebo inositolem. Nejrozsáhlejší skupinou rostlinných hormonů jsou gibberelliny.

Kromě látek označovaných jako růstové hormony i celá řada dalších sekundárních metabolitů nepřímo ovlivňuje životní pochody rostlin. Některé působí samostatně, jiné v synergii s rostlinnými hormony. Některé sekundární metabolity také mohou zasáhnout do biosyntetických cest, kterými se syntetizují, upravují nebo degradují pravé rostlinné hormony.

### **1.3.2 Rostlinné pigmenty a vůně**

Barva a vůně květů jsou významným atraktantem pro opylovače (včely a jiný hmyz, netopýři, ptáci). Různí opylovači preferují specifické barvy a vůně. Např. včely dávají přednost žlutým a modrým květům (přítomnost flavonoidů absorbujících ultrafialové a viditelné záření) a také sladkým příjemným vůním. Netopýři, kteří létají v noci, jsou nejvíce přitahováni bílými květy s ovocnou a sirnou vůní. Tyto vztahy jsou velmi často druhově specifické. Je třeba poznamenat, že pigmentů a vůní je celá řada, a vyskytují se většinou ve směsích. Např. anthokyany jako modré a fialové pigmenty, které doprovází flavonoidy (žluté), u žlutých květů je obvyklý současný výskyt flavonoidů a karotenoidů apod.

Rostlinné pigmenty a vůně nejsou přítomné pouze v květech, často se nacházejí i v listech nebo plodech. Složení takových pigmentů a vůní se však liší z důvodu jiné funkce. U plodů mají chuť a vůně buď přilákat požírače a tím následně šířit rostlinu do okolí, nebo naopak požírače odradit, pokud by v jejich trávicím traktu mohlo dojít k poškození semen.

### 1.3.3 Rostlinné odpuzovače býložravců

Odpuzování býložravců je v současné době považováno za jednu z hlavních funkcí sekundárních metabolitů. Býložravci jsou jedním z největších přirozených nepřátel rostlin a jako výsledek ko-evoluce došlo u rostlin v průběhu času k vývoji prostředků pro boj s býložravci. Rostliny si vyvinuly různé techniky jak zabránit konzumaci, včetně akumulace sekundárních metabolitů. I býložravci se pak snažili přizpůsobit a vyvinuly jisté detoxikační mechanismy umožňující limitované spásání.

Směřování toxického účinku může být různé, sekundární metabolity mohou být toxické specificky pro jeden druh, nebo naopak pro všechny formy života, včetně mateřské rostliny samotné. Pro zabránění autotoxicity rostliny se jedovaté sloučeniny buď vylučují na povrch rostlinných orgánů, nebo jsou tyto látky ve vázané formě uloženy ve vakuolách. Někdy je také třeba pro toxický účinek jisté metabolické aktivace sekundárního metabolitu, buď enzymatickým aparátem rostliny, nebo v trávicím traktu konzumenta.

Produkce sekundárních metabolitů je často prudce zvýšena v okamžiku napadení býložravcem. V klidovém stavu jsou hladiny takových látek udržovány na jisté úrovni, po napadení se biosyntéza aktivuje a koncentrace takových látek se zvýší i několikrát. Tento jev je typický zvláště pro napadení hmyzem, kde požíráání není velmi rychlé a rostlina má na tuto reakci relativně dlouhý čas. Uvažuje se také o tom, že v okamžiku poškození rostlinné tkáně dojde k uvolnění jistého množství těkavých sekundárních metabolitů, které stimulují tvorbu v okolních rostlinách. Může tak docházet k jistému druhu chemické komunikace.

Některé látky nemají potenciál požírače přímo zabít, ale fungují spíše na principu odpuzování odpornou chutí (převážně hořké) nebo zápachem. U mnoha sloučenin se toxický efekt s odrazující chutí nebo zápachem kombinuje.

### 1.3.4 Rostlinné antifungální látky

Schopnost rostlin vzdorovat infekcím je dána vznikem a přítomností mnoha fyzikálních defenzivních bariér tvořených proteiny, lignifikací, voskovou kutikulou apod. Vyšší rostliny dále často syntetizují sekundární metabolity na obranu proti mikrobiálním infekcím a houbám. Tyto látky jsou často vylučovány na povrch pletiv, kde inhibují schopnost patogenů se množit, a dále i uvnitř pletiv, kde mohou bránit šíření infekce.

Je obvyklé, že takové defenzivní bariéry se neúčastní pouze jedna látka, ale celý komplex sloučenin. I u těchto látek platí, že jejich syntéza se může s napadením rostliny patogenem zvyšovat, tyto látky se v okamžiku napadení mohou tvořit *de novo*, nebo že k jejich účinku je třeba metabolické aktivace. Tyto látky se také kumulují v místě infekce. V okamžiku potlačení infekce také tyto látky obvykle podléhají metabolizaci, takže už krátce po potlačení infekce jsou jejich koncentrace opět poměrně nízké. Někdy je celá situace s detekcí takových látek zkomplikovaná také tím, že i patogen při infekci produkuje nějaké metabolity, které se mohou šířit rostlinnými pletivy. Takové látky, tzv. mykotoxiny, pak mohou být toxické nejen pro rostlinu, ale také pro konzumenta, pokud se nacházejí v pojídaných částech (plody, semena).

### **1.3.5 Rostlinné látky s aktivitou živočišných hormonů**

Objev hmyzích hormonů v rostlinných pletivech byl jednou z nejzajímavějších věcí fytochemických výzkumů. Poměrně vysoká množství takzvaných fytoekdysonů, steroidních hormonů hmyzu, byla nalezená např. u tisu (*Taxus baccata*) nebo osladiče (*Polypodium vulgare*), což dokazuje, že tyto látky jsou rozšířeny i v poměrně příbuzensky vzdálených rostlinách. Zarážející je také vysoká aktivita těchto látek, které vykazují až 20× vyšší účinnost než podobné zooekdysony.

Jinou skupinou jsou tzv. hmyzí juvenilní hormony. Z rostlin byly izolovány terpenoidní sloučeniny schopné mechanismem juvenilního hormonu zasahovat zejména do finální části přeměny.

Další zajímavé propojení mezi rostlinami a živočichy je možné najít u látek s estrogení aktivitou. Látky hlavně typu stilbenů a isoflavonoidů mají tuto aktivitu poměrně významnou a mohou vyvolat aborty u savců.



## **2 Metody izolace rostlinných sekundárních metabolitů**

V této kapitole budou probrány různé fytochemické postupy pro izolaci sekundárních metabolitů. Porozumění metodě a správný výběr extrakční a separační metody je pro fytochemika důležitá věc a neměla by být podceňována. Nesprávnou aplikací dochází jak k ekonomickým, tak časovým ztrátám a zpracováváný materiál může být v nejhorším případě zcela znehodnocen.

### ***2.1 Základní přístupy a fytochemická literatura***

První věcí, kterou fytochemik před extrakcí a separací musí udělat, je stanovit si, za jakým účelem chce sekundární metabolity z rostlinného materiálu izolovat. Někdy je třeba získat velká množství materiálu pro paralelní testy biologické nebo farmakologické aktivity, případně pro parciální syntézu, jindy je třeba zkoumat extrakt pro jeho počáteční slibnou biologickou aktivitu, jindy je nutno získat čisté látky pro stanovení struktury nebo provedení chemotaxonomické studie. Vždy je poměrně velký rozdíl mezi fytochemickými přístupy k daným tématům a pro každý účel jsou vhodné jiné postupy.

Jako první je třeba provést zhodnocení materiálu podle dostupných informací. Nejvíce vědomostí obvykle získáme studiem specifické fytochemické literatury. Existuje obvykle poměrně široké spektrum pramenů, které lze zkoumat. V současnosti, v době internetu, je nejjednodušší vyhledávat literaturu prostřednictvím elektronických databází. Záleží ovšem na přístupu institucí, které obvykle databáze platí. Web of Knowledge a Scifinder pokrývají poměrně širokou oblast časopisů, ovšem ne vždy s plným přístupem k textu. Pro plné texty je možno využít Sciencedirect, stránky časopisů Americké chemické společnosti ([acs.pubs.org](http://acs.pubs.org)), stránky nakladatelství Elsevier a nebo Springer-Verlag. Opět ale platí jistá omezení, protože ne všechny zdroje jsou přístupné volně a informace je třeba platit. Jednotlivá vědecká periodika jsou obvykle tematicky vyhraněná. V oblasti fytochemie vychází, obvykle měsíčně, několik zásadních periodik. Periodika, ve kterých najdete informace o izolacích a případně biologických aktivitách přírodních látek: *Journal of Natural Products*, *Phytochemistry*, *Planta Medica*, *Phytochemistry Letters* a *Fitoterapia*. V těchto časopisech najdete pravděpodobně nejzajímavější informace týkající se metodologie izolace, identifikace a biologické aktivity, a

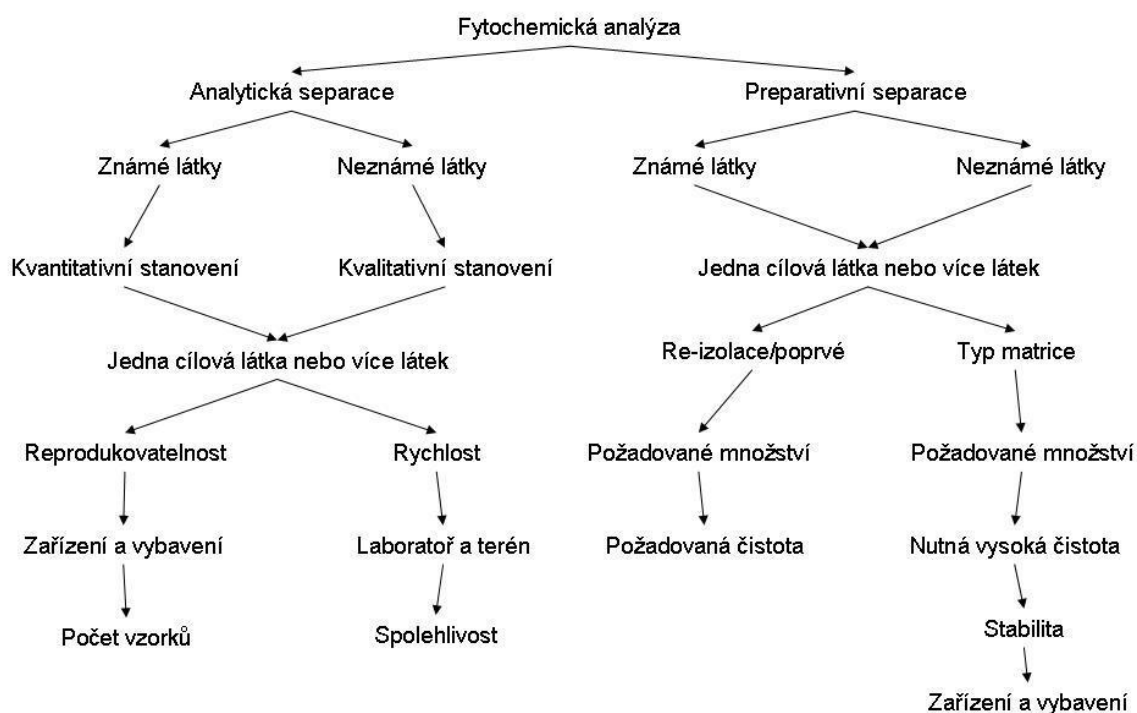
to v experimentálních sekcích článků. Základní chromatografické separace přírodních látek jsou obvykle publikovány v *Journal of Chromatography A/B*, *Journal of Liquid Chromatography* a *Chromatographia*. Další informace je také možno nalézt např. v *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Food Chemistry and Toxicology* nebo *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Etnofarmakologické výzkumy publikuje specializovaný *Journal of Ethnopharmacology*.

Existuje samozřejmě také celá řada specializovaných monografií týkajících se např. různých biosyntetických skupin sekundárních metabolitů. Příkladem mohou být *Modern Methods of Plant Analysis*, *Studies in Natural Products Chemistry*, *Natural Products Reports* a podobné.

Ke studiu literatury je také potřeba přistupovat se zdravou kritikou. Přesto, že práce publikované v literatuře jsou podrobovány poměrně důkladnému recenznímu řízení, může se stát, že publikované experimenty nebyly popsány dokonale. Proto by data a metody přijaté z literatury neměly být aplikovány bez ověření na malém množství vzorku.

Pro izolace z rostlinného materiálu je tedy nutné definovat svůj cíl a podle něj se pokusit vytvořit protokol postupu. Podle možností je nutné získat informace o fyzikálních a chemických vlastnostech potenciálně izolovaných látek, a také o tzv. matici, která tyto látky obsahuje. Je potřeba znát polaritu izolovaných látek, což je klíčový faktor pro extrakce a různé chromatografické separace. Je dobré vědět o přítomnosti bazických nebo kyselých funkčních skupin, což nám dá představu o ionizaci látek. Např. bazické jsou látky díky přítomnosti amino-skupiny, a jsou v kyselém prostředí schopné tvořit soli (typické pro alkaloidy). Další informace, např. schopnost absorbovat ultrafialové nebo viditelné záření, může být užitečná pro detekci látek. Je potřeba odhadnout přítomnost labilních funkčních skupin, které mohou způsobit nestabilitu a rozklad látek za podmínek extrakce a separace. Rostlinná matrice, ze které jsou látky izolovány, může obsahovat nežádoucí nebo rušivé složky. Tyto základní a velmi užitečné informace je možno pečlivým studiem literatury, aplikací znalostí organické chemie a zkušeností získat. Následující schéma (Obr. 5) pak představuje hierarchii problémů a otázek, které by měli být řešeny ještě před samotným experimentem. Je nutno stanovit priority podle potřeb analýzy. Je třeba volit mezi preparativním nebo pouze analytickým zpracováním vzorku. Metody vhodné pro kvalitativní analýzu složité směsi sekundárních metabolitů nemusí být dostatečně účinné a vhodné pro izolaci většího množství látek, typickým příkladem může být tenkovrstvá chromatografie. Některé metody mohou vyžadovat zařízení v terénu nedostupné. Rozhodování o volbě metody a zpracování vzorku ovlivňuje úroveň znalostí o složení vzorku, počet cílových

produktů, požadované množství, čistota, vybavení laboratoře atd. Odlišný přístup vyžaduje zpracování vzorku po stránce kvantitativní a kvalitativní analýzy, a také potřeba rychlého a rutinního zpracování většího počtu vzorků vyžaduje jiný přístup než práce s unikátním, obtížně získatelným materiálem určeným pro izolaci nových sloučenin. Požadovaný stupeň čistoty izolované látky je jedním z nejdůležitějších faktorů. Mezi dosaženým stupněm čistoty a vynaloženou námahou neexistuje lineární vztah. Obvykle je poměrně jednoduché začít se surovým materiálem a eliminovat z něj ½ až ¾ „nečistot“, ale může být problém odstranění menšinových látek pro dosažení čistoty výsledného produktu 99,5 nebo 99,9 %. Stejný vztah pak je mezi čistotou a výsledným množstvím izolované látky. Stejně jako chemická reakce nemá izolace 100% výtěžek. Ke ztrátám dochází na všech úrovních izolace a pro získání velmi čistého produktu je někdy nutné obětovat velkou většinu zpracovávaného materiálu. Důležité je také vyzkoušet si postup na malém reprezentativním množství vzorku. V průběhu experimentu může dojít k chybě, ne všechny části experimentu se zdaří tak, jak potřebujeme, a neuvážené použití celého množství materiálu může způsobit výrazné problémy a škody.



Obr. 5: Důležité prvky fytochemické analýzy

## **2.2 Výběr a příprava rostlinného materiálu**

Každý typ fytochemického průzkumu vyžaduje určení strategie pro sběr rostlinného materiálu. Předpokládá se, že 20-30 % z 250 000-500 000 druhů rostlin bylo nějakým způsobem podrobena fytochemickému a farmakologickému výzkumu. Přesné informace nelze ovšem zjistit, a ještě nepřesnější jsou údaje o testech rozličných biologických aktivit rostlinných extraktů. Je to jednak proto, že farmaceutické společnosti často z důvodů ochrany údajů nezveřejňují svůj výzkum, dále také proto, že pouze část akademického výzkumu dosáhne publikování. Vědecké časopisy také velmi málo zveřejňují údaje o re-izolacích známých látek z nových zdrojů nebo negativní výsledky (žádná nebo malá aktivita v testech aktivity). Fytochemické a farmakologické databáze jsou na publikovaných pracích závislé a značná část vědeckých výsledků se tak ke zveřejnění nedostane. Je proto možné, že mnoho vědeckých institucí marní čas prací na již (možná i opakovaně) provedených experimentech.

Klíčovou otázkou je proto výběr rostliny. Pro selekci je možno použít mnoho kritérií: náhodný výběr, výběr na základě etnobotanických nebo chemotaxonomických informací, výběr na základě geografických parametrů. Většina výběrů rostlin proto vyžaduje spolupráci botaniků nebo etnobotaniků a fytochemiků a dále přístupy, které v syntetické chemii nejsou obvyklé.

### **2.2.1 Náhodný výběr**

Je velmi obtížné provést náhodný výběr rostlin pro fytochemickou analýzu. Například to může být země původu nebo lokalita. Jednou z metod užívaných při fytochemickém výzkumu velkých firem je náhodný výběr rostlin z jednoho prostředí, vytvoření extraktů a pak jejich podrobení sérii biologických testů. V posledních letech je věnována zvýšená pozornost například oblastem deštných pralesů ohrožených civilizací. Tato místa jsou cílem mnoha bioprospektivních studií, protože obsahují množství mizejících rostlinných druhů dosud fytochemicky neprozkoumaných. Rostliny z těchto oblastí jsou vybírány náhodně pro nedostatek etnobotanických informací.

Takový náhodný výběr pak potřebuje také velmi široké spektrum testů biologické aktivity. Jedním z pilotních programů tohoto typu byl screening cytotoxické aktivity

prováděný v USA organizací NCI (National Cancer Institute). Z tohoto programu vzešly například taxol nebo kamptothecin. Statistika tohoto programu pak odhalila, že pravděpodobnost odhalení protinádorového léčiva, které se uplatní na trhu je přibližně 1:8000, v porovnání s 1:10000 u syntetických látek. Je však třeba poznamenat, že další programy, které byly prováděny na základě náhodného výběru rostlinných zdrojů, byly úspěšné méně.

## 2.2.2 Využití etnobotanických informací

Etnobotanický výzkum přináší celou řadu užitečných informací pro fytochemický výzkum. Tato cesta přinesla celou řadu úspěchů. Statistické odhady říkají, že okolo tří čtvrtin biologicky aktivních přírodních látek bylo objeveno pomocí etnobotanického výzkumu. Je zajímavé, že identifikovaný biologický účinek není vždy ve shodě s původním etnobotanickým použitím rostliny. Například *Catharanthus roseus* byl původně studován pro antidiabetickou aktivitu a z něj izolované sloučeniny vinkristin a vinblastin jsou v současnosti používány jako protinádorová léčiva.

Etnobotanické výzkumy zahrnují tři hlavní kroky: 1. je nutno získat základní informace od původních uživatelů rostlin, 2. tyto informace musejí být kriticky posouzeny kvůli identifikaci a zjištění intenzity potenciálních aktivit, 3. poslední fáze zahrnuje sběr rostlin, následující izolaci látek a testování jejich biologické aktivity.

Shromažďování etnobotanických informací a jejich posouzení je komplexní proces. Pro malé organizace nebo univerzitní týmy je často příliš nákladný. Je třeba financovat botaniky, etnobotaniky, výzkum v terénu, a to po poměrně dlouhou dobu nutnou ke shromáždění informací. Teprve poté mohou přijít na řadu fytochemici a farmakologové.

Shromažďování informací je komplikované a kvalita informací závisí na mnoha faktorech. Například závisí na věku poskytovatele, osobní zkušenosti, vzdělání a podobně. Je potřeba také zvolit nějaké kritérium, které označí rostlinu za biologicky aktivní. Jako zajímavé „markery“ biologické aktivity byly označeny například antifungální aktivita nebo antivirální aktivita. Dalším problémem je etnobotanický způsob použití, například vodné extrakty rostlin často vykazují jistou antivirální aktivitu (přítomnost polyfenolů), ale tato aktivita není selektivní a extrakty se nehodí pro vývoj léků. Mnoho společností proto v současnosti provádí různé předseparační kroky s cílem odstranit takové nesespecificky aktivní polyfenoly.

### 2.2.3 Využití chemotaxonomických informací

Chemotaxonomie využívá sekundární metabolity k výzkumu a potvrzení fylogenetického příbuzenství rostlin. Diverzita v produkci sekundárních metabolitů souvisí s postavením rostliny v rostlinné říši. Znalost o zařazení rostliny do rodu nebo čeledi může pomoci předpovědět spektrum látek, které by z rostliny mohly být izolovány. Fytochemické studie však ukázaly, že některé látky jsou přítomné i v několika rodech nebo čeledích.

Taxonomické informace jsou pak užitečné v případě, že z jedné rostliny byla izolována zajímavá bioaktivní látka, a další příbuzné rostliny mohou poskytnout více aktivní analogy. Pro farmaceutické společnosti je typické, že aktivní látka je okamžitě poskytnuta organickým chemikům pro syntézu aktivnějších obměn. Může být účinnější a levnější před syntézou podrobit extrakty intenzivní chromatografické separaci a pokusit se deriváty látky izolovat.

### 2.2.4 Sběr a sušení

Je velký rozdíl mezi sběrem jednotlivých rostlin pro výzkumné účely a sběrem ve velkém pro využití ve fytoterapii. Pro základní fytochemický výzkum je třeba podstatně menší množství materiálu, obvyklý je zvláště v prvních fázích výzkumu volný sběr v přírodě.

Pro fytoterapeutické použití jsou v současnosti léčivé rostliny kulturně pěstovány. Je to výhodnější z hlediska výtěžnosti produkce a také standardnosti obsahu sekundárních metabolitů. Pro pěstování rostlin je potřeba postupovat uváženě: správně vybrat pozemek, pěstovaný kultivar a dobu sběru. Jsou pěstovány zejména kultivary s vysokou odolností proti plísním, škůdcům, mrazu, suchu a podobně. Hlavní roli zde hrají ekonomické aspekty pěstování.

Doba sběru hraje v obsahu sekundárních metabolitů významnou úlohu. Koncentrace sekundárních metabolitů se mění během ročního období, během životních period rostliny i během denního cyklu. Příkladem může být obsah mentolu v mátě, který je vyšší ve starších rostlinách, zatímco mladší rostliny obsahují spíše prekurzory. Např. kafr se získává až ze 40-ti letých stromů. V průběhu roku obsah látek také kolísá. Podzemní části sbíráme obvykle na podzim, semena a plody v době zralosti, jiné nadzemní části rostlin v době květu. Variabilita obsahu látek v rostlinách záleží na střídání světla a tmy, na teplotě a na vlhkosti.

Jak pro terapeutické použití, tak pro výzkum je třeba respektovat jisté zásady sběru a zpracování materiálu. Čerstvé rostliny jsou ve fytoterapii používány z praktických důvodů

výjimečně, obvykle v homeopatii. Někdy jsou čerstvé rostliny používány pro přímou přípravu extraktů z důvodů vysoké energetické náročnosti sušení. Ve výzkumu je použití čerstvého materiálu častější. Sušení je nejrychlejší a nejekonomičtější způsob konzervace. Tím, že materiál zbavíme vody, zabráníme metabolickým procesům, které by mohly vést ke znehodnocení obsahových látek. Sušený materiál je dále nenáchylný k invazi mikroorganismů a plísní. Správné sušení zanechá obsahové látky v nezměněném množství. Při konzervaci je třeba postupovat důrazně a rychle. Primární je zastavení metabolických pochodů v materiálu kvůli nežádoucím změnám obsahových látek. To je provedeno působením par ethanolu na materiál, případně zmrazením. V některých případech se takové zastavení metabolismu neprovádí, protože dochází k tzv. postmortální syntéze. Žádoucí látky vznikají až po sběru materiálu, např. fermentací. Příkladem jsou náprstník, nebo černý čaj. Pokud je rostlinný materiál nutno nějakým způsobem konzervovat, obvykle se to provádí sušením nebo speciálně lyofilizací.

### 3 Rozklad látek a tvorba artefaktů

Jedním z problémů, které fytochemiky doprovázejí, je rozklad sekundárních metabolitů a formování tzv. artefaktů. Artefakt je definovaný jako sloučenina, která byla izolovaná a identifikována, ale která v originálním materiálu nebyla přítomná nebo byla přítomná pouze ve stopových množstvích. Svým způsobem každý proces, ke kterému dochází po sběru materiálu (tzn. jak vnitřní – metabolismus rostlin, tak vnější – extrakce, separace, analýza), může přispět k tvorbě artefaktů. Podle toho je možno rozlišit různé typy artefaktů:

1. Dobře definované artefakty vznikající chemickou konverzí, jako např. hydrolýzou, oxidací, dehydratací, isomerizací nebo cyklizací látek původně přítomných v rostlinném materiálu spontánně bez přičinění použitých chemikálií. Zde je poměrně obtížné látky mezi artefakty zařadit, vznikají v podstatě okamžitě po sběru a už při nejjednodušším zpracování.

2. Dobře definované artefakty vznikající reakcí genuinních (původních) látek s materiálem použitým při zpracování rostliny (např. reakce rozpouštědel nebo nečistot přítomných v chromatografickém médiu). Pokud jsou tyto látky popsány, obvykle je poměrně snadné je zařadit mezi artefakty. Příkladem je třeba reakce terciárních aminů s dichlorethanem. Jiným příkladem je tvorba chamazulenu ze seskviterpenických laktonů při destilaci květů heřmánku s vodní parou.

3. Často je možno identifikovat cizí látky „zavlečené“ do materiálu získaného z rostliny během extrakcí nebo separací (nečistoty z použitých rozpouštědel a chromatografického materiálu), kontaminace houbami, plísněmi nebo jinými mikroorganismy.

4. Špatně charakterizovatelné artefakty typu polymerů vznikající fotodegradací, oxidací nebo termální degradací. Jsou obvykle polární povahy a tmavé barvy, nerozpustné v organických rozpouštědlech nebo ve vodě, často snižující výtěžnost chromatografických separací.

V materiálu se samozřejmě mohou vyskytovat všechny typy výše popsaných artefaktů současně, což jejich identifikaci ztěžuje. Proto je třeba během veškerého zpracování rostlinného materiálu, separace látek a analýzy dbát na opatrnost, pokud možno neužívat agresivní postupy, používat re-destilovaná rozpouštědla a kvalitní chromatografické sorbenty. Materiál je třeba skladovat v temnu a chladu (pokud možno v lednici). V případě, že dojde k izolaci „podezřelé“ látky (chemotaxonomicky neobvyklá sloučenina, složitá látka v malém množství apod.), je třeba pokusit se proces izolace opakovat jiným způsobem pro potvrzení výsledku, a prověřit všechny postupy včetně identifikace materiálu.



## 4 Extrakce

### 4.1.1 Úvod

Pouze velmi vzácně mohou být rostliny analyzovány z hlediska obsahových látek přímo bez nějaké separační nebo extrakční metody, která by tyto látky izolovala. Může se stát, že obsahová látka ve velké koncentraci krystalizuje např. přímo z nějaké rostlinné pryskyřice nebo jiného exudátu, ale to je poměrně vzácný případ. Je obvyklé, že je třeba nejméně jednoho kroku extrakce a následně purifikace (přečištění vzorku před vlastní analýzou). Extrakce slouží jednak k izolaci sekundárních látek, které chceme analyzovat, od vysokomolekulárního balastu, který tvoří většinu matrice rostlinného materiálu, a následuje obvykle separace cílové sloučeniny od nízkomolekulárních primárních a sekundárních metabolitů, které by v dalších krocích rušily analýzu. Balastní látky jsou tvořeny směsí celulosy, hemicelulosy, ligninu apod. a obvykle tvoří většinu sušiny získané zpracováním rostlinného materiálu. Tyto obvykle nejsou v extrakčních médiích rozpustné. Mezi rozpustný balast patří různé primární metabolity, chlorofyl, pektin, škrob, glykoproteiny a soli. Podíl sekundárních metabolitů na rostlinném materiálu obvykle není větší než 10 %, ale samozřejmě závisí na rostlinném druhu a části rostliny.

Sekundární látky jsou v rostlinách obvykle různým způsobem vázány nebo je jejich přítomnost maskována, a to extrakční procedury ztěžuje. Interakci mezi sekundárními metabolity a rostlinným materiálem můžeme nazývat „matrix“ efekt a ten může být tvořen jak chemickými, tak fyzikálními bariérami. Pokud chceme sekundární metabolity z rostliny úspěšně extrahovat, musíme vazby v matici rostliny přerušit a bariéry překonat. Příkladem porušení matrix efektu může být extrakce alkaloidu strychninu ze semen *Strychnos nux-vomica*. Semena této rostliny jsou velmi tvrdá a pokrytá trichomy s voskovitou kutikulou. Alkaloidy jako strychnin je možno lehce extrahovat zředěnou kyselinou sírovou, ale toto medium se nedostane do velmi hutných a tvrdých semen, navíc voskovitá kutikula a vysoký obsah tuku zabrání proniknutí do materiálu. Proto je nutno nejprve rozrušit fyzikální bariéru rozdrčením semen, a pak odtučněním, např. petroletherem nebo hexanem. Po těchto procedurách už můžeme aplikovat zředěnou kyselinu sírovou pro poměrně selektivní extrakci alkaloidů. Velká část rušivých lipofilních sloučenin přejde do nepolárního hexanu, kyselina sírová jako velmi hydrofilní medium extrahuje alkaloidy a další část středně polárních látek

zůstane v rozdrčených semenech. Pokud je následně potřeba, je tyto látky možno vyextrahovat methanolem nebo ethyl-acetátem.

V první fázi extrakčního procesu se rozpustí poměrně rychle volné molekuly sekundárních látek. Jsou to ty, které jsou na povrchu nebo blízko povrchu materiálu, kam rozpouštědlo snadno pronikne. V další fázi už je třeba, aby rozpouštědlo proniklo hluboko do materiálu a aby došlo k rozrušení fyzikálně-chemické bariéry blokující uvolnění látek (prolomení matrix efektu). Rozpouštědlo může extrakci usnadnit různými způsoby. Může dojít k nabobtnání materiálu, zvětšení pórů a usnadnění průchodu látek. Ve třetí fázi pak už pouze dochází k rozpouštění látek v extrakčním médiu a limitujícím faktorem je pouze difúze. Matrix efekt a proces difuze výrazně ovlivňují výtěžnost extrakce. Difúzi lze popsat pomocí I. Fickova difúzního zákona:

$$dn/dt = -(D \times A/h) \times (c_0 - c) \quad (1)$$

$dn/dt$ .....změna látkového množství za časovou jednotku (rychlost difúze)

$D$ .....difúzní koeficient

$A$ .....difúzní plocha

$h$ .....tloušťka difúzní vrstvy

$(c_0 - c)$ .....koncentrační spád

Všechny parametry difúzního procesu lze nějakým způsobem ovlivnit. Cílem je co největší přesun hmoty za co nejmenší časovou jednotku.

Rychlost difúze je samozřejmě ovlivněna také rozpustností extrahovaných látek v použitém rozpouštědle.

#### **4.1.1.1 Difúzní koeficient**

Difúzní koeficient je závislý na charakteru extrahovaných látek a na charakteru extrakčního média (rozpouštědla). Správnou volbou extrakčního média lze výtěžnost extrakce výrazně vylepšit. Další parametr významně ovlivňující difúzní koeficient je teplota. S rostoucí teplotou difúzní koeficient roste a difúze se tak zrychluje.

#### 4.1.1.2 Difúzní plocha

Plocha, na které probíhá difuze, by měla být co největší. Plochu nejvíce ovlivníme rozdrobením drogy na co nejmenší kousky. Čím větší stupeň rozdrobení tím větší povrch drogy je přístupný procesu extrakce. Stupeň rozdrobení je možno měřit podle použité soustavy sít, u kterých jsou rozměry ok sítí definovány lékopisem.

Pravidlo, že nejmenější částice jsou nejvhodnější pro extrakci, neplatí úplně. V okamžiku, kdy je materiál rozpráškovaný na jemný prach, dojde při dispergování v extrakčním mediu k sedimentaci a paradoxně k tvorbě jakéhosi bahna, kterým opět rozpouštědlo proniká nesnadno. Velmi jemné částice také rychle ucpou filtry při odebírání extraktu. Je proto třeba stupeň rozdrobení a velikost částic volit kompromisně, v závislosti na dalších extrakčních parametrech.

#### 4.1.1.3 Tloušťka difúzní vrstvy a koncentrační spád

Čím menší difúzní vrstva, tím rychlejší difúze. Velikost difúzní vrstvy je možno zmenšit rozdrobněním materiálu. Koncentrační spád naopak musí být pro rychlou difúzi a tím i extrakci co největší. V praxi ho můžeme ovlivnit velmi jednoduše, a to mícháním. Pohyb extrakčního media vůči materiálu rozruší difúzní vrstvu, koncentrační gradient se zvýší a difúze, a tím i extrakce, se urychlí. Během extrakce klesá koncentrace látek v extrahovaném materiálu, a roste jejich koncentrace v extraktu, čímž dochází ke snížení koncentračního gradientu. Tento jev lze pozorovat hlavně u tzv. periodických extrakčních metod (jako je macerace) a lze ho řešit využitím semi-kontinuálních nebo kontinuálních metod, jak bude popsáno dále.

#### 4.1.2 Typy extrakce

V principu je možno použít 4 extrakční média: 1. kapaliny, 2. plyny, 3. vodní páru a 4. superkritické kapaliny. V současnosti do popředí vstupuje ještě pátá možnost, a to je tzv. extrakce pevnou fází. První dva typy a svým způsobem i extrakce pevnou fází využívají v podstatě skutečného fyzikálního principu rozpouštění, pára a plyny jsou využívány spíše

jako nosné nebo hnací plyny k extrakci a transportu těkavých složek materiálu. Každé z používaných extrakčních médií má své výhody a nevýhody a používá se za různých podmínek, které je třeba správně zvolit. Technicky můžeme odlišit několik typů extrakcí. Podle vztahu extrahovaného materiálu a rozpouštědla dělíme extrakce na periodické a kontinuální.

Další části textu se budou zabývat jednotlivými typy extrakce včetně popisu typických příkladů použití.

### 4.1.3 Extrakce kapalinou

Extrakce kapalinami jsou zřejmě nejběžnějšími používanými technikami. Extrakce kapalinami lze podle účelu rozdělit na dva způsoby: 1. úplná extrakce, 2. selektivní extrakce. Úplná extrakce je využívána k získání pokud možno všech extraktivních látek z materiálu bez ohledu na jejich chemický charakter nebo biologickou aktivitu. Obvykle se zde snažíme dosáhnout celkového maximálního výtěžku. Selektivní extrakce na rozdíl od totální nedokáže extrahovat maximální množství látek, získáme užší, jistým způsobem ohraničenou skupinu látek. Extrakční médium zde dokáže rozpouštět pouze úzkou skupinu látek a tím získáme buď pouze cílové analyty, nebo pouze nečistoty, které chceme z materiálu odstranit. Typickým příkladem takového selektivního přístupu je už dříve zmiňovaná extrakce strychninu, kde nejprve selektivně extrahujeme lipofilní tuky a vosky (odstraníme bariéry) a teprve následně opět selektivně extrahujeme alkaloidy zředěnou kyselinou sírovou. Jiným příkladem je odstranění velkých množství chlorofylu při extrakci nadzemních částí rostlin.

Pro výběr tzv. úplného nebo selektivního extrakčního média existuje jednoduché chemické pravidlo: podobné se rozpouští v podobném. U extrakcí organických látek, jako jsou sekundární metabolity, obvykle vybíráme z poměrně omezeného množství rozpouštědel, které jsou podle své polaritě sestupně nebo vzestupně seřazeny v takzvané eluotropní řadě. Eluotropní řada představuje rozpouštědla seřazená podle vzestupné polaritě. Nepochopitelně rozpouštědla jsou představována především jednoduchými alkany (heptan, hexan), pokračuje přes chlorované uhlovodíky (chloroform, dichlorethan), a dále přes polárnější rozpouštědla, jako je aceton a ethyl-acetát. Na polárním konci eluotropní řady jsou pak alkoholy (ethanol, methanol) a voda. Platí, že polární (hydrofilní) látky se dobře rozpouští v polárních rozpouštědlech, nepolární (lipofilní) látky v nepolárních rozpouštědlech. Hlavním vodítkem pro výběr je pak selektivita rozpouštědla. Pro tzv. totální extrakci vybíráme rozpouštědla

z polárního konce eluotropní řady, obvykle jsou to vodné roztoky methanolu nebo ethanolu (70-80%). Tato rozpouštědla jsou velmi „silná“, extrahují rychle a snadno v podstatě látky jak polární, tak nepolární, z toho ale vyplývá jejich malá selektivita. U selektivní extrakce postupujeme od nepolárního konce eluotropní řady, kde jsou hlavně různé nasycené uhlovodíky. Tyto látky extrahují selektivně pouze látky nepolární, tato rozpouštědla mají tedy vysokou selektivitu, ale efektivita extrakce je podstatně nižší. Platí tedy, že schopnost rozpouštědla efektivně extrahovat roste od nepolárního k polárnímu, zatímco selektivita klesá. Poměrný skok směrem k větší selektivitě je znovu vidět mezi methanolem a vodou. Pro výběr nejvhodnějšího rozpouštědla pak obvykle platí jistý kompromis, je třeba vybrat rozpouštědlo, které je dostatečně silné, avšak nerozpouští kromě cílové látky příliš mnoho nečistot, tedy je dostatečně selektivní.

#### **4.1.3.1 Periodické extrakce**

Periodická extrakce je nejjednodušší, co se týká provedení a technického vybavení. Provádí se v dobře uzavřených nádobách minimalizujících ztráty extrakčního média odparem, pokud možno chráněných před světlem. Jednorázová vsádka materiálu se extrahuje daným množstvím extrakčního činidla po určitou dobu. Tento typ se nazývá macerace. Čas extrakce se podle potřeby může lišit od desítek minut po hodiny až dny. Je možno měnit i další parametry, např. poměr extrahovaného materiálu a vyluhovadla (obvykle 1:10), existuje možnost míchání, možné je měnit teplotu. Výtěžek extrakce ovlivňuje také obsah vody v extrahovaném materiálu. Typickým příkladem macerace a také možností ovlivnit tento pochod je příprava čaje.

Maceraci je také možno opakovat. Po určité době (obvykle 24 hodin) extrakt odebereme a dodáme vsádku nového rozpouštědla. Tímto postupem výrazně zvýšíme koncentrační gradient a extrakci urychlíme. Obvykle postup opakujeme třikrát nebo tolikrát, dokud vybraná detekční metoda ukáže nepřítomnost cílové extrahované látky v extraktu.

Pokud maceraci provedeme za zvýšené teploty, nazývá se digesce. Zvýšením teploty extrakci obvykle zkrátíme na desítky minut, ale snížíme tím selektivitu. Při laboratorní teplotě není nutno obávat se ztráty termolabilních sloučenin.

Hlavní výhody macerace jsou: velmi jednoduchá a levná metoda, nenáročná na laboratorní vybavení, v případě kvalitního nastavení procesu a dobré volbě rozpouštědla

poměrně účinná a selektivní. Nevýhodou je určitá časová náročnost, a nižší účinnost oproti dalším metodám (pokud nevyužijeme trvalého míchání nebo zahřívání).

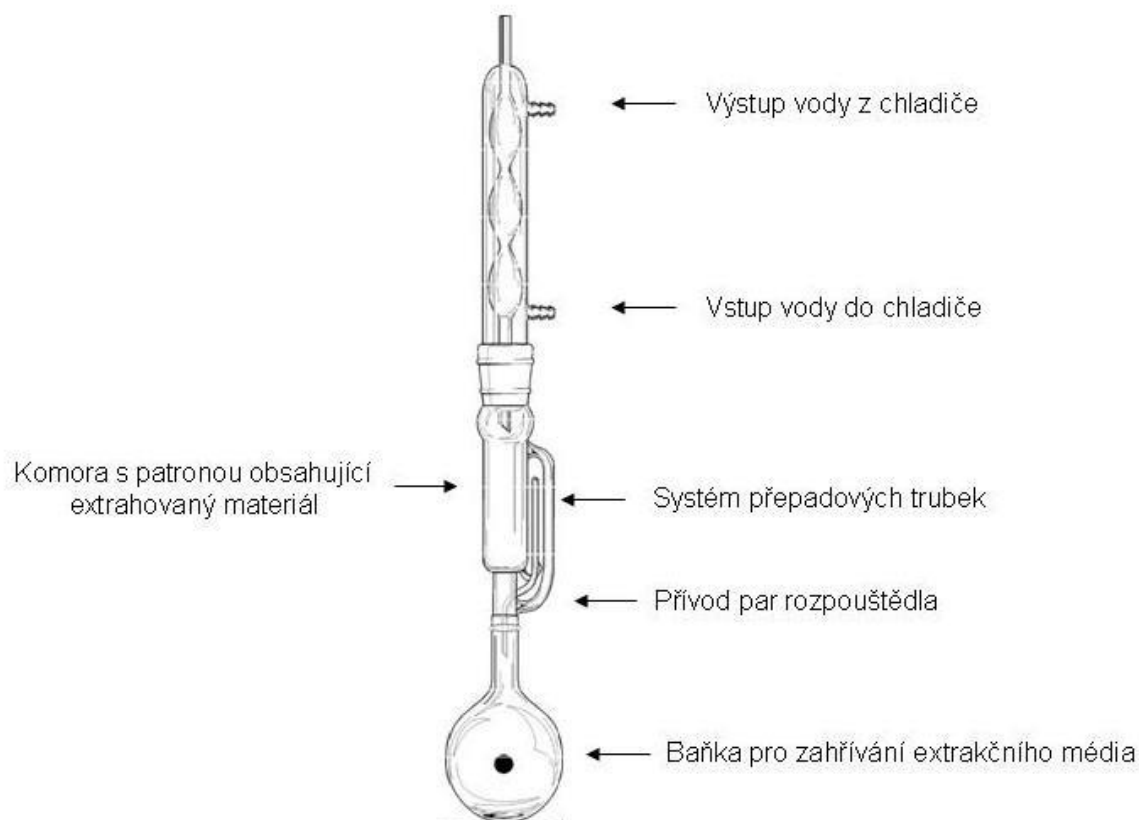
#### **4.1.3.2 Kontinuální extrakce**

Kontinuální extrakce je taková, při které do extraktoru vložíme jednorázovou dávku extrahovaného materiálu, a následně kontinuálně dodáváme neustále čerstvé rozpouštědlo. Typickým příkladem může být perkolace nebo Soxhletův extraktor.

Perkolátor je obvykle skleněná nebo kovová trubice, v dolní části s výpustí uzavřenou kohoutem. Tato trubice se naplní extrahovaným materiálem a materiál se nechá několik dní nasytit použitým extrakčním médiem (dojde k uvolnění vzduchových bublin a „homogenizaci“ materiálu). Shora se pak dodává rozpouštědlo, které vlivem gravitace materiálem prochází a extrahuje. Extrakce se provádí tak dlouho, dokud zvolená detekční analytická metoda ukazuje přítomnost cílových látek ve vytékajícím extraktu. U této metody je možno po ukončení extrakce jedním rozpouštědlem materiál vysušit a pokračovat dalším rozpouštědlem. Příkladem jednoduchého perkolátoru je překapávač kávy. Výhodou této metody je možnost kompletní extrakce a šetrnost této techniky k extrahovaným látkám. Extraktor však musí být pod dohledem pracovníka, extrakce je poměrně pomalá a je třeba velkých objemů extrakčního činidla.

Jinou variantou kontinuální extrakce je Soxhletův extraktor. Je to jednoduchá laboratorní pomůcka využívající opakovanou re-distilaci extrakčního media a jeho kontinuální přísun k jednorázové vsádce extrahovaného materiálu v uzavřeném systému. Schéma Soxhletova extraktoru najdete na obrázku 6. Extrahovaný materiál je vkládán do extrakční patrony (papírová nebo skleněná s fritou v dolní části). Extrakční médium se zahřívá a ve formě par prochází trubicí do chladiče, kde se kondenzuje a stéká na extrahovaný materiál. Po přeplnění extrakční komory extrakt stéká zpět do varné baňky, kde se odpařením zkoncentruje. Tento proces se v podstatě kontinuálně opakuje po libovolně dlouhou dobu. Tato metoda má opět svoje výhody a nevýhody. Výhodou je jistá možnost automatizace systému, použití poměrně malých objemů extrakčního media a tím získání koncentrovaných extraktů. Extrakce může být velmi důkladná a kvantitativní. Nevýhodou je nutnost zahřívání a chlazení, možnost termální dekompozice extrahovaných látek a limity v množství zpracovávané drogy (extraktor má omezený objem).

V současnosti jsou do praxe zaváděny také automatické extraktory typu perkolátoru, které obsahují několik ocelových patron, v kterých je možno extrahovat pod tlakem za zvýšené teploty, což umožňuje extrakci urychlit a zvýšit výtěžky. Spotřeba rozpouštědel se také výrazně snižuje.



Obr. 6: Soxhletův extraktor

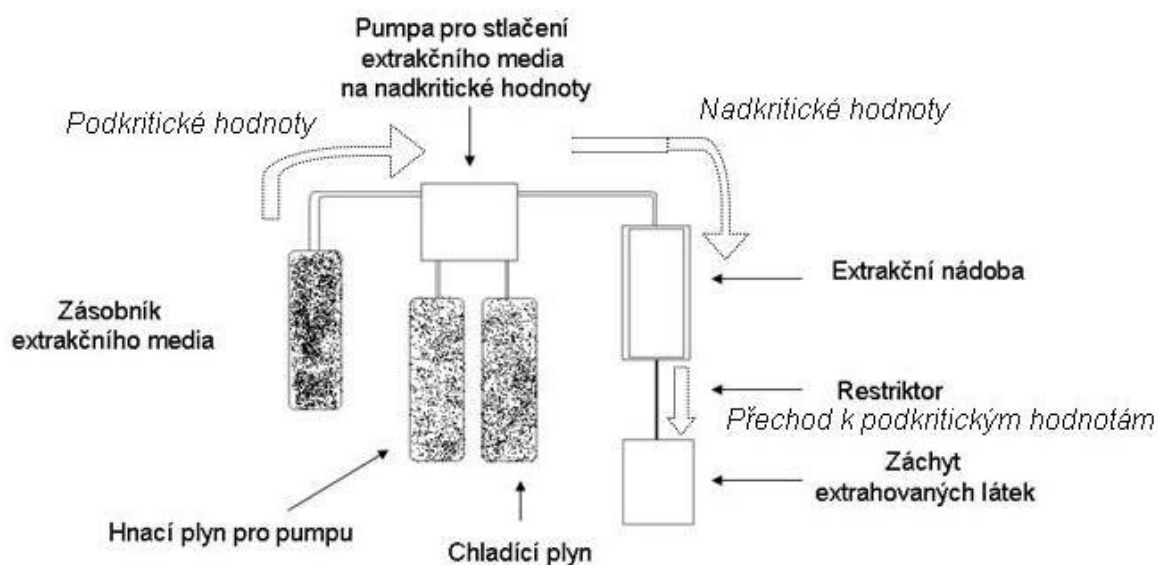
#### 4.1.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce je rychle se rozvíjející moderní metoda přípravy rostlinných extraktů využívající vlastností tzv. superkritických kapalin. Superkritické kapaliny jsou média s vlastnostmi jak kapalin, tak plynů. Vznikají za takových tlaků a teplot, když tyto překročí tzv. kritické hodnoty. Pro  $\text{CO}_2$ , což je zřejmě nejpoužívanější superkritické médium, platí kritická teplota  $t_c = 31\text{ }^\circ\text{C}$  a tlak  $p_c = 73$  atmosfér. Superkritické tekutiny mají některé vlastnosti blízké plynům a některé kapalinám. Jako kapaliny mají podobnou hustotu (o něco nižší) a schopnost solvace, tudíž schopnost rozpouštět. Difúzní koeficient však mají blízký plynům, což umožňuje rychlý přestup hmoty. Viskozita a povrchové napětí je

podstatně nižší než u kapaliny, což vede k dobrému prostupu extrahovaným materiálem. Z uvedeného vyplývá, že superkritická média kombinují to nejlepší z vlastností plynů a kapalin pro rychlou a efektivní extrakci. V minulosti byla tato metoda použitelná spíše průmyslově, ve velkých objemech, v současnosti expanduje v menším provedení i do fytochemických laboratoří.

Zařízení pro SFE je možno schematicky popsat následujícím způsobem (Obr. 7). Ze zásobníku (tlakové nádoby) je přiváděno extrakční médium do prostoru extrakce, kde se zahřívá a stlačuje na nadkritické hodnoty. Dále se přivádí do extrakční nádoby, kde je v patroně vložený extrahovaný materiál. Extrahovaný materiál se vkládá samostatně, nebo může být smíchaný s inertním materiálem pro lepší prostupnost a zvýšení extrakčního povrchu. Zde se může také dodávat methanol pro zvýšení polaritý extrakčního média. V extrakční nádobě je udržován vysoký tlak a teplota podle požadavků (obvykle 35-150 °C a 120-680 atm). Zde dochází k vlastní extrakci. Extrakce může být statická nebo dynamická. Statická je podobná maceraci (jednorázová vsádka materiálu i média). Dynamická je podobná perkolaci (jednorázová vsádka materiálu a kontinuální dodávání čerstvého extrakčního média s neustálým odvodem extraktu). Extrakční médium v superkritickém stavu, obohacené extrahovanými látkami, v přetlaku řízeně uniká z cely tzv. restriktorem. Restriktor je tenká kapilára o různé délce, která slouží v podstatě jako jednoduchý tlakový ventil umožňující expanzi superkritického média do atmosférického tlaku. Restriktorem extrakt proudí za postupného snižování tlaku do sběrné nádoby. Pokud superkritické médium za poklesu tlaku expanduje, prudce se ochlazuje a ztrácí svoje extrakční schopnosti. Na konci restriktoru už vychází ochlazený kapalný nebo plynný CO<sub>2</sub> (podle délky a průměru restriktoru) a směs extrahovaných látek odděleně. V záchytné nádobě je obvykle nějaké médium, kterým CO<sub>2</sub> s látkami probublává, látky se zde zachytávají a CO<sub>2</sub> uniká. Pro zachycení vyextrahovaných látek může být použito i pevné médium a tak je SFE kombinována s SPE (solid phase extraction, bude popsáno dále). V průmyslových provozech nebo u dokonalejších zařízení se superkritický CO<sub>2</sub> nechá expandovat jen na určitou úroveň, a následně se recykluje, protože největší provozní náklady představuje jeho opětovné získání a stlačení do nadkritického stavu.





Obr.7: Schematický náčrt zařízení pro SFE

Z výše popsaných charakteristik lze pochopit konkrétní výhody SFE oproti klasickým extrakčním metodám (protože pro superkritické extrakce se ve fytochemii nejčastěji používá  $\text{CO}_2$ , bude se následující popis vztahovat k němu). SFE je rychlá, a pokud používá  $\text{CO}_2$ , je velmi šetrná k životnímu prostředí. Při použití definovaných podmínek je také poměrně selektivní. Je to dáno hlavně tím, že změnou tlaku a teploty za nadkritickými hodnotami se mění hustota a tím také solvatace a dle polarit analytů schopnost rozpouštět. Změnami tlaku a teploty tak můžeme směs látek selektivně extrahovat.  $\text{CO}_2$  je nekorozivní a levný. Jsou zde samozřejmě i jisté nevýhody. Schopnost  $\text{CO}_2$  rozpouštět je sama o sobě poměrně nízká. Jako nepolární látka  $\text{CO}_2$  dokáže rozpouštět pouze nepolární sekundární metabolity, jako jsou vosky, tuky, silice, triterpeny a podobně. Polarita superkritického  $\text{CO}_2$  se dá zvýšit přidáním polárního rozpouštědla, jako je bezvodý methanol, do extrakční směsi. Tím se ovšem ztratí jedna z výhod metody, a to je nepoužívání klasických rozpouštědel. Problémy při extrakci mohou nastat, pokud je v materiálu přítomno skutečně velké množství nežádoucích nepolárních látek, jako například v listech chlorofyl. Tyto látky jsou extrahovány spolu s analyty, metoda se pak stává neselektivní. Nevýhodou metody je také poměrně vysoká cena zařízení, které je podstatně složitější než pro klasické extrakce a obvykle je také v laboratorním zařízení pro SFE možno zpracovávat pouze omezená množství materiálu.

Proces SF extrakce je možno kontrolovat podobně jako jiné extrakce pomocí různých analytických metod jako jsou TLC nebo HPLC s UV/Vis nebo jinou detekcí.

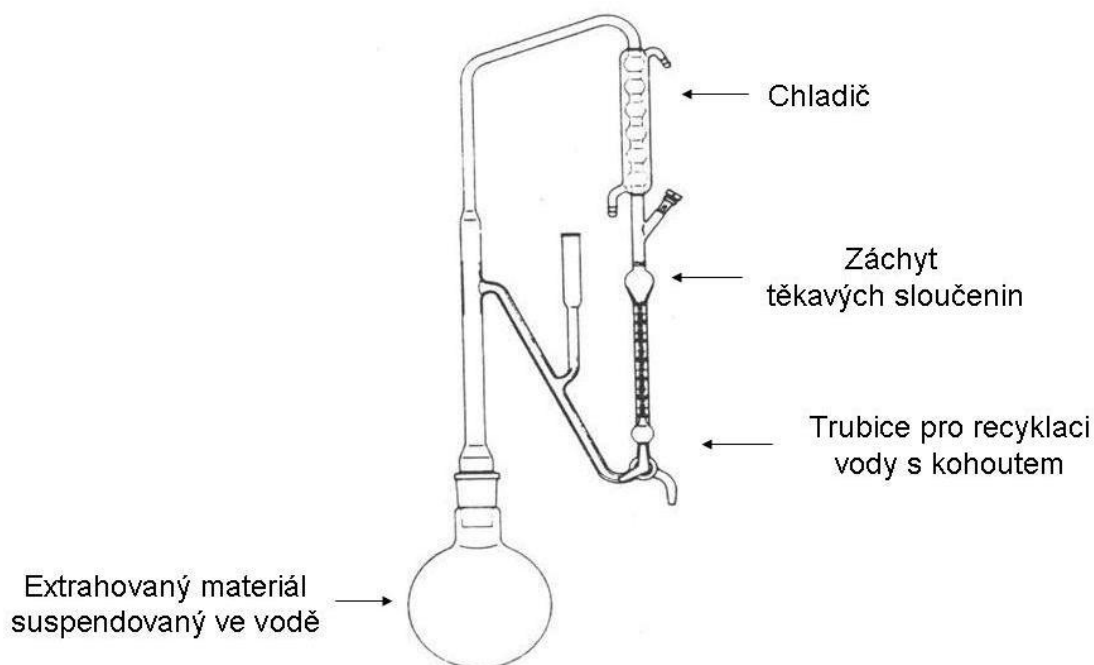
Příkladů použití SFE je celá řada. Výhodná je hlavně netoxičita, ekologická nezávadnost a šetrnost metody. Při použití CO<sub>2</sub> nezůstávají žádná rezidua ohrožující člověka nebo životní prostředí. Proto tato metoda získala široké využití v potravinářském průmyslu, ve farmacii a kosmetickém průmyslu a vůbec při výrobě produktů, které nějakým způsobem přicházejí do přímého styku s člověkem. Vlastnosti CO<sub>2</sub> jako nepolárního rozpouštědla metodu předurčily k extrakci nepolárních látek. Pomocí SFE se extrahují hořké látky z chmele (*Humulus lupulus*) jak pro pivovarnické účely, tak pro farmacii, vyrábí se bezkofeinová káva (a zároveň produkuje kofein), extrahují se vonné a chuťově výrazné silice pro aromaterapii, extrakty koření a podobně. Co se týká dalších přírodních látek, SFE se používá např. pro získání ginkolidů z *Gingko biloba*, lignanů *Schisandra chinensis*, flavonoidů, některých kumarinů a katechinů.

#### 4.1.5 Destilace s vodní parou

Destilace s vodní parou je jednou ze starších extrakčních technik. Je to metoda velmi selektivní a jednoduchá pro získávání ve vodě nerozpustných látek nepolárního charakteru. Je možno ji využít pro různý rostlinný materiál. Selektivita metody je dána tím, že jsou extrahovány pouze těkavé látky a získáváme tak jednoduché směsi. Extrakt je prostý všech netěkavých nepolárních látek, jakou jsou tuky, vosky nebo mastné kyseliny. Těkavé látky (nejčastěji složky silice) jsou v rostlinném materiálu obvykle přítomné ve velmi malých množstvích. Obvyklé koncentrace jsou nižší než 5 %, často méně než 1 %. Taková malá množství nejsou příliš vhodná pro použití jiných extrakcí, např. macerací kapalinou. Destilace s vodní parou je velmi jednoduchá metoda, protože je používán jednoduchý aparát a není potřeba žádný speciální krok předúpravy vzorku.

Princip destilace s vodní parou je založen na aplikaci Daltonova zákona: tlak par nad hladinou směsi dvou nemísitelných látek (zde těkavé sekundární metabolity a voda) je roven součtu jejich parciálních tlaků. Směs, kde je hlavní součástí voda, bude mít za normálního atmosférického tlaku bod varu 100 °C. Vypařování látek s vyšším bodem varu než má voda je tak usnadněno a například seskviterpeny, které mají bod varu okolo 300 °C, jsou touto metodou izolovány už při teplotě 100 °C. Existují dva postupy destilace s vodní parou, které se však principem metody neliší: 1. tzv. pravá destilace s vodní parou – zde je vodní pára připravována v generátoru, a následně je vháněna do rostlinného materiálu, 2. hydrodestilace – kde je pára vytvářena *in situ* vařením suspendovaného rostlinného materiálu ve vodě.

Zvláště druhý typ je populární v laboratorním měřítku, a je používán mnoha lékopisy pro kvantitativní stanovení silic v rostlinném materiálu. Aparát pro hydrodestilaci se nazývá Clavengerův aparát (Obr. 8.). Pravá destilace s vodní parou se používá spíše v organické chemii nebo pro průmyslové zpracování velkých množství materiálu.



Obr. 8: Clavengerův aparát

Při destilaci s vodní parou je důležité brát v potaz „matrix efekt“ a difúzní procesy. Pokud jsou těkavé látky lokalizovány na povrchu rostlinného materiálu (např. v trichomech, žlázkách apod.), hraje difúze větší roli a látky jsou destilovány rychle. Pokud jsou destilované látky uloženy hlouběji v materiálu (jako u semen nebo kůry apod.), rychlost destilace je ovlivněná spíše matrix efektem než difúzí. Je to způsobeno tím, že těkavé nepolární látky jsou ve vodě nerozpustné nebo téměř nerozpustné a snadno zůstávají asociované s dalšími látkami, jako jsou tuky a podobně, což znesnadňuje difúzi a pohyb směrem k povrchu.

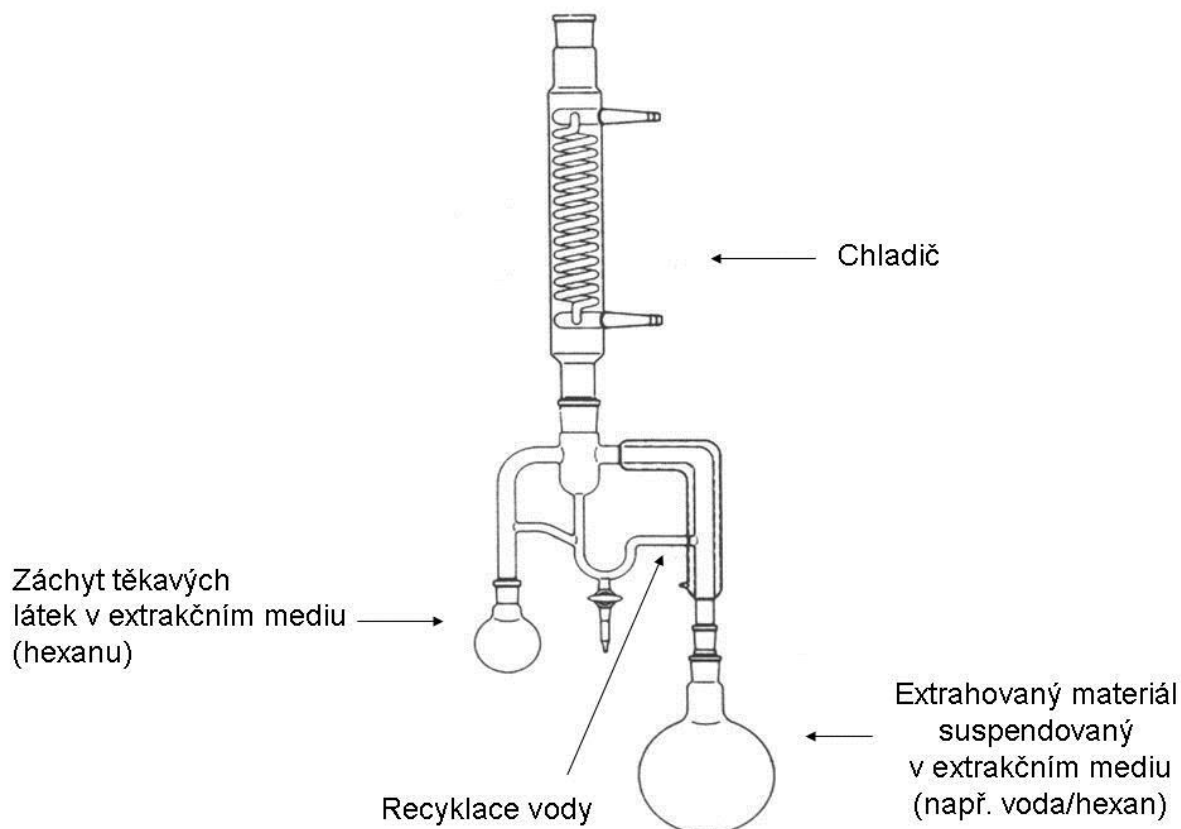
Destilace s vodní parou je klasickou technikou běžně využívanou ve fytochemii pro izolaci silice. Silice jsou obsahové látky typické např. pro rostliny čeledí Asteraceae, Apiaceae, Rutaceae a Lamiaceae. Pro vybrané druhy rostlin mohou platit zvláštní pravidla destilace s vodní parou podle fyzikálně-chemického charakteru silice. Příkladem může být destilace silice heřmánkového květu *Matricariae flos* (*Chamomilla recutita*, Asteraceae). Tato silice obsahuje poměrně vysoké množství seskviterpenů a seskviterpenických laktonů. Je těžší než voda, a proto při destilaci v Clavengerově aparátu nezůstává zachycena na hladině vody,

ale klesá a prochází recirkulací. Jinou komplikací je relativní rozpustnost některých typů silic ve vodě (např. silice *Cinnamomi cortex* – *Cinnamomum zeylanicum* – skořicovník). Tato silice obsahuje ve vodě rozpustné fenylypropanoidy. V takových případech bývá do vody jako do destilačního média přidáván hexan nebo jiná lipofilní sloučenina lehčí než voda, která silici zachytí a tak umožní její izolaci.

Destilace s vodní parou je metodou nevhodnou pro termolabilní látky, které se ve vodném prostředí při teplotě dosahující 100 °C mohou rozkládat.

#### 4.1.6 Parní destilace-extrakce (SDE – steam distillation extraction)

SDE je speciální varianta destilace s vodní parou. Využívá se v případě, že rostlinný materiál obsahuje skutečně pouze velmi malá množství těkavých látek, které chceme izolovat, nebo když těkavé látky, které chceme získat, jsou rozpustné ve vodě. Pro tuto techniku je používán tzv. Godefrootův nebo Likens-Nickersonův aparát nebo jejich modifikace (Obr. 9).



Obr. 9: Schematický náčrt zařízení pro SDE

Pro extrakci se používá směs vody a vysoce těkavého organického rozpouštědla (pentan nebo diethylether). Materiál se suspenduje v této směsi a zahřívá. Dochází k extrakci lipofilních sekundárních metabolitů do organické fáze a současně k odpařování vody s organickým rozpouštědlem. Při kondenzování pak dojde k oddělení nemísitelné vodné fáze a organické fáze, a organická fáze obsahující vyextrahované těkavé látky stéká do zvláštní nádoby. Následně je možné organické rozpouštědlo odstranit a extrahované a zkoncentrované látky dále zpracovat nebo analyzovat. Příkladem použití této techniky je destilace obsahových látek *Nicotiana tabaccum*. Čerstvý zpracovávaný tabák má štiplavý zápach a poskytuje dráždivý kouř, proto se zpracovává fermentací a stárnutím. Proces stárnutí je nutný pro výrobu cigaret a analýza těkavých látek je nezbytná pro získání komerčně využitelného a kvalitního tabáku. Těkavé látky tabáku jsou velmi komplexní směsí rozmanitých sloučenin, v některém případě rozpustné ve vodě a SDE je pro jejich extrakci výhodnou metodou. Jiným příkladem je extrakce těkavých složek z medu.

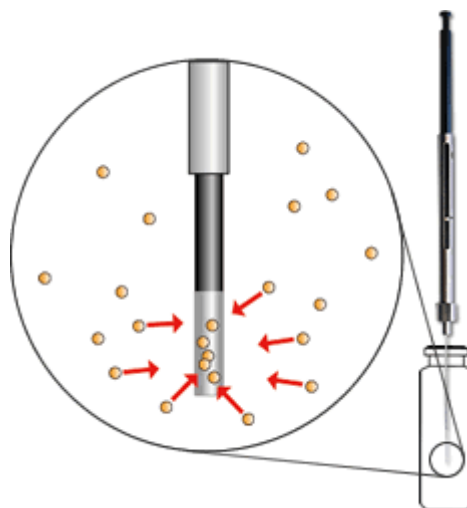
#### 4.1.7 Extrakce plynem z pevné fáze

Extrakce plynem z pevné fáze je technika používaná pro získávání těkavých sloučenin. Termín „headspace“ je omezený prostor obklopující nějaký objekt obsahující těkavé látky (jako je například květ). Tyto těkavé sloučeniny se do prostoru uvolňují a zde mohou být sbírány a analyzovány. Headspace techniky mohou být rozděleny na dvě kategorie: 1. rovnovážná (statická), 2. dynamická.

**Statická headspace technika** je používaná pro analytické účely. Část rostliny je umístěna v uzavřené nádobě, kterou je možno zahřívát. Po určité době dojde k dosažení rovnováhy mezi koncentrací látek v rostlině a okolním prostoru. Koncentrace bude závislá na bodech varu látek, teplotě a samozřejmě také matrix efektu. Látky je pak možno analyzovat, obvykle pomocí plynové chromatografie.

**Dynamická headspace technika** je založená na poněkud jiném principu. Proud dusíku je vháněn do headspace prostoru, kde je vložen vzorek a následně proháněn přes absorbent, kde jsou látky zachyceny a zkoncentrovány. Tato adsorbentová „past“ je po určité době vymytá organickým rozpouštědlem a látky jsou dále analyzovány, v případě dostatečného množství je možno směs rozdělit (preparativní plynová chromatografie) na jednotlivé složky a stanovit strukturu látek, případně provést i testy biologické aktivity.

Jednou z nejmodernějších headspace technik je **headspace-SPME** (solid phase micro extraction). Tato technika je využívána v posledních dvou desetiletích pro analýzu látek přítomných ve velmi nízkých koncentracích (ppb-ppt). Tato technika využívá křemíkového vlákna, které zachytává a koncentruje těkavé látky v statickém nebo dynamickém headspace prostoru. Z tohoto vlákna je pak možno zachycené látky desorbovat do vstupu GC. Schematický náčrt se nachází na obrázku 10.



Obr. 10: Schematický náčrt headspace SPME

([http://www.labhut.com/products/autosamplers/autosampler\\_ht280t.php](http://www.labhut.com/products/autosamplers/autosampler_ht280t.php))

Všechny varianty headspace jsou velmi šetrné a selektivní pro těkavé sloučeniny. Srovnání analýzy těkavých látek získaných headspace technikou a extraktu získaného destilací s vodní parou může poskytnout pro jednu rostlinu velmi rozdílné výsledky. Výsledky může ovlivnit jak matrix efekt, tak podmínky při extrakci. Headspace technika je výhodná, protože lze analyzovat vzorky „*in vivo*“, je velmi rychlá, citlivá a selektivní. Na druhou stranu, pro preparativní účely je její použití komplikované, a je třeba poměrně složité aparatury.

Příkladem použití headspace je analýza aroma kávy (*Coffea arabica*), analýza aroma piva (*Humulus lupulus*), analýza jednoduchých seskviterpenů (farnesen) při zkoumání obranných reakcí rostlin a další.

## 4.2 Purifikace

### 4.2.1 Úvod

Při správně zvolené extrakci získáme co největší podíl látek žádoucích, a co nejméně nežádoucích nečistot. Po extrakci je třeba oddělit i zbylé nečistoty, obvykle v minimálně jednom separačním nebo purifikačním kroku. Tohoto kroku je třeba pro téměř všechny další experimenty, které jsou dále prováděny (identifikace látek, měření biologické aktivity). Následné kapitoly se zabývají jednotlivými technikami purifikace, a jejich užitečnými aplikacemi. Z přehledu pak výrazně vystupují chromatografické techniky, které si zaslouží významnou pozornost a budou popsány v kapitole 2.5.

### 4.2.2 Rozdělování mezi nemísitelná rozpouštědla

Tento typ purifikace je založen na rozdělení látek mezi nemísitelná rozpouštědla. Mezi dvěma kapalnými fázemi při této extrakci dochází k ustanovení koncentrační rovnováhy rozpuštěné látky, kterou definuje rozdělovací koeficient  $k$  jako:  $k = [A_1]/[A_2]$ , kde  $A_1$  a  $A_2$  jsou koncentrace látky v nemísitelných fázích směsi. Prakticky má větší význam rozdělovací poměr  $q$ , který je poměrem celkových koncentrací látky v obou fázích (látka může být přítomna v jedné nebo obou fázích ve formě několika složek). Celkové množství látky, které se vyextrahovalo, udává stupeň extrakce  $E$  (%). Stupeň extrakce je ovlivněn rozpustností extrahovaných látek v použitých rozpouštědlech a závisí tedy na rozdělovacím poměru ( $q$ ).

$$E = \frac{100q}{q + V/V_0} \quad (2)$$

kde  $V_0$  a  $V$  jsou objemy organické a vodné fáze. Z rovnice (2) vyplývá, že stupeň extrakce vzrůstá s klesajícím poměrem  $V/V_0$ . Výhodnější je, ale extrahovat několikrát za sebou menšími podíly organické fáze než jednou velkým objemem. Máme-li např. látku, pro níž  $q = 2$  a použijeme k extrakci stejné objemy organické a vodné fáze ( $V_0 = V$ ), pak jedinou extrakcí celým objemem organické fáze vyextrahujeme 66,6 % látky (viz rov. 2). Rozdělíme-

li však objem organické fáze na poloviny a provedeme dvě následné extrakce, vyextrahujeme prvním krokem 50 % látky a druhým krokem 50 % ze zbytku, takže spojené extrakty budou obsahovat 75 % látky. Z praktického hlediska nemá smysl provádět více jak pět následných extrakcí. Pokud není ani potom stupeň extrakce dostačující, pak je třeba změnou extrakčního systému zvýšit hodnotu  $q$ .

Dělicí nálevka je stále jednou z často užívaných pomůcek ve fytochemické laboratoři. Po získání extraktu je rozdělování obvyklé zejména při preparativní separaci. Pro analytické účely bývá vytlačováno tzv. extrakcí na pevnou fázi (SPE). Hrubé extrakty jsou nevhodné pro přípravu vzorku pro chromatografii, obvykle obsahují příliš široké spektrum látek s rozdílnou polaritou. Navíc zde hraje roli i ekonomické hledisko, protože chromatografické zpracování menšího množství je výhodnější a dosahuje vyšší výtěžnosti. Spotřebuje se také podstatně menší množství drahých chromatografických sorbentů a rozpouštědel.

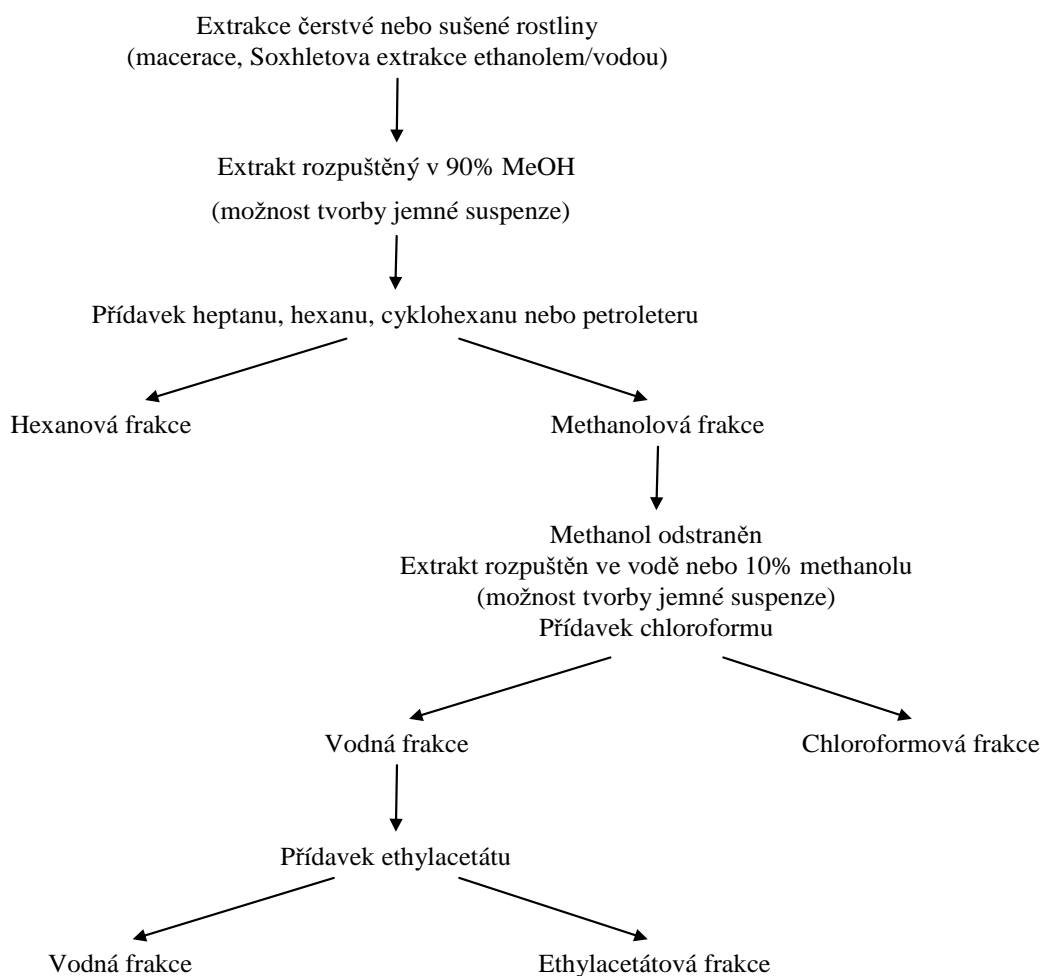
Při rozdělování se používá tzv. nemísitelných rozpouštědel. Nemísitelná rozpouštědla je možno podle polarit vybrat z eluotropní řady. Rozpouštědla z opačných konců eluotropní řady se spolu obvykle nemísí. Vzorek rozpuštěný v jedné fázi vložíme do dělicí nálevky a přidáme druhé, nemísící se rozpouštědlo. Při protřepávání se vytvoří dočasná emulze, dojde k difúzi extrahovaných látek a ustanovení koncentrační rovnováhy podle rozpustnosti látek v rozpouštědlech. Po separaci fází je možno kapaliny (extrakty) oddělit a celý postup opakovat s novým rozpouštědlem. Objem použitých rozpouštědel je obvykle 1:1, v případě užití vody jako jedné ze složek je obvykle poměr změněn směrem k většímu množství vody. Praktičtější je také organickou složku rozdělit na několik dílů a celou extrakci opakovat samostatně s menšími objemy (typické např. u směsi voda/ $\text{CHCl}_3$ ). Extrakty získané organickým rozpouštědlem je možno po oddělení zkoncentrovat a vysušit bezvodým síranem sodným nebo jiným vhodným vysoušedlem.

Výhody rozdělování pomocí nemísitelných rozpouštědel jsou zřejmé. Při rozdělování nedochází k žádné ireverzibilní adsorpci, těkavé rozpouštědlo může být v případě potřeby odstraněno odpařením. Aparát pro vytřepávání je velmi jednoduchý. Množství separovaných látek je omezeno pouze objemem dělicí nálevky. Druhy rozpouštědel mohou být zvoleny podle charakteru extrahovaných látek. Nevýhodou je omezený počet možných kombinací rozpouštědel, nemožnost automatizace a případné problémy s tvorbou emulzí a tím tzv. mezifází. K tvorbě mezifází dochází, zejména pokud jsou ve vodném extraktu přítomny povrchově aktivní látky, obvykle polárního charakteru (např. saponiny) a je využívána soustava voda/ $\text{CHCl}_3$ . V takových případech je možno využít jako organickou složku směs



$\text{CHCl}_3$ :ethanol 2:1, organický podíl po odpaření znovu rozpustit ve vodě a vytřepávat chloroformem.

Příklady nejčastěji používaných systémů pro rozdělování jsou uváděny dále. Pro odstranění lipofilních rušících látek, jako jsou tuky, vosky, chlorofyl a podobně se používá soustava methanol:hexan. Pro zlepšení rozdělení je možno použít přídavek 10 % vody. Pro extrakci polárních látek, jako jsou glykosidy, je možno použít soustavu voda:butanol. U této izolace se obvykle postupuje tak, že z totálního methanolového extraktu je odstraněno rozpouštědlo, extrakt je rozpuštěn nebo suspendován ve vodě a po filtraci vytřepáván butanolem. Do butanolu přechází glykosidy, silně polární nečistoty zůstávají rozpuštěny ve vodě. Nevýhodou použití butanolu je však jeho vysoká teplota varu a nesnadné odpařování a jeho omezená mísitelnost s vodou. Je zde nutno vodnou složku butanolem předem nasytit. Středně polární sloučeniny, jako jsou aglykony, jsou často extrahovány v soustavách voda:chloroform nebo voda:ethyl-acetát. V případě, že zpracováváme neznámý vzorek, nemáme dokonalý přehled o obsahových látkách rostliny a chceme analyzovat pokud možno všechny látky, můžeme použít postup podle obrázku 11.



Obr. 11: Obvyklý postup separace vytřepáváním pomocí nemísitelných rozpouštědel

Vytřepávání používáme také v případě purifikace alkaloidů. Alkaloidy jsou látky, které mají zásaditý charakter způsobený přítomností sekundárního nebo terciárního dusíku. Při extrakci do kyselého prostředí (zředěná kyselina sírová, chlorovodíková nebo citronová) tvoří snadno soli a jsou ve vodě rozpustné. Při vytřepávání takového roztoku nepolárním organickým rozpouštědlem dojde k extrakci nepolárních nečistot. Organickou vrstvu oddělíme, přidáme čerstvé rozpouštědlo a celou soustavu zalkalizujeme (obvykle zředěným amoniakem). Alkálíe vytěsní alkaloid ze soli a ten se stane rozpustným v lipofilní organické vrstvě. Po oddělení je možno organickou vrstvu opakovaně vytřepávat okyselenou vodou, z bazí alkaloidů vytvořit soli a znovu je převést do vodné fáze. Tímto způsobem lze alkaloidy poměrně dobře oddělit od balastu, případně při řízené změně pH frakcionovat alkaloidy na skupiny s podobnou strukturou podle jejich disociační konstanty.

### 4.2.3 Lyofilizace (mrazová sublimace)

Lyofilizace je nejšetrnějším způsobem, jak ze vzorku po extrakčních nebo separačních technikách odstranit vodu. Snížení tlaku na přibližně 1 milibar a teploty na  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  umožňuje její snadné odstranění sublimací. Vodní pára je zachytávána na spirále s velmi nízkou teplotou a z tohoto chladiče je pak voda odstraňována ve formě ledu. V současnosti se laboratorně používají jednoduché komerčně dodávané lyofilizátory ve variabilní sestavě. V různých úpravách je pak tato metoda vhodná i pro odstraňování dalších sublimujících rozpouštědel (např. tetrahydrofuran, DMSO).

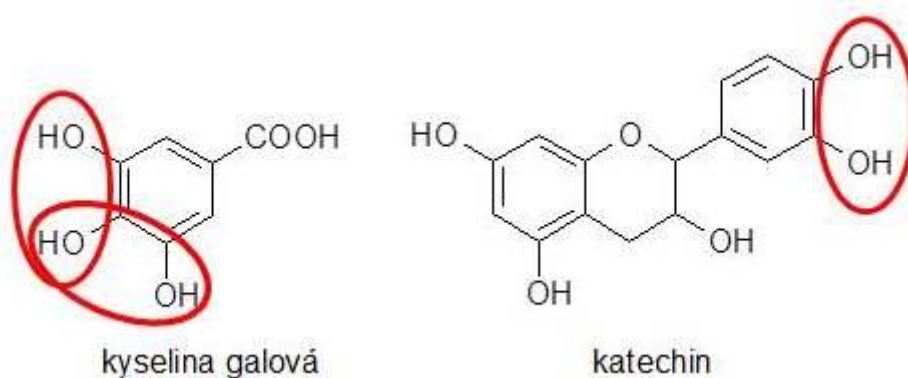
Metoda je využívána zejména v případě, že látky v extraktu jsou termolabilní a není jiná možnost jak vodu snadno odstranit bez zahřívání. Výsledný lyofilizát je materiál s velkým povrchem, který je snadno rozpustný při dalším zpracování.

### 4.2.4 Precipitace (srážení)

Srážení se používá pro odstranění nežádoucích nečistot nebo cílových látek z roztoku nebo extraktu. Po srážení následuje dekantace, odstředění nebo filtrace. Tato metoda může být velmi jednoduchá, levná a rychlá oproti např. chromatografické separaci a může být používána v případě, kdy jiné techniky nejsou vhodné. Srážení lze ale využít pouze v případě, že je k dispozici dostatečně selektivní činidlo a kde nehrozí nebezpečí koprecipitace.

Příkladem může být srážení alkaloidů s Mayerovým činidlem (tetraiodortuřnatan draselný). V kyselém prostředí vznikají komplexy s terciárními i kvartérními alkaloidy. Vznikající těžká bílá sraženina sedimentuje a může být od matečného roztoku snadno odfiltrována. Následně je pak rozpuštěna ve směsi acetonu, methanolu a vody. Roztok je následně protlačen přes kolonku s iontoměničem v cyklu  $\text{Cl}^-$ , který vymění komplex  $[\text{HgI}_4]^{2-}$  za chloridový aniont a izolujeme tak směs alkaloidů ve formě chloridů.

Příkladem odstranění nečistot srážením je precipitace fenolických sloučenin olovnatými ionty nebo polyvinylpyrrolidonem. Fenolické látky jako jsou katechiny nebo galáty často interferují při chromatografické nebo spektrofotometrické analýze jiných látek. Srážení s olovem je možno využít pro selektivní izolaci derivátů fenolů s *ortho* dihydroxy uskupením.



Obr. 12 Příklady fenolických sloučenin s vyznačenou *ortho*-dihydroxy skupinou srážených ionty  $\text{Pb}^{2+}$

Pro finální purifikaci, například pro odstranění nedefinovaných nečistot po chromatografické separaci je používáno také aktivní uhlí. Tyto nedefinované nečistoty je často složité odstranit pomocí chromatografie nebo krystalizace. Systém je ovšem třeba nutno nastavit tak, aby nedošlo také k adsorpci čistěných látek.

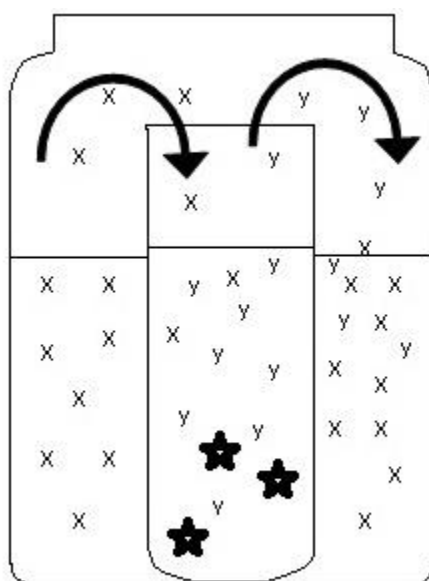
Přírodní látky je možno z roztoku vysrážet přidávkem rozpouštědla, ve kterém látka není rozpustná. Často se sloučeniny, které se liší poměrně málo a mají podobnou polaritu, významně rozdílně rozpouští v různých rozpouštědlech. Příkladem je srážení některých glykosidů (např. hesperidin z *Citrus* spp.), které jsou nerozpustné ve vodě. Hesperidin je dobře rozpustný v dimethylformamidu, po přidání vody se snadno sráží a z roztoku je získán centrifugací.

#### 4.2.5 Krystalizace

V počátcích fytochemie byla krystalizace jednou z nejpoužívanějších metod. Většina látek byla izolována právě proto, že se je z roztoku dařilo krystalizovat. V současnosti je celá řada sloučenin izolována v amorfní formě v miligramových množstvích pomocí chromatografie a krystalizace už nehraje v posledním kroku před identifikací látek tak významnou roli. Přesto zůstává zajímavou, levnou a rychlou technikou pro re-izolaci známých látek jak v laboratorním, tak preparativním měřítku. Někdy je tato metoda užívaná v případě, kdy je třeba oddělit látky s podobnou strukturou, které je chromatograficky obtížné separovat. Výhodou krystalizace je, že pokud se podaří krystal připravit, můžeme provést jednoznačnou identifikaci látky pomocí rentgenové krystalografie (kapitola 3.5).

Pro přípravu krystalů pro rentgenovou krystalografii se používá také systém difúze rozpouštědla. Metoda funguje tak, že v uzavřené nádobce je látka umístěná v rozpouštědle, ve kterém se dobře rozpouští (téměř nasycený roztok). Z okolí se odpařuje rozpouštědlo, ve kterém je látka rozpustná špatně, a toto rozpouštědlo difunduje do roztoku látky (Obr. 13). Jak se mění složení rozpouštědla, rozpustnost látky klesá a látka krystalizuje, nejlépe ve formě monokrystalu.

Nalézt správnou soustavu pro krystalizaci je spíše věc empirického postupu. Obvyklé je hledat rozpouštědlo nebo soustavu rozpouštědel, ve které je krystalizovaná látka rozpustná hůře než nečistoty. Opačný systém je možný, i když méně častý.



Obr. 13: Schematický náčrt aparatury pro krystalizaci difúzí z rozpouštědla. X – rozpouštědlo, ve kterém je krystalizovaná látka méně rozpustná, difunduje do vnitřní nádoby.  
Y – rozpouštědlo, ve kterém je látka dobře rozpustná, difunduje z vnitřní nádoby.

### **4.3 Chromatografické metody**

Před objevem chromatografických metod byla izolace přírodních látek poměrně obtížnou záležitostí, založenou zejména na opakované krystalizaci. Izolovat (a následně identifikovat) tak bylo možno pouze krystalické látky získané ve velkém množství. Teprve rutinní zavedení chromatografie v 50. letech 20. století a rozvoj sofistikovaných chromatografických metod izolaci přírodních látek usnadnil a významně urychlil. Chromatografické metody je možno využít jak pro izolaci sekundárních metabolitů (v preparativním módu), tak pro identifikaci, resp. pro stanovení množství zkoumaných látek (v analytickém módu). Chromatografii proto bude věnována celá následující kapitola.

#### **4.3.1 Principy separace látek v chromatografii**

Při chromatografických separacích dochází k rozdělování molekul analytu mezi dvě nemísitelné fáze, které jsou vůči sobě v pohybu (stacionární a mobilní fáze). Chromatografické separace jsou založeny na rozdílné afinitě dělených látek k mobilní a stacionární fázi a na mnohonásobném opakovaném ustavování fázové rovnováhy analyzované směsi mezi tyto dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze může být uložena v ploše (tenkovrstvá a papírová chromatografie) nebo v koloně. Podle skupenství mobilní fáze se dělí chromatografické metody na kapalinovou a plynovou chromatografii. Další rozdělení může být podle požadovaného využití, a to na analytickou (kvantitativní i kvalitativní analýza) a preparativní chromatografii (izolace látek ze směsi).

Chromatografické metody lze klasifikovat také podle povahy sil, které způsobují rozdělování látek mezi stacionární a mobilní fázi. Z hlediska povahy separačních sil rozeznáváme několik typů chromatografie. Metody používané ve fytochemii využívají zejména různé schopnosti pevné stacionární fáze adsorbovat separované látky (adsorpční chromatografie) nebo rozdělování separovaných látek mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti (rozdělovací chromatografie). U rozdělovací chromatografie slouží jako stacionární fáze tenký film kapaliny adsorbovaný na pevný nosič (aplikace zejména v plynové chromatografii). V kapalinové chromatografii není toto řešení dostatečně stabilní (adsorpce kapaliny na nosič nemusí být dostatečně pevná pro vytvoření trvalého filmu), a proto bylo

nahrazeno tzv. chemicky vázanými fázemi (viz kapitola 2.5.6). Zde je potřeba zdůraznit rozdíl mezi plynovou a kapalinovou chromatografií, kdy u plynové chromatografie není separace ovlivňována použitou mobilní fází (většinou inertní plyn). U kapalinové chromatografie je naopak složení mobilní fáze zásadní pro průběh a výsledek separace. Kapalinová chromatografie s normálními fázemi používá polární stacionární fáze (např. silikagel, oxid hlinitý) a nepolární mobilní fáze (např. benzen, toluen). V kapalinové chromatografii s obrácenými fázemi, častěji nazývanou reverzní chromatografií (patří do chromatografie s chemicky vázanými fázemi), je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární (např. voda, methanol). Nepolární stacionární fáze jsou připravovány navázáním různě dlouhých alifatických uhlovodíkových řetězců (např. >Si-O-C8, >Si-O-C18) na vhodný nosič (např. silikagel) (viz. kapitola 2.5.6, Obr. 19). Reverzní fáze jsou nejpoužívanějším typem stacionárních fází ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

U kapalinové chromatografie můžeme využít i dalších mechanismů separace, a to iontové výměny, síťového efektu a biospecifických interakcí. Využití těchto metod je však ve fytochemii mnohem méně rozšířené, proto jsou zde uvedeny jen základní principy.

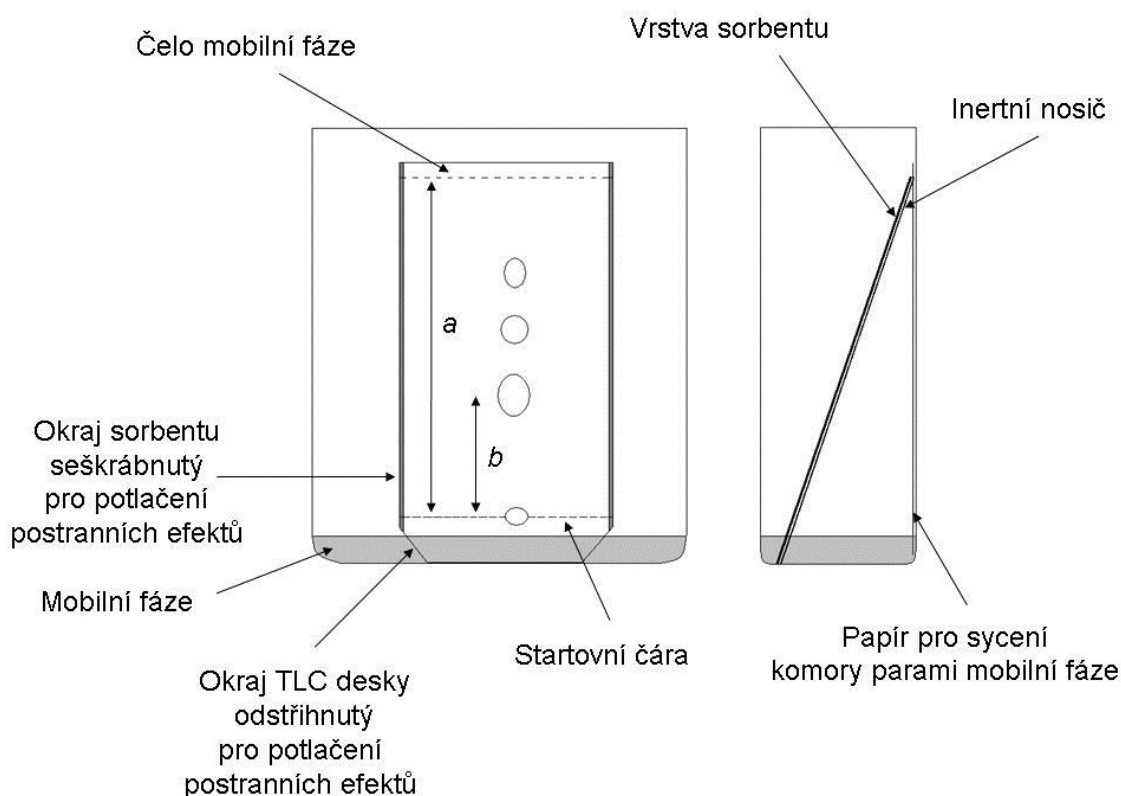
Iontově výměnná chromatografie využívá stacionární fáze složené z pevného nosiče s kovalentně navázanými aniontovými (např.  $-\text{SO}_3^-$ ) nebo kationtovými (např.  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ) funkčními skupinami. Separované látky iontové povahy opačného znaménka náboje jsou přitahovány ke stacionární fázi elektrostatickými silami.

Síťového efektu využívá vylučovací chromatografie (size-exclusion chromatography), která používá jako stacionární fázi porézní gely o různé velikosti pórů. Velké molekuly rozpuštěných látek nejsou schopny pronikat do porézní stacionární fáze a projdou systémem rychleji než menší molekuly, které vnikají do pórů stacionární fáze (proto se někdy nazývá obrácená filtrace). Vylučovací chromatografie se používá hlavně pro vysokomolekulární látky v polymerní chemii a biochemii.

Afinitní (biospecifická) chromatografie je založena na biospecifických interakcích analytu s komplementárními látkami (ligandy) zakotvenými na stacionární fázi. Jako příklad je možné uvést interakce enzymů s inhibitory či substráty, komplexů protilátek s antigeny apod. Využití nachází tato metoda zejména v biotechnologiích a biochemii.

### 4.3.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC je jednou z nejužívanějších technik pro analýzu sekundárních metabolitů. Je založena na klasických chromatografických principech, provedení je v plošném uspořádání. Základem je tenká vrstva stacionární fáze na inertním pevném podkladu, jako je sklo nebo kovová folie. Sorbent je k podkladu ukotven obvykle pomocí sádry. Po nanesení vzorku na startovní linii je destička vložena do nádoby (kyvety) s mobilní fází. Mobilní fáze vlivem kapilárních sil vzlíná částicemi sorbentu rovnoměrně vzhůru a unáší s sebou na základě chromatografických principů (obvykle adsorpční chromatografie) separované látky (Obr. 14). Při vzlínání mobilní fáze se destička chová jako kapilára, a dochází zde k tzv. kapilární elevaci, a čelo mobilní fáze má pak tvar menisku. Znamená to, že při okrajích destičky se mobilní fáze pohybuje rychleji než ve středu, což způsobuje rozmývání skvrn separovaných látek do stran, a znesnadňuje porovnávání chromatografických stop na kraji a uprostřed chromatogramu. Tyto tzv. postranní efekty lze kompenzovat odstraněním úzkého proužku sorbentu z okrajů destičky, případně odštíhnutím dolních růžků chromatogramu před zahájením vyvíjení.

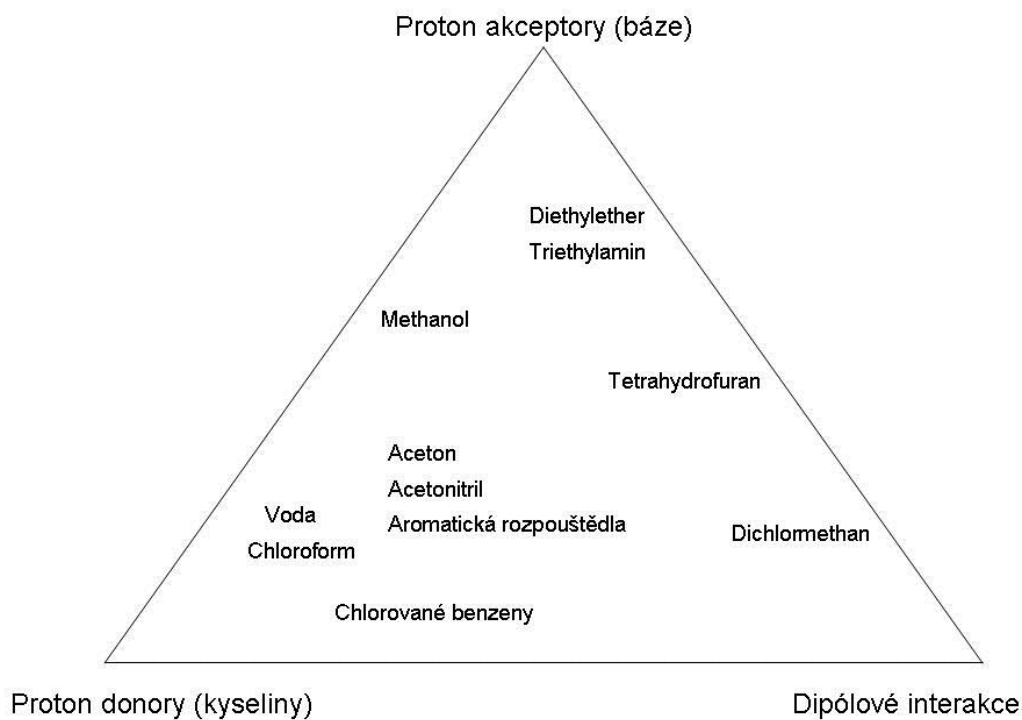


Obr. 14: Schematické znázornění aparatury pro TLC ( $a$  – vzdálenost čela od startu,  $b$  – vzdálenost středu skvrny od startu)



Oproti kolonovým chromatografickým metodám jsou zde dva základní rozdíly: na počátku separace je stacionární fáze suchá a rozpouštědlem se sytí v průběhu separace; a jedná se o atmosféře otevřený systém. Komora pro TLC by však měla být pevně uzavřena a vnitřní atmosféra nasycena parami mobilní fáze. TLC může být použito jak analyticky, tak preparativně. Preparativní TLC používá destičky o tloušťce vrstvy 500-2000  $\mu\text{m}$ , analytická 100-250  $\mu\text{m}$ . V současnosti jsou komerčně dostupné různé stacionární fáze, ovšem klasický silikagel je stále nejpoužívanější. Varianta se silikagelem je nejlevnější, separace se silikagelem jsou nejprozkoumanější a je popsáno nejvíce aplikací. Silikagel je používán pro separace skutečně širokého spektra látek od nepolárních sloučenin typu terpenů po poměrně polární alkaloidy. K dispozici jsou i modifikované silikagely pro TLC. Nejobvyklejší je použití C18 reverzní fáze. Tyto sorbenty jsou však poměrně drahé, proto je jejich použití zvláště pro preparativní účely omezené. Pro zvýšení účinnosti separace je používána tzv. HPTLC (high performance TLC), kde jsou částice sorbentu menší a pravidelnějšího tvaru.

Mobilní fázi pro TLC volíme podle typu separovaných látek a stacionární fáze. Nejčastější je využití silikagelu a pro ten jako mobilní fázi volíme dvou až tří složkovou směs organických rozpouštědel. Podle polarit volíme jedno polárnější rozpouštědlo (elučně silnější) a jedno nepolární. Poměrem rozpouštědel pak upravujeme eluční sílu směsi podle požadavků. Jako třetí, případně čtvrtou složku mobilní fáze doplňujeme převážně acidobazický nebo jiný modifikátor upravující vlastnosti mobilní fáze ve smyslu vyššího rozlišení nebo „zaostření“ skvrn. Rozpouštědla a modifikátory je možno podle vlastností vybírat podle Snyderova trojúhelníku (Obr. 15) nebo z eluotropní řady (Tab. 1).



Obr. 15: Snyderův trojúhelník selektivity rozpouštědel

Zde jsou rozpouštědla uspořádána podle acidobazických vlastností a podle schopností dipólových interakcí. Správná volba složek mobilní fáze a jejich poměrů je obvykle výsledkem řady experimentů, ve kterých se postupuje metodou pokus-omyl.

<b>Rozpouštědlo</b>	<b><math>E^0(\text{Al}_2\text{O}_3)</math></b>	<b>Bod varu</b> [°C]	<b>Viskozita</b> [mN.s.m <sup>-2</sup> (20 °C)]	<b>UV cut off</b> [nm]
Pentan	0	36	0.24	210
Cyklohexan	0.04	69	0.98	210
Tetrachlormethan	0.18	77	0.97	265
Toluen	0.29	111	0.59	286
Diethylether	0.38	35	0.25	218
Chloroform	0.40	62	0.57	245
Dichlormethan	0.42	40	0.44	235
Tetrahydrofuran	0.45	66	0.55	220
2-butanon	0.51	80	0.32	330
Aceton	0.56	56	0.32	330
1,4-dioxan	0.56	107	1.44	215

Ethyl-acetát	0.58	77	0.45	255
Diethylamin	0.63	115	0.33	275
Acetonitril	0.65	82	0.37	190
2-propanol	0.82	82	2.50	210
Ethanol	0.88	78	1.20	210
Methanol	0.95	64	0.59	210
Voda	1	100	1.0	-

Tab. 1: Eluotropní řada ( $E^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$  – Snyderův parametr síly solventu)

Pro zlepšení separace se používá také tzv. 2D tenkovrstvá chromatografie. Po vyvinutí chromatogramu jedním směrem a vysušení je destička otočena o  $90^\circ$  a vyvinuta v jiné mobilní fázi s jinou selektivitou. Někdy je možno aplikovat i 3D ještě jedním otočením a vyvinutím.

Rychlost vztlínání rozpouštědla po destičce není konstantní a se vzrůstající vzdáleností od startu se zmenšuje. Zvětšuje se tak difúze látek v rozpouštědle a zóny (skvrny) jednotlivých látek se zvětšují. Se vzrůstající vzdáleností od startu také narůstá pravděpodobnost nerovnoměrného postupu rozpouštědla sorbentem. Zvětšením skvrn dojde k nežádoucímu snížení rozlišovací schopnosti, proto bylo vyvinuto několik technik, které mají tomuto jevu předcházet.

Rotační planární chromatografie (RPC) využívá k transportu mobilní fáze po destičce odstředivé síly centrifugy. Vzorek se nanáší do středu kruhové destičky, do středu destičky je také přiváděna mobilní fáze. Kruhovým pohybem se pak mobilní fáze homogenně rozšiřuje směrem ven z destičky, kde může být i s rozdělenými látkami zachytávána (proto je možno tuto metodu využít pro preparativní TLC).

Přetlaková tenkovrstvá chromatografie (OPLC) používá destičky se sorbentem pokrytým tenkou inertní folií. Do vrstvy sorbentu je pumpována mobilní fáze. Zde nedochází na rozdíl od klasické TLC ke kontaktu s atmosférou vyvíjecí komory, proto je metoda svým způsobem podobná HPLC. OPLC může být použita jak preparativně, tak analyticky.

Preparativní TLC používá obvykle destičky o rozměrech  $20 \times 20$  cm. Na jedné desce může být separováno až 100 mg vzorku. Místo nanášení kapek o průměru 5-10 mm se vzorek nanáší v linii po celé délce startovní čáry. Pro nanášení úzké startovní vrstvy je možno použít automatickou pipetu, Pasteurovu pipetu nebo automatický aplikátor. Vrstva by neměla být širší než 10 mm, pro zúžení startovací vrstvy je možno využít krátkého vyvinutí v mobilní fázi s vysokou eluční silou (pro silikagel je to např. methanol). Po vyvinutí je provedena detekce (viz kapitola 2.5.2.1) a z destičky je pak v místě skvrn látek seškrabán sorbent a látky

jsou vhodným rozpouštědlem ze sorbentu extrahovány. Preparativní TLC má oproti jiným uspořádáním preparativní chromatografie své výhody i nevýhody. Výhodou je jednoduchost a žádný složitý aparát. Metoda z analytické TLC je snadno převeditelná pro preparativní účely. Je možno separovat rychle poměrně velká množství vzorku s větší selektivitou a rozlišením než při klasické sloupcové chromatografii (kapitola 2.5.5.). Na druhou stranu, pro skutečně velká množství vzorku (cca nad 10 g) je metoda finančně náročná a pracná, na silikagelu může dojít k rozkladným reakcím a separace není zcela přesně opakovatelná.

Chování látek separovaných pomocí TLC popisujeme pomocí takzvaného retenčního faktoru ( $R_f$ ). Je to veličina, která závisí na charakteru použité mobilní a stacionární fáze, na struktuře separované látky, na dráze vyvíjení chromatogramu a na dalších podmínkách při separaci. Pro každou analyzovanou látku je za přesně daných podmínek konstantní. Je to bezrozměrná veličina, daná poměrem vzdálenosti, kterou urazila analyzovaná látka od startu (střed skvrny) k vzdálenosti, kterou urazilo čelo mobilní fáze. Maximální hodnota  $R_f$  tedy může dosáhnout 1, pokud se analyzovaná látka na stacionární fázi nezadržuje a po chromatogramu se posunuje s čelem mobilní fáze, minimální hodnoty blíží se 0 dosahují látky, které ve zvolené mobilní fázi neputují a jsou pevně vázány na fázi stacionární.  $R_f$  analyzovaných látek je možno vzájemně porovnávat a použít pro identifikaci po porovnání se standardem. Je ale nutno vždy brát v úvahu podmínky separace, a pokud možno analýzu standardu provádět současně s analýzou vzorku (na stejné destičce). Pomocí  $R_f$  je také možno odhadnout polaritu a základní charakteristiky analyzované látky: na silikagelu (polární stacionární fáze) se pevně vážou polární sloučeniny, nepolární se i v „slabé“ mobilní fázi pohybují.

#### **4.3.2.1 Detekční metody pro tenkovrstvou chromatografii**

Většina chromatografických destiček je určena pro kvalitativní nebo semi-kvantitativní účely, tzn. zjištění, jestli je analyzovaná látka totožná s referenčním standardem, nebo jestli analyzovaná frakce obsahuje dostatečné množství cílové sloučeniny. Existují samozřejmě i preparativní destičky, o jejichž detekci se zmíníme samostatně.

Pouze v případě, že je analyzovaná látka barevná, je možno vyhodnocení TLC provádět bez nějaké vizualizační reakce. Detekční metody je možno rozdělit na nedestruktivní a destruktivní. Typické je proto použití nejprve nedestruktivních metod, následovaných destruktivními.

Nejjednodušší nedestruktivní vizualizace je dosaženo použitím fluorescenčního indikátoru, který je v současnosti přidáván do většiny TLC destiček. Při ozáření UV zářením o vlnové délce 254 nm se objevuje u silikagelu, celulosy a oxidu hlinitého při přidání indikátoru zelená fluorescence, případně světle modrá u sorbentů typu C18. Pokud testované látky na TLC absorbují záření o vlnové délce 254 nm (např. aromatické sloučeniny, sloučeniny s  $\alpha$ ,  $\beta$  nenasyceným karbonylem nebo s konjugovanými dvojnými nebo trojnými vazbami), UV záření neprojde přes látku k indikátoru a na místě látky se objeví tmavá skvrna. Takové látky jsou pak detekovány s poměrně vysokou citlivostí (okolo 1  $\mu\text{g}$ ). Další způsob detekce je pozorování pod zářením o vlnové délce 366 nm. Tato detekce není zcela universální, protože v této oblasti vykazují fluorescenci látky s rozsáhlejšími konjugovanými systémy. Na druhou stranu je poměrně citlivá, je možno detekovat okolo 0,1  $\mu\text{g}$  látky. Vzhledem k velké citlivosti je třeba brát tuto metodu s rezervou, protože na chromatogramu se mohou objevit i skvrny nečistot přítomných ve velmi nízké koncentraci. Typickými látkami, které je možno takto detekovat, jsou flavonoidy, případně jiná rostlinná barviva jako chlorofyl apod. Lampa pro UV detekci a temná místnost pro pozorování chromatogramu jsou součástí každé fytochemické laboratoře.

Po detekci chromatogramu pomocí viditelného a UV záření je možno přistoupit k destruktivním metodám detekce. Destruktivní detekce jsou založeny zejména na chemických reakcích. Obvykle je možno použít celou řadu chemických činidel pro provádění jak universálních (nespecifických), tak selektivních (specifických) reakcí a ve fytochemické laboratoři by měl být pro toto vytvořen jednoduchý reagenční aparát.

Typickým nespecifickým činidlem je např. kyselina sírová v diethyletheru, která dehydratuje a oxiduje separované látky. Chromatogram se zahřeje a v místě skvrn látek se objeví barevné skvrny. Chromatogram se však po detekci nedá skladovat a rozpadá se. Dragendorffovo činidlo jako příklad selektivního činidla reaguje s většinou alkaloidů za vzniku oranžově zbarvených komplexů. Příklady dalších činidel jsou uvedeny v následující tabulce.

<b>Detekční činidlo</b>	<b>Detekované látky</b>
Anisaldehyd v kyselině sírové	silice, terpeny, aromáty
Anthron v kyselině sírové	cukry, glykosidy
Chloramin v kyselině trichloroctové	kardenolidy
Dragendorffovo činidlo ( $[\text{BiI}_4]^{2-}$ )	alkaloidy

Fastblue B (3,3'-dimethoxy[1,1'-bifenyl]-4,4'-bis(diazonium) dichlorid)	fenolické látky, např. aflatoxiny
Neuvovo činidlo (2-aminoethyldifenylester kyseliny borité)	flavonoidy
Ninhydrin	aminokyseliny
Hydroxid draselný v ethanolu	antrachinony
Koncentrovaná kyselina sírová v diethyletheru	universální detekční činidlo
Vanilin v kyselině sírové	silice, terpeny, aromáty, cukry

Tab. 2: Detekční činidla používané v TLC a jimi detekovatelné látky

Barevná reakce na chromatogramu s použitím nedestruktivní a následně destruktivní detekce může být dobrou metodou pro identifikaci látky, pokud použijeme srovnání se standardem a skvrna o stejném  $R_f$  se bude barevně chovat stejně.

System nedestruktivní a destruktivní detekce je možno použít i pro preparativní TLC. I preparativní desky mohou být vybaveny fluorescenčním indikátorem. Po vyvinutí a detekci pod UV zářením zakryjeme část desky sklem nebo hliníkovou folií, aplikujeme činidlo a pozorujeme barevnou reakci. Po pozorování skvrn a seškrabání sorbentu spolu se separovanou látkou následně můžeme opět využít UV záření pro potvrzení vizualizační reakce.

### 2.5.2.2 Kvantitativní analýza pomocí TLC

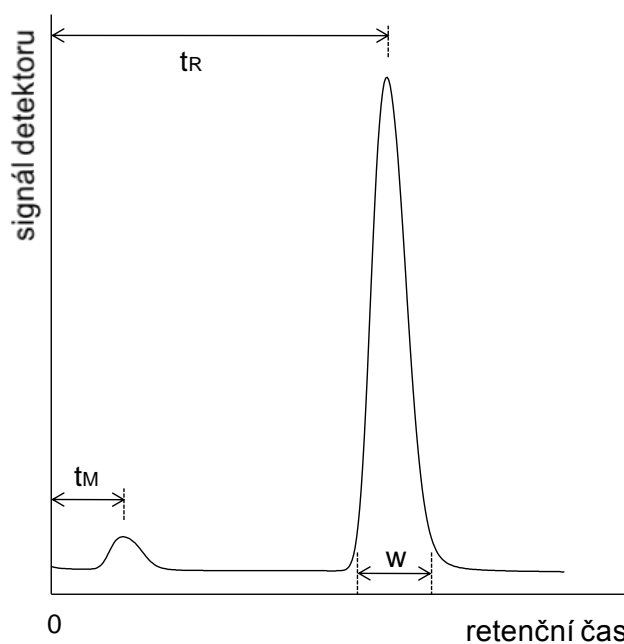
Pro kvantitativní analýzu je nutné na TLC desku nanést přesné množství vzorku. Toho dosáhneme použitím automatické pipety nebo automatického dávkovače. Pro stanovení kvantity lze opět použít jak nedestruktivní, tak destruktivní techniky. Skvrny na TLC mohou být skenovány pomocí denzitometru. Denzitometr obvykle může měřit jak transmitanci, tak reflektanci nebo fluorescenci. V případě použití sofistikovaného přístroje a dostatečně velké TLC destičky může být metoda kvantitativního stanovení pomocí TLC alternativou k HPLC, protože dokáže paralelně zpracovat a analyzovat i několik desítek vzorků.

Jednodušší variantou, bez použití denzitometru, je zakreslení a vystříhání skvrn, které potom můžeme zvážit a porovnat. Zde už samozřejmě přesnost a opakovatelnost není tak vysoká.

### 4.3.3 Teoretické základy kolonové chromatografie

V této kapitole je popsána obecná teorie vztahující se na všechny formy kolonové chromatografie. S vhodnými modifikacemi může být tato teorie aplikována i na planární chromatografii (stacionární fáze na ploše).

Dělení látek v kolonové chromatografii probíhá v separační koloně. Separovaný vzorek (směs několika látek) je nanesen na začátek separační kolony. Dělené látky opakovaně přechází mezi stacionární a mobilní fází. Jak se vzorek pohybuje kolonou (unášen mobilní fází), dochází vlivem různé chemické afinity látek ke stacionární fázi k dělení jednotlivých rozpuštěných látek. Pokud jsou síly jednotlivých interakcí se stacionární fází dostatečně odlišné, dojde k rozdělení rozpuštěných látek do oddělených zón. Výsledek chromatografické separace je zaznamenán vhodným detektorem, který se nachází na konci kolony. Záznam intenzity signálu z detektoru jako funkce času nebo objemu eluované mobilní fáze se nazývá chromatogram (Obr. 16). V ideálním případě odpovídá každé separované látce jedna zóna reprezentovaná na chromatogramu křivkou Gaussovského tvaru nazývanou pík.



Obr. 16: Chromatogram s vyznačenými hlavními charakteristikami ( $t_R$  – retenční čas látky,  $t_M$  – mrtvý čas,  $w$  – šířka chromatografického píku při základně)

### 4.3.3.1 Základní charakteristiky chromatografického procesu

Retenční čas ( $t_R$ ) látky je doba, která uplyne mezi nanesením vzorku na kolonu a detekcí maxima píku dané látky, což odpovídá celkovému času, který stráví látka v koloně. Mrtvý čas ( $t_M$ ) odpovídá času, kterým projde látka kolonou, když není stacionární fází zadržována (tzn. látka se pohybuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze). Retenční čas lze také měřit nepřímo jako objem mobilní fáze prošlý kolonou za dobu, který stráví separovaná látka v koloně. Tento parametr je znám jako retenční objem ( $V_R$ ). Mrtvý objem ( $V_M$ ) je objem mobilní fáze, která musí projít kolonou, aby se nezadržovaná látka dostala od začátku ke konci kolony. Často používanou retenční veličinou je retenční poměr  $k'$ . Udává, kolikrát více času stráví molekuly látky ve stacionární fází než ve fází mobilní, tj. v kolikanásobku mrtvého času (objemu) látka eluuje. Je to i poměr látkových množství analytu ve stacionární a mobilní fází za rovnovážných podmínek.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

Dalším důležitým parametrem je šířka chromatografického píku při základně ( $w$ ). Šířka píku je stanovena průsečíkem základní linie s tangentami v inflexních bodech na obou stranách chromatografického píku. Šířka chromatografického píku odráží šířku zóny příslušného analytu v koloně. Kromě šířky píku při základně se můžeme setkat i s parametrem šířka píku v polovině jeho výšky ( $w_{1/2}$ ).

Retenční čas a objem jsou důležité kvalitativní parametry a jsou konstantní pro určitou látku za konkrétních podmínek separace, proto je můžeme využít pro identifikaci látky při porovnání se standardem. Protože podobné látky budou mít podobné retenční časy, není shoda  $t_R$  mezi látkou a standardem dostačující pro jednoznačnou identifikaci. K tomu jsou nutné další informace, např. z dalších detektorů. Schopnost provést identifikaci látky (srovnáním se standardem, případně i bez standardu) tedy závisí na použitém detektoru, případně kombinaci detektorů a na datech z nich získaných (např. UV/Vis spektrum, hmotnostní spektrum, apod.). Při kvantitativní analýze se sleduje plocha píku stanovované látky, která je úměrná množství látky ve vzorku. Plocha píku je určována nejčastěji metodou numerické integrace a u moderních přístrojů propojených s počítačem tento výpočet provádí vhodný program určený k vyhodnocování chromatografických dat. Při kvantitativní analýze je nutný standard stanovované látky, který se použije pro kalibraci systému (nejčastěji metoda kalibrační přímky).



### 4.3.3.2 Účinnost a rozlišení chromatografické separace

Cílem chromatografie je rozdělit směs látek na sérii složek, kdy každý pík na chromatogramu odpovídá jedné látce. Účinnost chromatografické kolony klesá se zvyšujícím se rozmýváním zón separovaných látek. Toto rozmývání je způsobeno několika faktory:

1. Vířivá difúze – molekuly rozpuštěné v mobilní fázi urazí při obtékání částic náplně kolony různé vzdálenosti.
2. Podélná difúze – prostá difúze molekul látky, které difundují z místa s vyšší koncentrací (chromatografická zóna) do míst s nižší koncentrací.
3. Odpor proti převodu hmoty – transportní děje látky v mobilní i stacionární fázi, potřebné pro dopravu látky k aktivnímu místu ve stacionární fázi, na kterém proběhne interakce.

Kvantitativní vyjádření míry oddělení dvou píků se nazývá rozlišení ( $R_S$ ) a lze jej vypočítat podle vztahu 4. Se zvyšující se hodnotou  $R_S$  jsou píky od sebe více odděleny, prakticky dostačující hodnota je  $R_S = 1$  (překryv píků je přibližně 3 %), prakticky úplné oddělení píků nastává při  $R_S > 1,5$ . Vysoké hodnoty  $R_S$  nejsou výhodné z hlediska prodloužení doby analýzy. Podle rozlišení můžeme posoudit, zda změna chromatografických podmínek vedla k lepší separaci látek.

$$R_S = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_2 + w_1} \quad (4)$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy dvou sousedících píků ( $t_{R1} < t_{R2}$ ),  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky těchto píků.

Rozlišení souvisí podle rovnice 3 s šířkou chromatografických píků, která je dána účinností chromatografické kolony (rovnice 5). Pro kvantitativní vyjádření účinnosti kolony se používá označení počet teoretických pater  $N$ .

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (5)$$

Výše uvedené faktory souvisejí s rychlostí průtoku mobilní fáze. Pro dosažení maximální účinnosti chromatografické kolony existuje optimální rychlost průtoku mobilní fáze a její zvýšení nebo snížení vede ke snížení účinnosti. Velikost a tvar částic stacionární fáze ovlivňuje taktéž rozmývání chromatografických zón. Snížení velikosti částic vede k většímu rozlišení, proto se výrobci snaží vyrábět co nejmenší částice kulovitěho tvaru. Navíc menší, pravidelné částice stacionární fáze potlačují vliv rychlosti průtoku mobilní fáze na rozlišení, což dovoluje používání vyšších průtoků a tím zkrácení doby analýzy. V současnosti

se používají také tzv. monolitické kolony, tvořené blokem chromatografického sorbentu. Tyto kolony umožňují použití vysokých průtoků mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti.

Znalost počtu teoretických pater kolony můžeme využít pro odhad počtu rozpuštěných látek, které mohou být za daných podmínek rozděleny. Tento odhad se nazývá píková kapacita  $n_C$  a vyjadřuje, kolik píků se do chromatogramu může vejít.

$$n_C = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \times \ln \frac{V_{\max}}{V_{\min}} \quad (6)$$

kde  $V_{\min}$  a  $V_{\max}$  je nejmenší a největší objem mobilní fáze, v níž mohou být rozpuštěné látky eluovány.

#### 4.3.3.3 Optimalizace podmínek chromatografické separace

Na základě výše uvedených faktů můžeme říci, že lepšího rozdělení látek (zvýšení rozlišení) docílíme buď zvětšením rozdílu v retenčních časech separovaných látek (termodynamický aspekt) nebo zúžením jejich chromatografických zón (kinetický aspekt). Šířka píků je závislá na rychlosti průtoku mobilní fáze, délce kolony, velikosti částic stacionární fáze a na teplotě (teplota ovlivňuje difúzní koeficienty), tedy na faktorech určujících účinnost chromatografické kolony.

Změna termodynamických aspektů vyžaduje výraznější zásah do chromatografického systému a je ovlivněna změnami stacionární a případně mobilní (u kapalinové chromatografie) fáze a také teplotou (teplota ovlivňuje rozdělovací koeficienty, tedy distribuci analytů mezi stacionární a mobilní fází). Optimalizace složení mobilní fáze se u kapalinové chromatografie využívá velmi často, protože je jednodušší změnit složení rozpouštědel než pořizovat novou chromatografickou kolonu s jiným typem stacionární fáze. Velmi výhodné a časté je použití gradientové eluce, kdy se v průběhu analýzy mění složení rozpouštědel a postupně dochází ke zvyšování eluční síly mobilní fáze. To má velký význam u složitých vzorků obsahujících látky různé polarity. Při menší eluční síle mobilní fáze dochází k eluci látek méně zadržovaných na koloně a postupným zvyšováním eluční síly dochází i k eluci látek více zadržovaných. Tímto postupem můžeme separovat během jedné analýzy i látky velmi rozdílné polarity, což by v případě použití konstantního složení mobilní fáze (izokratická eluce) znamenalo značné prodloužení doby analýzy. Dalším parametrem, kterým je možné optimalizovat chromatografické podmínky, je teplota. Jak už bylo uvedeno, teplota

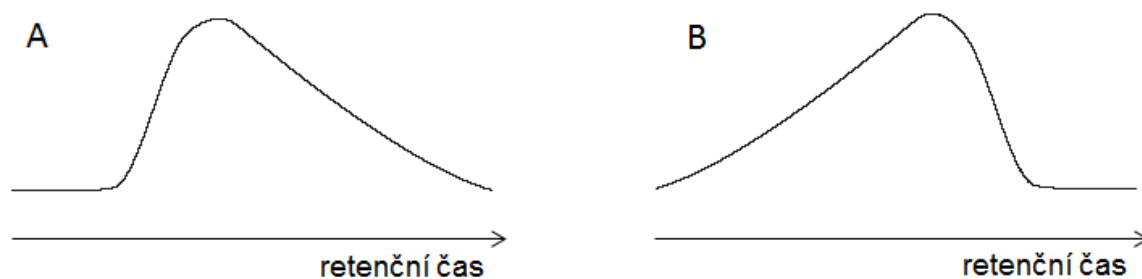
ovlivňuje jak kinetický, tak termodynamický aspekt a nelze jednoznačně odhadnout, jaký bude vliv zvýšení nebo snížení teploty na rozlišení. Změna teploty se při optimalizaci chromatografických podmínek používá jak u kapalinové, tak u plynové chromatografie, i když u plynové chromatografie má mnohem větší význam. U plynové chromatografie se často používá i teplotní program (gradient teploty), kdy se v průběhu analýzy postupně zvyšuje teplota kolony. Při nižších teplotách jsou eluovány látky méně zadržované na koloně a postupným zvyšováním teploty docílíme eluce látek více zadržovaných stacionární fází, bez toho, aby se neúměrně prodlužoval čas analýzy.

V rámci této kapitoly je třeba zmínit ještě kapilární kolony, které se používají zejména v plynové chromatografii (složitější instrumentace brání širšímu využití v kapalinové chromatografii). U kapilárních kolon je stacionární fáze nanášena v tenké vrstvě na vnitřní stěnu kolony. Absence náplně kolony znamená, že se mobilní fáze může pohybovat kolonou za výrazně menšího tlaku. V důsledku toho se mohou vyrábět kapilární kolony mnohem větších délek, než je to možné u náplňových kolon. U kapilárních kolon je odstraněna vířivá difúze a omezen odpor vůči převodu hmoty. Kombinace těchto faktorů s větší délkou kolony vede k přibližně 100-násobnému zvýšení počtu teoretických pater oproti náplňovým kolonám.

#### 4.3.3.4 Vznik nesymetrických píků

V předchozích kapitolách se při popisu chromatografie předpokládalo, že látky eluují z kolony jako symetrické píky s tvarem Gaussovy křivky. Toto ideální chování pozorujeme za předpokladu, že je rozdělovací koeficient  $K_D$  konstantní pro všechny koncentrace analytu. Rozdělovací koeficient je dán poměrem koncentrací analytu ve stacionární a mobilní fázi a charakterizuje rozdělení analytu mezi tyto dvě fáze. Čím je hodnota rozdělovacího koeficientu vyšší, tím je analyt více zadržován stacionární fází a eluuje s vyššími retenčními časy. V některých situacích můžeme pozorovat odchylky od ideálního chování (poměr koncentrací analytu ve stacionární a mobilní fázi není konstantní), což vede k asymetrickým píkům. Na obrázku 17 je příklad „chvostování“, při kterém dochází k rozmytí sestupné části píku. K takovému chování může docházet tehdy, když některá místa na stacionární fázi zadržují rozpuštěné látky silněji než jiná místa nebo je vzorek špatně rozpustný v mobilní fázi (inkompatibilita vzorku se stacionární a/nebo mobilní fází). Další příčinou mohou být i technické potíže na přístroji např. netěsnost nástřikového zařízení nebo rozmytí chromatografické zóny za kolonou (příliš dlouhá cesta mezi kolonou a detektorem).

Druhým typem neideálního chování je pík s rozmytou vzestupnou částí (tzv. „frontující“ pík). Toto chování je nejčastěji důsledkem přetížení kolony (příliš vysoká koncentrace vzorku), případně je eluční síla rozpouštědla vzorku výrazně vyšší než eluční síla použité mobilní fáze. Vznik chvostujícího nebo frontujícího píku může být způsoben také kontaminovanou nebo degradovanou kolonou.



Obr. 17: Chromatografický pík s rozmytou sestupnou částí (A) a s rozmytou vzestupnou částí (B)

#### 4.3.4 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie používá jako mobilní fázi proud plynu, který unáší separované látky kolonou. Mobilní fáze je u plynové chromatografie inertní a nepodílí se na chromatografickém procesu (slouží pouze jako nosný plyn). Aby mohl být vzorek separován, musí se před separací převést do plynné fáze. Plynová chromatografie je tedy vhodná k analýzám plynů a těkavých vzorků. Maximální teplota pro odpaření těkavých vzorků bývá 350 °C (což odpovídá maximální molekulové hmotnosti analytů okolo 600-800 D) i když existují i vysokoteplotní GC schopné pracovat až do teploty 450 °C. Analýza netěkavých vzorků pomocí GC je možná až po jejich převedení na těkavé sloučeniny vhodnou chemickou reakcí. Plynová chromatografie je obvykle využívána pro kvalitativní a kvantitativní analýzu těkavých látek, ale je možno ji použít i v preparativním módu.

Pro výsledek separace je podstatná síla interakcí analytů se stacionární fází a dalším důležitým faktorem je teplota, která určuje parciální tlak par a tím i těkavost analytů a také ovlivňuje rozdělovací koeficienty analytů. To jsou také hlavní parametry chromatografického systému, které optimalizujeme při snaze o rozdělení směsi látek na jednotlivé píky. Z důvodů popsaných v kapitole 2.5.3.3 je v plynové chromatografii velmi rozšířené používání kapilárních kolon. Kapilární kolony jsou obvykle vyrobeny z křemenného skla, které je z

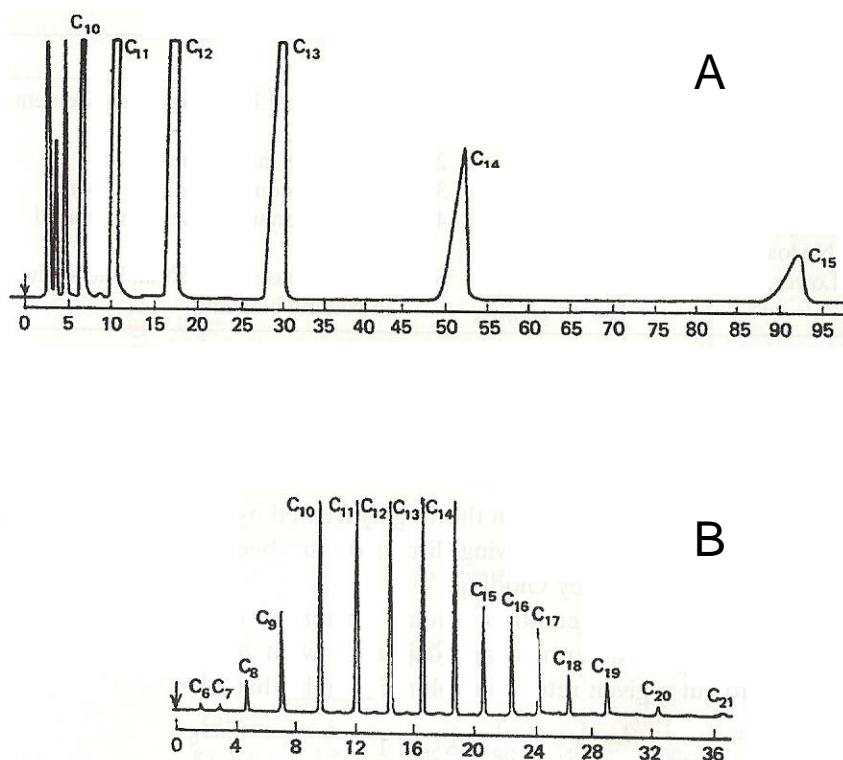
vnější strany potažené vhodným polymerem zajišťujícím odolnost a ohebnost. Náplňové kolony jsou nejčastěji vyrobeny z nerez oceli nebo ze skla. Srovnání typických parametrů kapilárních a náplňových kolon používaných v plynové chromatografii uvádí tabulka 3. Vyšší účinnost kapilárních kolon umožňuje separace analytů s využitím menšího počtu různých stacionárních fází, což zjednodušuje proces optimalizace metody. Výběr vhodné stacionární fáze je nejdůležitější parametr při vývoji chromatografické metody. V současnosti se používají výhradně profesionálně vyráběné kolony, které lze připravit s vysokou reprodukovatelností a které zajišťují vysokou tepelnou a chemickou stabilitu. Obecně jsou stacionární fáze u plynové chromatografie dvojího typu, a to s adsorpčním nebo rozdělovacím mechanismem separace (kapitola 2.5.1). Kolony využívající adsorpční mechanismus jsou většinou náplňové a jako stacionární fáze využívají např. grafitizovaný uhlík, zeolity, silikagel, oxid hlinitý a další. Nejrozsáhlejší využití mají kolony využívající rozdělovací mechanismus separací, kde se jako nepolární stacionární fáze používá např. polydimethylsiloxan a jako polární stacionární fáze např. polyethylenglykol. Tyto uvedené stacionární fáze jsou nejrozšířenější a jejich modifikace (např. výměna methylových skupin dimethylsiloxanu za různě dlouhé alkylové řetězce nebo různá délka polymerního řetězce) určují výsledné vlastnosti jako např. stabilitu, polaritu, účinnost, reprodukovatelnost výroby, apod. Stacionární fáze s rozdělovacím mechanismem separace je u náplňových kolon nanášena na vhodný pevný nosič, kterým je kolona vyplněna a u kapilárních kolon je stacionární fáze nanášena v tenké vrstvě na vnitřní stěnu kolony.

<b>Parametry</b>	<b>Náplňové kolony</b>	<b>Kapilární kolony</b>
<b>Vnější průměr</b>	3,2 mm	0,40 mm
<b>Vnitřní průměr</b>	2,2 mm	0,25 mm
<b>Tloušťka filmu stacionární fáze</b>	5 μm	0,25 μm
<b>Délka kolony</b>	1 – 2 m	15 – 60 m
<b>Průtok mobilní fáze</b>	20 ml min <sup>-1</sup>	1 ml min <sup>-1</sup>
<b>Počet teoretických pater N</b>	6000	180000

Tab. 3: Srovnání typických parametrů kapilárních a náplňových kolon používaných v plynové chromatografii

Teplota je po výběru vhodné stacionární fáze druhou nejvýznamnější proměnnou v plynové chromatografii. Vliv teploty je natolik významný, že se teplotní programy staly

běžnou součástí metod plynové chromatografie. Teplotní program je proces, při kterém se v průběhu analýzy postupně zvyšuje teplota kolony, čímž dojde k urychlení pohybu analytů kolonou a zkrácení retenčních časů. Vliv teplotního programu na průběh separace ukazuje obrázek 18. První separace ukazuje chromatogram směsi alifatických uhlovodíků při konstantní teplotě a druhý separaci stejného vzorku s použitím teplotního programu.



Obr. 18: Porovnání separace alifatických uhlovodíků při konstantní teplotě (A) a při použití teplotního programu (B).

Mobilní fáze používané v chromatografii jsou nejčastěji helium, vodík nebo dusík. Tyto plyny musí být pro účely plynové chromatografie velmi čisté. Nejvíce rozšířené je používání helia, které oproti dusíku vykazuje malou závislost účinnosti kolony na průtoku mobilní fáze. Při vyšších rychlostech průtoku helia dochází jen k mírné ztrátě účinnosti, což zjednodušuje vývoj chromatografické metody a umožňuje použití vyšších průtoků za účelem zkrácení doby analýzy. Vodík má, co se týká vlivu rychlosti průtoku mobilní fáze účinnost kolony, podobné vlastnosti jako helium, ale jeho nevýhodou jsou nutná bezpečnostní opatření zamezující možnému výbuchu.

Jelikož plyny jsou stlačitelné, není rychlost průtoku mobilní fáze konstantní po celé délce kolony, ale vzrůstá od počátku kolony k jejímu konci. Pro zajištění konstantního vstupního tlaku (tedy i vstupního průtoku) je nutné používat v plynové chromatografii speciální regulátory. Co se týče rychlosti průtoku mobilní fáze dalšími částmi chromatografu, jsou na něj kladeny také určité požadavky. Průtok dávkovacím zařízením je požadován velký, aby se vzorek rychle vypláchl a nedošlo k velkému rozmytí. Velký průtok mobilní fáze a velké množství vzorku nejsou pro separace vhodné, proto je součástí instrumentace tzv. dělič (splitter), který před vstupem do kolony odvádí část mobilní fáze se vzorkem pryč. Aby nedošlo v detektoru k rozmytí píků v důsledku dlouhé doby setrvání analytu v detektoru, přidává se před detektorem dodatečné množství nosného plynu, které zaručuje rychlé vymývání eluovaných vzorků z detektoru.

Dávkování vzorku do chromatografického systému se nejčastěji provádí kalibrovanou mikro stříkačkou, a to buď ručně, nebo pomocí automatického dávkovače. Teplota injektoru se volí tak, aby se nadávkovaný vzorek ihned odpařil a následně nekondenzoval. Z těchto důvodů bývá teplota injektoru zpravidla o 50 °C vyšší než teplota kolony.

Plynová chromatografie může být využita kromě kvalitativní a kvantitativní analýzy i v preparativním modu, ale tato aplikace je složitá a vyžaduje složitější přístroj.

#### **4.3.4.1 Detekční metody pro plynovou chromatografii**

Plynová chromatografie se vyznačuje ze všech separačních metod největší nabídkou různých možností detekce a také detektory s největší citlivostí, což je dáno tím, že mobilní fází je indierentní plyn. Při separacích ve fytochemii jsou vzorky často směsí mnoha látek s neznámou strukturou. Z tohoto důvodu je výhodné použití detektorů, které poskytují i strukturní informace o analytech, a to i za cenu částečné ztráty citlivosti. Vybrané možnosti detekce jsou popsány v následujících odstavcích.

##### **Detektor pomocí ionizace plamenem (FID – Flame Ionization Detector)**

FID je jeden z nejpoužívanějších detektorů pro GC. Používá se pro detekci organických sloučenin, včetně sekundárních metabolitů. Princip detekce je založen na spalování analytů vycházejících s GC kolony ve vodíkovém plamenu. Během spalování je generován proud

iontů, který může být měřen. Tato metoda detekce je velmi citlivá (detekční limit v pikogramech), universální pro sekundární metabolity, jednoduchá a poměrně robustní. Nevýhodou je, že neposkytuje žádné informace o struktuře detekovaných látek, je to metoda destruktivní detekce.

### **Detektor FT-infračervenou spektrofotometrií (FT-IR - Fourier Transform Infrared Detector)**

Detekce pomocí FT-IR poskytuje on-line záznam infračerveného spektra. Mnoho látek s jinak podobnými vlastnostmi má rozdílné infračervené spektrum, proto je tato metoda detekce výhodná pro porovnávání s knihovnamí spekter, a současně přináší poměrně velké množství informací pro identifikaci neznámých látek. Výhodou detekce FT-IR je nedestruktivnost, a proto je možno tento detektor zapojit on-line (např. spojení GC-FT-IR-MS). Nevýhodou takové detekce je poměrně vysoká cena, relativně nízká citlivost, a skutečnost, že IR spektra látek v plynné fázi se liší od spekter získaných v roztoku nebo pevné fázi (potřeba speciálních knihoven spekter).

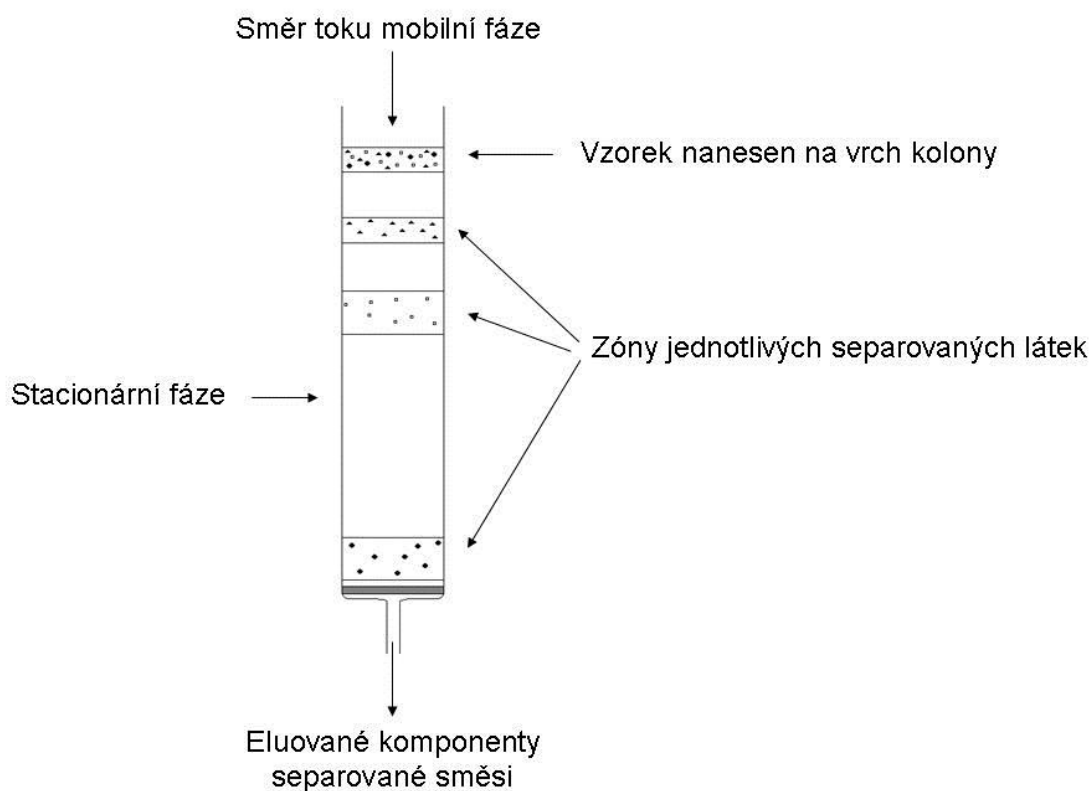
### **Detekce hmotnostní spektrometrií (MS – Mass Spectrometric Detection)**

Hmotnostní spektrometrie (podrobnější popis v kapitole 3.3) jako detekční technika pro GC kombinuje univerzálnost, citlivost a specifčnost. GC může být jednoduchým rozhraním připojena přímo k iontovému zdroji hmotnostního spektrometru. Nejčastěji užívaný způsob ionizace je EI (elektron impact) nebo CI (chemical ionization). Vznikající ionty jsou dále analyzovány obvykle pomocí magnetického pole, kvadrupólu nebo iontové pasti. Hmotnostní spektra jsou obvykle velmi informativní a podobně jako u FT-IR, je možno je využít pro porovnání s knihovnou spekter při identifikaci sloučenin, případně přináší znalosti o struktuře neznámých látek. Je to však destruktivní metoda, může být užívaná až na konci tandemové on-line detekce. Pro preparativní účely je třeba provádět tzv. split (rozdělení) proudu plynu přicházejícího z GC.



### 4.3.5 Klasická sloupcová kapalinová chromatografie

Sloupcová chromatografie v různém uspořádání byla jednou z prvních skutečně rozšířených separačních metod. Podle uspořádání je to metoda, kde stacionární fáze je umístěna v skleněné trubici uzavřené na dolním konci fritou a kohoutem. Mobilní fáze prochází přes stacionární fázi obvykle pomocí gravitace, případně mírným přetlakem nebo podtlakem. Velikost sloupce, na kterém se separace provádí, se může lišit od desítek centimetrů a několika milimetrů v průměru do stovek centimetrů v délce a desítek centimetrů v průměru.



Obr. 19: Sloupcová chromatografie

Pro kolony větších rozměrů je z ekonomických důvodů obvykle používán silikagel, alumina nebo Sephadex (viz kapitola 2.5.6). Nejčastější je použití silikagelu o velikosti částic 60-200  $\mu\text{m}$ . Tyto sloupce nejsou výrobci předpřipraveny a plnění probíhá přímo v laboratoři. Sloupce o velkých rozměrech jsou vhodné pro separace velkých množství materiálu.

Vzhledem k dobré ekonomické dostupnosti používaných sorbentů, ale nižší kvalitě separace, způsobené zejména velkými průměry částic sorbentu, se tento typ chromatografie používá pro první kroky separačního procesu, kdy je nutno zpracovat velké množství materiálu. Pomocí klasické sloupcové chromatografie tak obvykle získáme frakce jako jednoduché směsi látek, které je možno dále zpracovávat jinými typy chromatografie.

Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii je obvykle 2-3 složková, někdy i čtyř složková směs organických rozpouštědel. Obvykle se využívá izokratická eluce (viz kapitola 2.5.7). Jednou ze složek je nepolární rozpouštědlo, druhou polární. Jejich poměrem se upravuje eluční síla mobilní fáze. Třetí složkou bývá acidobazický nebo jiný modifikátor zlepšující dělení. Správné složení mobilní fáze se zjistí opakovanou TLC analýzou, při které je nutno získat chromatogram s oddělenými ohraničenými skvrnami s  $R_f$  v rozmezí 0,2-0,5.

Vzorek na sloupec nanášíme dvěma způsoby. Nejjednodušší je případ, kdy je vzorek dobře rozpustný v použité mobilní fázi. Pak stačí vzorek rozpuštěný v minimálním objemu mobilní fáze nanést na vrch sloupce, nechat „vsáknout“ do sorbentu a separovat. Vzhledem k charakteru zpracovávaného materiálu (směs látek o rozdílné polaritě) je však obvykle rozpustnost vzorku v mobilní fázi omezená. Druhým způsobem nanášení je adsorpce vzorku na malé množství stacionární fáze (cca 1:1). Využívá se v případně špatné rozpustnosti vzorku v mobilní fázi. Vzorek se rozpustí v jakémkoliv vhodném snadno odpařitelném rozpouštědle, přidá se sorbent a následně se rozpouštědlo opatrně odpaří. Adsorbovaný vzorek se nanese na vrch sloupce. Mobilní fáze se pak obvykle přivádí ze zásobníku samospádem přímo na kolonu.

#### **4.3.5.1 Flash chromatografie**

Tzv. flash chromatografie je obdobou klasické sloupcové chromatografie. Pro zlepšení separace se zde využívají sorbenty s menším průměrem částic (okolo 40  $\mu\text{m}$ ). Vysoká hustota takových sorbentů ale snižuje průtok, a proto se pro urychlení separace využívá přetlaku (obvykle vzduchu nebo proudu dusíku) na vstupu nebo podtlaku na výstupu. Sloupce pro flash chromatografii jsou obvykle menších rozměrů než pro klasickou kolonovou chromatografii. Je možno je plnit sorbentem přímo v laboratoři. Pro zlepšení a/nebo zrychlení separace je možno také pořídit zařízení pro flash chromatografii včetně pumpy mobilní fáze a detektoru. Takové systémy pak bývají vybavené kolonami plněnými výrobcem, což obvykle zaručuje jejich homogenitu a tím kvalitnější separaci.

### 4.3.5.2 Detekční metody pro sloupcovou chromatografii

Separace a purifikace látek obsažených v rostlinných extraktech není cílem sama o sobě, obvykle následují další kroky. Pokud je separace prováděna analyticky, následující krok je kvalitativní nebo kvantitativní analýza. V případě preparativní nebo semi-preparativní separace a purifikace následuje stanovení struktury nebo testy biologické aktivity. Během separace je samozřejmě nutné monitorovat přítomnost cílových látek v různých frakcích získaných během procesu. Stejně jako existuje celá řada metod pro extrakci, separaci a purifikaci, existuje i mnoho způsobů jak provádět detekci. Můžeme definovat tzv. on-line nebo off-line detekce. On-line detekce znamená měření přímo během procesu, například okamžitě po výstupu ze separačního procesu. Je využívána zejména v případech analytické separace. Off-line technika je taková, při které je nutný nějaký transfer vzorku a je obvykle využívána v preparativní separaci. On-line technika má své výhody: je rychlá, málo pracná a nehrozí výrazný rozklad vzorku. Na druhou stranu, je obvykle finančně náročná, méně flexibilní, technicky komplikovanější a není ji možno využít ve všech případech. Některé metody detekce je možno použít jak on-line, tak off-line.

Pokud je systém sloupcové chromatografie vybaven on-line detektorem, což není příliš obvyklé, je detekce jednoduchá. Pomocí on-line detektoru snímáme zvolenou charakteristickou vlastnost eluovaných látek (např. absorpci UV/Vis záření apod.). Na základě odezvy detektoru se pak snažíme zachytávat jednotlivé frakce tak, abychom získali jednoduché směsi látek, nebo přímo čisté látky.

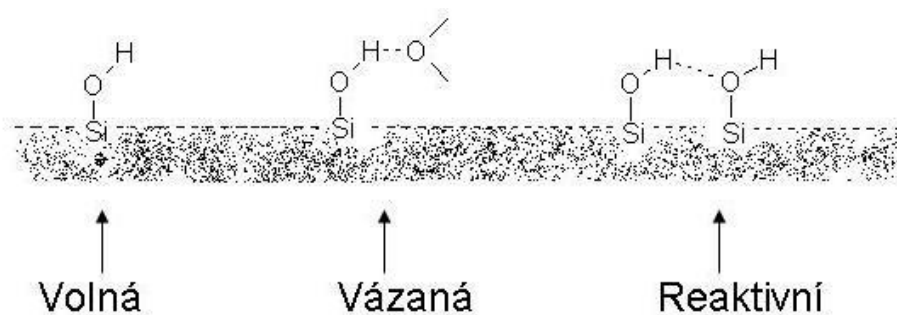
V případě, že on-line detekce není k dispozici, je nutno analyzovat získané frakce. Frakce získáme periodickým sbíráním vytékající mobilní fáze – rozdělované podle objemu nebo podle času. Získané frakce obvykle nanášíme na TLC, analyzujeme a porovnáváme, případně spojujeme na základě vzájemné podobnosti. Pro analýzu podobnosti frakcí může být kromě TLC použito i dalších metod, včetně HPLC.

### 4.3.6 Sorbenty pro kapalinovou chromatografii

#### 4.3.6.1 Silikagel

Silikagel je nejběžnějším sorbentem používaným v chromatografii přírodních látek. Jeho interakce se separovanými látkami je založena na adsorpci. Silikagel je odvozený od

kyseliny křemičité. Precipitací z kyselého roztoku vznikají tzv. primární částice, při jejich růstu dochází k odstranění vody a tvorbě gelu. V této fázi se za kontrolovaných podmínek tvoří trojrozměrná síť a pro promytí a zahřívání na 120 °C vzniká tzv. xerogel neboli silikagel, tj. amorfni porézní materiál. Je to pevná látka s velkým sorpčním povrchem. Do prostoru jsou u silikagelu vystaveny volné OH skupiny a udělejí mu polární charakter (siloxanové skupiny). Tyto skupiny pak mohou interagovat s vodou a dle stupně hydratace má pak silikagel odpovídající polaritu. Hydroxylové skupiny exprimované na povrchu silikagelových částic je možno rozdělit na „volné, vázané a reaktivní“. „Volné“ hydroxylové skupiny jsou přístupné pro adsorpci zejména pomocí vodíkových můstků a mění se ve „vázané“. „Reaktivní“ skupiny vznikají asociací sousedících volných hydroxylů. Poměr jednotlivých typů se mění zejména termální aktivací/deaktivací (optimum 200 °C) a ovlivňuje chromatografické vlastnosti silikagelu (Obr. 20).



Obr. 20: Schematický náčrt silikagelu s popisem charakteru silanolových skupin

Silikagel je universální a hodí se pro separaci většiny látek, pouze látky silně bazické se na něj ireversibilně vážou díky jeho kyselé reakci. Za běžných podmínek je na silikagelu možno separovat spíše látky lišící se přítomností a počtem polárních funkčních skupin. Rozdíly v lipofilních částech molekuly jsou pro separaci méně významné.

Syntéza silikagelu umožňuje tvorbu částic s řízenou porozitou a o jednotné velikosti. Prakticky se pro chromatografii využívají silikagely o velikosti částic menší než 100 μm, podle typu aplikace.

#### 4.3.6.2 Alumina

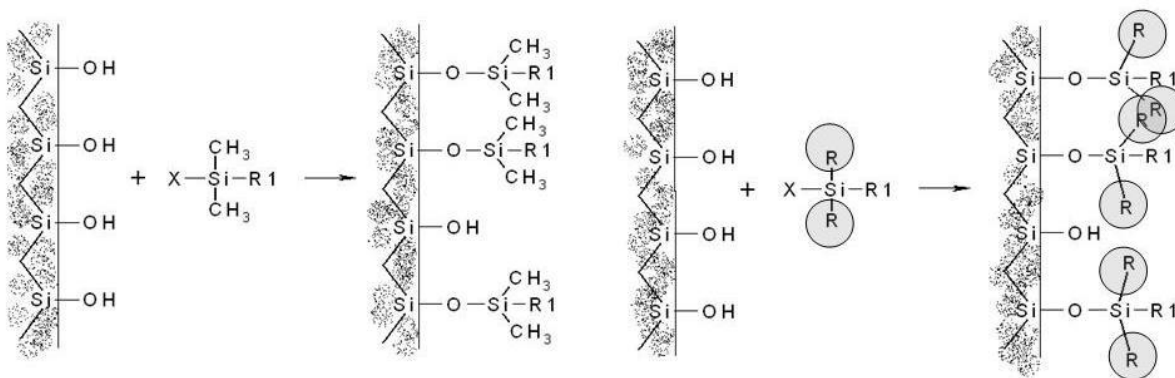
Oxid hlinitý (alumina) je sorbent používaný alternativně k silikagelu pro adsorpční chromatografii. Je to polární sorbent. Je vhodný pro dělení zejména méně polárních látek, odlišných stericky nebo funkční skupinou, zejména takovou, která umožňuje tvorbu intramolekulárních vodíkových vazeb. Přítomnost dvojných vazeb ve struktuře separovaných látek zvyšuje interakci s tímto sorbentem.

Idealizovaná povrchová struktura představuje vrstvu hliníkových kationtů a vrstvu tvořenou ionty kyslíku. Za běžných podmínek je na povrchu sorpčně vázaná voda. Při zahřívání se voda částečně desorbuje a tvoří se povrchové hydroxylové skupiny. Hydroxylové skupiny na povrchu sorbentu ale nejsou základem pro adsorpci separovaných látek. Přítomnost hliníkových a kyslíkových atomů generuje silné elektrostatické pole, na jehož základě se pak tvoří v principu tři adsorpční centra. Pozitivní pole je formováno centry s kyselým charakterem, centra bazického typu mají proton akceptorové vlastnosti a jsou formovány nad kyslíkovými atomy nebo jsou tvořena ionizovatelnými hydroxyly, třetí typ jsou centra s elektron akceptorovými vlastnostmi. Princip adsorpce je tedy odlišný od adsorpce na silikagelu.

Oxid hlinitý je možno použít v kyselé, zásadité nebo neutrální variantě. V mobilní fázi obsahující vodu se na kyselém oxidu hlinitém dělí kyselá látka (fenoly, karboxylové kyseliny, aminokyseliny), aminy a iminy na zásaditém (alkaloidy), na neutrálním aldehydy, ketony a laktony. V bezvodém prostředí jsou obvyklé separace na bazickém oxidu hlinitém (alkaloidy, karotenoidy, aromatické uhlovodíky, steroidy). Tento sorbent je reaktivnější než silikagel, což může u určitých vzorků způsobit problémy a nevratnou sorpci. Obvykle využíváný je sorbent s částicemi menšími než 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.6.3 Modifikovaný silikagel

Aplikace chlorodimethylalkylsilanů, chloroalkoxysilanů nebo dalších činidel na chromatografický silikagel vede reakcí s volnými hydroxylovými skupinami k transformaci polární stacionární fáze na nepolární. Současná technologie zajišťuje tvorbu částic s jednovrstevným pravidelným lipofilním povrchem. Pro přípravu nepolárních fází jsou používány C-2, C-4, C-6, C-8 nebo C-18 alkyly, ale spektrum může být samozřejmě širší.



Obr. 21: Schéma přípravy modifikovaného silikagelu. X – halogen, R1 – alkyl, např. C8, C18, aryl a pod., R – objemný substituent pro stericke bránění volných hydroxylů

V separaci přírodních látek jsou nejčastěji používány C-8 a C-18 sorbenty (oktyl a oktadecylované silikagely). Nezaregované volné hydroxyly silikagelu jsou následně odstraňovány procesem tzv. end-cappingem, tj. reakcí s chlormethylsilanolem. V případě neodstranění volných hydroxylů na povrchu silikagelu zůstává částečně zachován hydrofilní charakter sorbentu, což může při separaci působit komplikace, např. rozšiřování píků nebo tzv. tailing (chvostování).

Podrobnosti k separaci pomocí modifikovaných silikagelů naleznete v kapitole 2.5.7. Pro aplikaci v klasické sloupcové chromatografii jsou modifikované silikagely používány omezeně. Limitujícím faktorem je zejména cena podstatně vyšší než pro ostatní sorbenty. Výjimečné separační schopnosti a schopnost vysokého rozlišení je umožňují použít ve flash chromatografii.

#### 4.3.6.4 Polyamidy

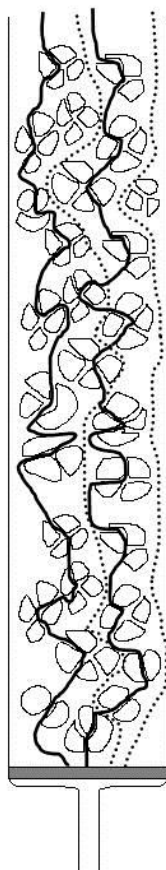
Polyamidy (polykaprolaktam, polyhexamethyldiaminoadipát, polyaminoundekanoát) jsou sorbenty, jejichž separační schopnost je založena na tvorbě vodíkových můstků. Počet a síla vodíkových vazeb závisí od charakteru separované látky (fenoly, hydroxyly, karbonyly), eluce pak na schopnosti použité mobilní fáze štěpit vytvořené vodíkové můstky. Typická je separace fenolů, indolů, steroidů a dalších látek.

#### **4.3.6.5 Celulóza**

Celulóza je sorbent používaný zejména pro chromatografii vysoce polárních látek, jako jsou např. cukry. Základy chromatografie na celulóze jsou v podstatě shodné s papírovou chromatografií. Při zadržování analytů na sorbentu se uplatňuje princip rozdělovací chromatografie, kdy se jako stacionární fáze chová voda zakotvená na povrchu celulózy. Kromě rozdělování se ale projevuje i adsorpce a iontová výměna. Výsledná retence analytů je tedy kombinací několika faktorů.

#### **4.3.6.6 Sephadex LH-20**

Pro izolaci zejména labilních molekul jsou vhodné inertní polymery tvořené polysacharidy. Polysacharidy mohou být provázány a pak tvoří trojrozměrnou síť. Sephadex je gel vznikající reakcí ve vodě rozpustného dextranu s epichlorhydrinem. Vzniklý, ve vodě nerozpustný polymer, je zesíťován etherovými můstky. Tento materiál bobtná absorpcí určitého množství vody. Nabobtnalé částice jsou schopné chromatograficky separovat podle molekulové hmotnosti. Stupeň bobtnání určuje chromatografické vlastnosti gelu – čím hustší gel, tím menší částice je možno dělit.



Obr. 22: Schématický nákres separace pomocí tzv. size exclusion chromatografie. Menší částice (plná čára) pronikají do porézního materiálu snadněji než větší částice (přerušovaně) a jsou gelem zadržovány.

Sephadex LH-20 je hydroxypropyl derivát Sephadexu G-25. Hydroxypropyl derivatizace mu dodává lipofilitu při zachování hydrofilních vlastností. Tento gel bobtná v polárních rozpouštědlech (voda, methanol, tetrahydrofuran). Schopnost interakce s organickými rozpouštědly a lipofilita tento gel zvýhodňují pro použití v separaci v organických rozpouštědlech rozpustných přírodních látek. Při použití jednosložkové mobilní fáze jsou látky separovány na základě molekulové hmotnosti, částice s molekulovou hmotností větší než 4000 už nejsou zachytávány a elují bez interakce. Při užití směsi rozpouštědel je polárnější z nich absorbováno gelem preferenčně. Tento je má za následek vytvoření dvou fázového systému s odlišnou stacionární a mobilní fází a ke gelové filtraci se přidává rozdělovací chromatografie, výsledkem je tzv. směsný mód separace. Nejlepších výsledků je pak dosaženo optimalizací dvousložkové mobilní fáze složené z polárního a nepolárního rozpouštědla. Pro fenolické sloučeniny a heterocykly, které jsou zadržovány



Sephadexem velmi silně, je pak popisován ještě jiný blíže nespecifikovaný mechanismus separace, zejména pokud je jako mobilní fáze používán nízko molekulární alkohol.

Dextranové gely obecně jsou inertní a nevzniká žádná ireversibilní interakce se separovanými látkami. Výhodou užití těchto gelů je také možnost opakovaného použití bez komplikované regenerace.

#### **4.3.7 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

HPLC dosahuje vysokých účinností separací oproti klasické sloupcové chromatografii. Je to dáno použitím stacionárních fází tvořených malými částicemi (obvykle  $\leq 5 \mu\text{m}$ ) pravidelného tvaru, které homogenně vyplňují kolonu (viz kapitola 2.5.3.2). Průtok mobilní fáze kolonou je při těchto podmínkách možný pouze pod vysokým tlakem (obvykle jednotky až desítky MPa), což vyžaduje použití vysokotlakých pump. Výhodou kapalinové chromatografie oproti plynové je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze. V HPLC je možné používat velké množství stacionárních fází založených na různých principech separace (viz kapitola 2.5.1), ale pro fytochemické aplikace mají největší význam chemicky vázané fáze (zejména reverzní fáze, RP-HPLC). Proto bude další popis zaměřen zejména na stacionární fáze tohoto typu.

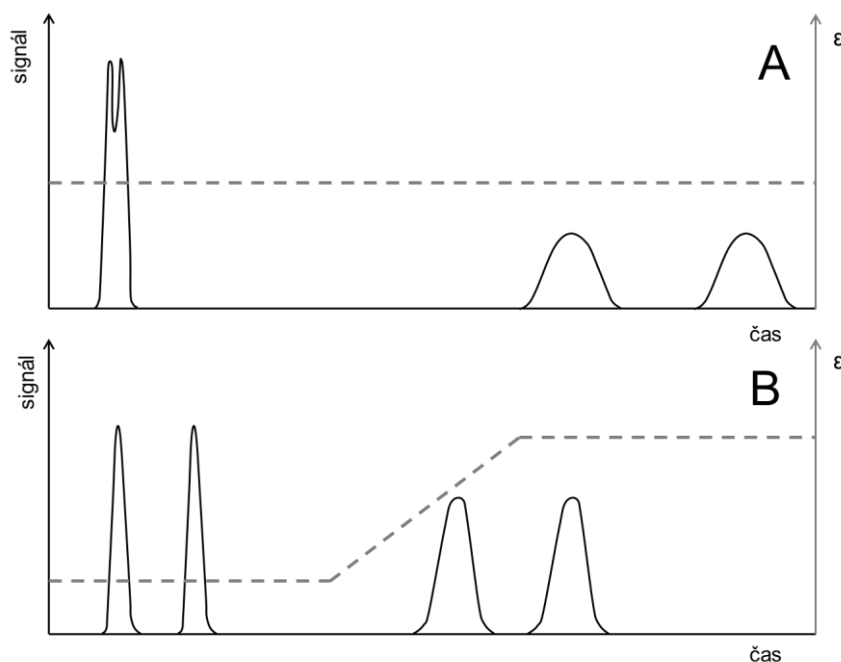
Chromatografické kolony používané v HPLC jsou vyráběné komerčně, tak aby byla zaručena reprodukovatelnost výroby (velikost částic, homogenní vyplnění kolony, apod.). Kolony musí odolávat vysokým tlakům používaným v HPLC a jsou vyráběny většinou z nerez oceli. Kromě kolon vyplněných částicemi stacionární fáze se někdy používají tzv. monolitické stacionární fáze, kdy je kolona vyplněna polymerem o definované pórovitosti. Výhodou těchto stacionárních fází je, že vyplňují prostor v koloně kompaktněji než částice stacionární fáze, vykazují velkou mechanickou stabilitu, jsou odolné vůči změnám pH a mají velkou účinnost separace při vysokých průtocích mobilní fáze (zkrácení doby analýzy). Přes uvedené výhody jsou v praxi stále nejpoužívanější tradiční náplňové kolony. Při běžných analytických aplikacích bývá délka kolony mezi 5-25 cm a vnitřní průměr 2-5 mm. Velikosti kolony je nutné přizpůsobit i rychlost průtoku mobilní fáze, která má vliv na účinnost kolony a navíc při použití velkých průtoků a menší kolony by došlo k neúměrnému zvýšení tlaku v systému. Obvyklé průtoky mobilní fáze bývají  $0,2-1,5 \text{ ml min}^{-1}$ . U preparativní chromatografie jsou používané rozměry kolon 25-50 cm, s vnitřním průměrem 1-5 cm,

velikostí částic stacionární fáze 5-10  $\mu\text{m}$ . I rychlosti průtoků mobilní fáze jsou větší a pohybují se v rozmezí 5-50  $\text{ml min}^{-1}$ .

Reverzní fáze patří v HPLC mezi nejpoužívanější, protože mají řadu výhod oproti jiným typům stacionárních fází. Umožňují separovat analyty s širokým rozsahem polarit, k dispozici je dostatečná nabídka modifikací reverzních fází s požadovanými vlastnostmi, výsledky jsou dobře reprodukovatelné a jako mobilní fáze je možné používat relativně levná a dostupná rozpouštědla. Nejběžnějším nosičem pro chemicky vázané fáze (včetně reverzních fází) je silikagel. Silikagel obsahuje ve své struktuře volné OH skupiny (Si-OH), které mohou být nahrazeny různými funkčními skupinami s různými vlastnostmi (Obr. 20 a 21). Nejběžněji používanou chemicky vázanou fází je silikagel s navázanými oktadecylovými řetězci (C18), případně kratšími alkyly jako je oktyl (C8). Nevýhodou silikagelu je zejména stabilita omezená jen v určitém rozsahu hodnot pH (obvykle 2-8). Druhou nevýhodou je přítomnost nezreagovaných OH skupin silikagelu, což má za následek nežádoucí adsorpci. K dispozici jsou ale i tzv. endkapované stacionární fáze, u kterých je část volných OH skupin deaktivována.

Jak již bylo uvedeno výše, složení mobilní fáze významným způsobem ovlivňuje separační proces. Při použití reverzních stacionárních fází se jako mobilní fáze používá voda (většinou tlumivý roztok nebo roztok slabé kyseliny o definovaném pH) s přídavkem organického rozpouštědla (např. methanol, acetonitril, isopropanol, tetrahydrofuran). Složení mobilní fáze ovlivňujeme změnami poměru vodné a organické složky, změnami použitého organického rozpouštědla a u analytů schopných ionizace též změnami pH nebo iontově párovými činidly. Reverzní stacionární fáze jsou nepolární, a proto by použitá mobilní fáze měla obsahovat alespoň 10 % organické složky (čistě vodná mobilní fáze nesmáčí nepolární stacionární fázi). Mobilní fáze je charakterizována především svou eluční silou ( $\epsilon$ ). S klesající polaritou mobilní fáze (vyšší obsah organické složky) roste její eluční síla (klesají retenční časy). Složení mobilní fáze může být konstantní po celou dobu analýzy (izokratická eluce) nebo se může průběžně měnit (gradientová eluce). V průběhu gradientové eluce se v RP-HPLC zvyšuje obsah méně polární organické složky na úkor více polární vodné a tím se průběžně zvyšuje i eluční síla mobilní fáze. Obecně se gradientová eluce používá pro vzorky s odlišnými afinitami ke stacionární fázi. Obrázek 23 ukazuje izokratickou a gradientovou separaci stejné směsi látek. V případě izokratické eluce nejsou první píky dostatečně odděleny a poslední píky jsou nízké a rozšířené s velmi velkými retenčními časy. Z toho vyplývá, že eluční síla mobilní fáze je velká pro látky s nízkými retenčními časy a nízká pro látky s vyššími retenčními časy (látky jsou silně poutány stacionární fází). Řešením tohoto

problému je začít separaci s nižší eluční silou mobilní fáze (eluze látek, které jsou méně poutány stacionární fází) a postupně ji v průběhu analýzy zvyšovat. Obecně vede gradientové eluce k zúžení chromatografických píků, optimalizaci selektivity a zkrácení doby analýzy.

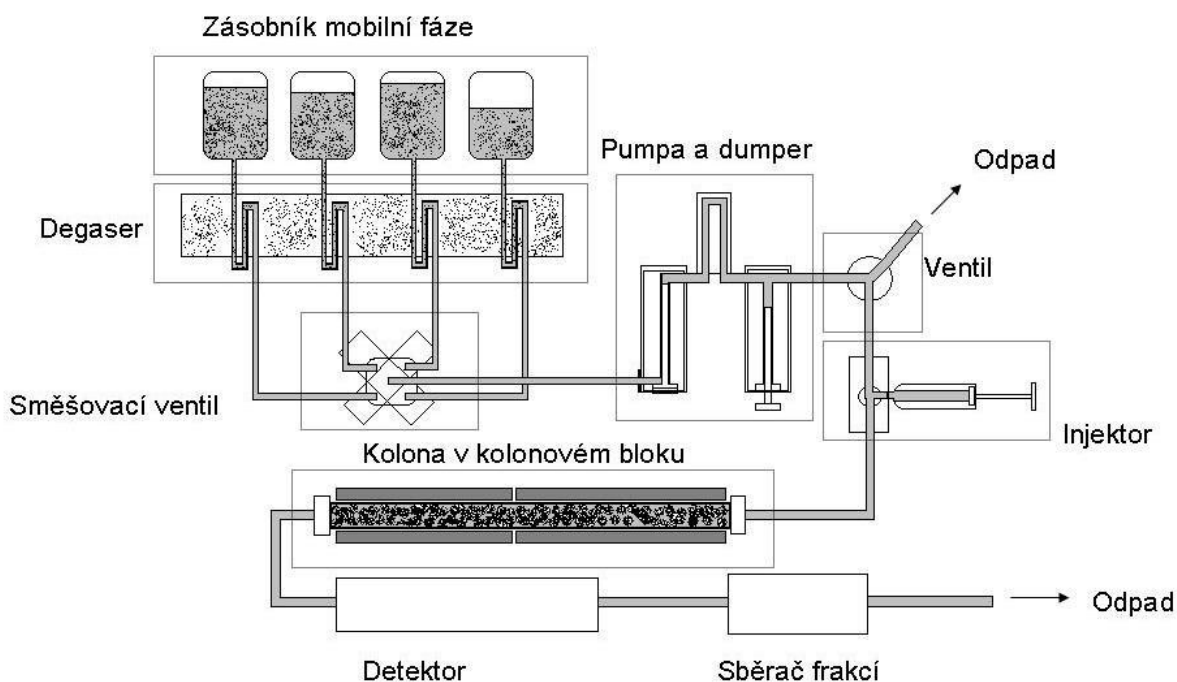


Obr. 23: Porovnání izokratické (A) a gradientové separace (B) směsi látek s různou polaritou;  $\epsilon$  – eluční síla mobilní fáze.

Kromě výběru chromatografické kolony (tj. typu stacionární fáze, délky kolony, velikosti částic), složení mobilní fáze a rychlosti jejího průtoku můžeme výsledek separace ovlivnit ještě teplotou. V každém případě je vhodné používat při chromatografických separacích termostat, který umožňuje kontrolovat teplotu kolony tak, aby byly zaručeny konstantní podmínky separace při analýzách v různých dnech. Změna teploty nemá na separaci tak výrazný vliv jako u plynové chromatografie a nelze ani jednoznačně určit jaký bude vliv jejího zvýšení nebo snížení na rozlišení (viz kapitola 2.5.3.3). Při optimalizaci podmínek separace je vhodné vliv teploty ověřit a zjistit, zda nemůže být separace provedena s lepším výsledkem. Maximální rozsah používaných teplot pro chemicky vázané fáze je přibližně 10-80 °C.

Zařízení pro HPLC je mnohem složitější než u klasické sloupcové kapalinové chromatografie, což je dáno zejména vysokými tlaky mobilní fáze (Obr. 24). Aby byl zajištěn průtok mobilní fáze systémem, používají se vysokotlaké pumpy. Na tyto pumpy jsou kladeny velké nároky, protože musí zajistit konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní průtok mobilní fáze. Většina komerčních přístrojů obsahuje tzv. směšovač, kde dochází k míchání

jednotlivých složek mobilní fáze podle předem zadaného programu. Směšovač je nutnou součástí instrumentace v případě, že chceme používat gradientovou eluci. Na mobilní fáze jsou kladeny také zvláštní požadavky, a to zejména na jejich čistotu. Pro HPLC aplikace jsou komerčně dostupná speciálně čištěná rozpouštědla. Vzduch rozpuštěný v mobilní fázi může být příčinou vzniku bublin v systému a následného zvýšení šumu detektoru. Proto je nutné před analýzou provádět odplynění mobilní fáze. Odplyňovací zařízení bývá buď přímo součástí instrumentace (pracuje na principu podtlaku) nebo se mobilní fáze odplyňuje zvlášť (např. pomocí ultrazvuku nebo probubláváním heliem). Zvolené složení mobilní fáze musí být kompatibilní s použitým typem detektoru (např. při UV/Vis detekci nesmí složky mobilní fáze příliš absorbovat při měřených vlnových délkách). Další součástí instrumentace je dávkovací zařízení (vysokotlaký ventil), které dávkuje rozpuštěný vzorek do toku mobilní fáze. Dávkování vzorku je u některých přístrojů automatizováno a probíhá podle předem zadaného programu. Dávkování vzorku musí být reprodukovatelné, aby byla zajištěna dostatečná přesnost při kvantitativní analýze. Dávkované objemy jsou obvykle v rozsahu 1-100  $\mu\text{l}$ . Nadávkovaný vzorek je unášen tokem mobilní fáze do chromatografické kolony a následně do detektoru.



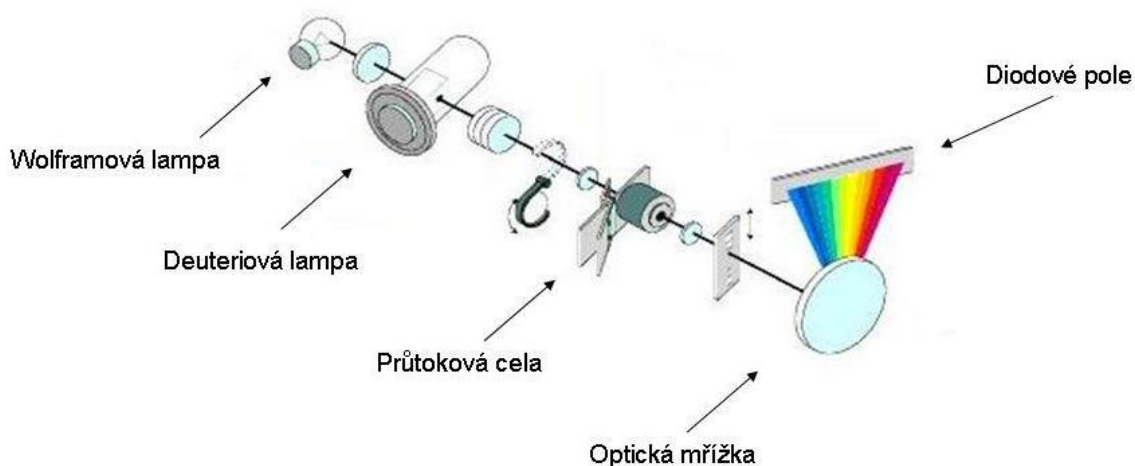
Obr. 24: Schematické znázornění zařízení pro HPLC

### 4.3.7.1 Detekční metody pro HPLC

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se dávkuje malá množství vzorku, proto jsou k detekci nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální sledování látek na výstupu z kolony.

#### Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory patří k nejrozšířenějším detektorům používaným ve spojení s HPLC. Důvodem je relativně nízká cena, spolehlivost, možnost detekce velké skupiny látek (všechny látky, které vykazují absorpci v oblasti 200-800 nm) a kompatibilita s gradientovou elucí. Principy absorpce ultrafialového a viditelného záření jsou popsány v kapitole 3.2.2. Používají se buď detektory schopné měřit absorbanci při jedné případně více zvolených vlnových délkách, nebo detektory schopné zaznamenat celé spektrum v UV/Vis oblasti (opakované rychlé skenování roztoku procházejícího měřicí celou). Zaznamenání celého spektra (tzv. detektor s diodovým polem – DAD, obr. 25) poskytuje mnohem víc informací, což můžeme využít při identifikaci látek (porovnání spektra se standardem) nebo při určení čistoty píku (změna spektra v různých částech píku ukazuje na směs nerozlišených analytů).



Obr. 25: Schematický nákres detektoru s diodovým polem (převzato a upraveno z materiálů HPST se souhlasem firmy)

## **Fluorimetrické detektory**

Tyto detektory jsou selektivní pro látky, které vykazují přirozenou fluorescenci (nebo byly převedeny na fluoreskující derivát vhodnou chemickou reakcí). Počet látek, které jimi můžeme detekovat, není tak velký jako u spektrofotometrických detektorů, ale oproti nim vykazují o několik řádů vyšší citlivost (100-1000 krát citlivější). Vysoká citlivost je využívána zejména při stopových analýzách, selektivita potom při analýzách v komplikovaných maticích.

## **Elektrochemické detektory**

Elektrochemické detektory měří elektrickou veličinu (elektroodvý potenciál, proud) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce. Elektrochemické detektory lze tedy využít k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). Jedná se o selektivní a citlivé detektory. Nejčastěji se využívají ampérometrické detektory (měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky) nebo coulometrické detektory (měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky).

## **Refraktometrické detektory**

Jsou to univerzální detektory. Měří změnu indexu lomu v analytické cele detektoru. Tyto změny jsou malé, a proto je refraktometrický detektor málo citlivý. Další jeho nevýhodou je nemožnost použít gradientovou eluci. Využívají se zejména v případech, kdy ostatní detektory neposkytují dostatečnou odezvu (např. neabsorbují v UV/Vis oblasti – analýza cukrů).

## **Výparné detektory rozptylu světla (evaporative light scattering)**

Princip detekce je založen na zmlžení a následném odpaření mobilní fáze a převedení detekovaných látek na pevné částice. Tyto částice procházejí skrz laserový paprsek detektoru, čímž dochází k rozptylu jeho záření. Rozptýlené záření je měřeno pomocí vhodné fotodiody. Tento typ detektoru se řadí mezi univerzální, i když to neplatí zcela. Není vhodný k detekci těkavých látek, které mohou být odpařeny s mobilní fází. Dalším omezením je, že může pracovat jen s těkavými mobilními fázemi. Jeho výhodou oproti refraktometrickému detektoru je vyšší citlivost a možnost použití pro gradientovou eluci. Využití nachází při analýzách látek, u kterých ostatní detektory neposkytují dostatečnou odezvu (např. analýza cukrů nebo mastných kyselin).

## **Hmotnostní detektory**

Instrumentace a principy hmotnostní spektrometrie jsou podrobněji popsány v kapitole 3.3. Jedná se o citlivé detektory s vysokou selektivitou a možností detekce velké skupiny látek. Nevýhodou je vyšší cena oproti ostatním uvedeným typům detektorů. Dalším omezením tohoto typu detekce je nutnost omezit přítomnost některých pufrujících přísad (např. fosfátů) v mobilní fázi. Základním předpokladem pro možnou detekci analytů pomocí MS je odstranění mobilní fáze před ionizací. K tomuto účelu se nejčastěji používají sprejové ionizační techniky typu elektrospreje (ESI). Vznikající ionty jsou dále analyzovány obvykle pomocí kvadrupólu (viz kapitola 3.3.2), iontové pasti nebo průletového analyzátoru (TOF). Moderní hmotnostní spektrometry jsou schopné určit molekulovou hmotnost separované látky a dále provést fragmentaci molekulového iontu. Vzniklé fragmentové ionty jsou dále detekovány a získané hmotnostní spektrum lze využít při strukturní charakterizaci separovaných látek.

## **5 Metody identifikace rostlinných sekundárních metabolitů**

### **5.1 Úvod**

Stanovit strukturu přírodní látky je úkol založený na znalosti chemie, fyziky a studiu literatury. Určení struktury zahrnuje: počet a charakter atomů, charakter vazeb, konfigurace, konformace. Každá z těchto charakteristik je určována jinou metodou a jednotlivé metody přispívající k identifikaci přírodních látek budou dále popsány. Nebudeme se zabývat podrobnou teorií jednotlivých metod, ale spíše jejich využitím pro identifikaci přírodních látek.

### **5.2 Spektroskopické metody**

#### **5.2.1 Infračervená spektroskopie (IČ)**

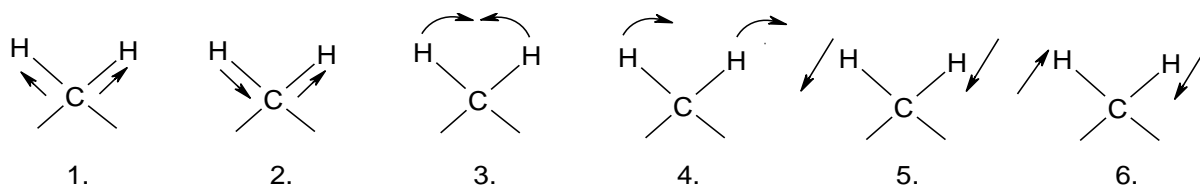
Infračervená spektroskopie je založená na absorpci infračerveného záření testovanou látkou. Infračervená část spektra se z praktických důvodů dělí na 3 oblasti: vzdálenou (1000-30  $\mu\text{m}$ ), střední (30-2,5  $\mu\text{m}$ ) a blízkou (2,5-0,8  $\mu\text{m}$ ). Pro strukturní analýzu je nejčastěji využívána střední infračervená oblast.

Molekuly mají na sobě obvykle nějakým způsobem rozložený náboj. Podle toho jaké atomy se účastní vazby, převažuje na nich parciální kladný nebo záporný náboj. Výsledkem tohoto nesymetrického rozložení elektrického náboje je vznik dipólového momentu molekuly. Pokud má být molekula látky v infračervené oblasti absorpce aktivní, musí být vibrace vazby spojená se změnou dipólového momentu. V případě symetrických molekul (např.  $\text{N}_2$ ) nedochází při vibraci vazby ke změně dipólového momentu, a proto neabsorbují v infračerveném spektru. U nesymetrických molekul (např.  $\text{CO}$ ) při vibraci dochází ke změně dipólového momentu, což se projeví absorpcí. Složité molekuly (jako jsou přírodní látky) mají mnoho vazeb, a proto pozorujeme na jejich infračervených spektrech mnoho absorpčních pásů.



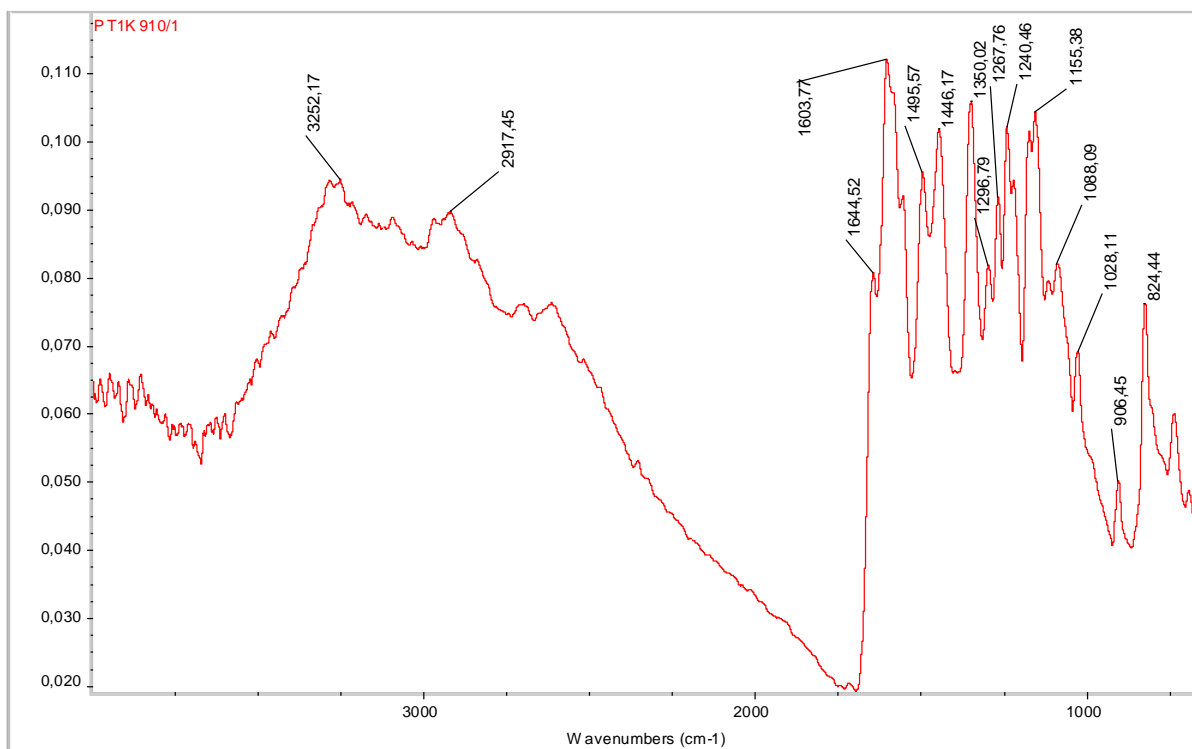
Molekuly látek mohou absorbovat elektromagnetické záření specifických frekvencí, které odpovídají jejich struktuře. Za normálních podmínek jsou atomy v molekulách vázány vazbami a kmitají kolem své rovnovážné polohy. Část infračerveného záření, které je molekulou absorbováno, odpovídá tzv. rezonančním frekvencím, tzn. frekvence absorbovaného záření odpovídá frekvenci vibrace vazby mezi atomy v měřené molekule. Energie a tím i frekvence vibrace závisí na hmotě atomů a síle vazby mezi nimi. Protože frekvence vibrace závisí na druhu vazeb v molekule, budou absorbované vlnové délky různé pro odlišné molekuly, což je příčina vzniku charakteristických vibračních pásů dané molekuly nebo funkční skupiny.

Kromě valenčních vibrací (stretching), při kterých se při vibraci mění délka vazby, lze pozorovat i tzv. deformační vibrace (bending), při nichž se mění úhel vazby. Valenční vibrace se dále klasifikují jako symetrické a asymetrické. Deformační vibrace se dále dělí na nůžkové (scissoring), kyvadlové (wagging), vějířové (rocking) a kroutivé (twisting).



Obr. 26: Typy valenčních a deformačních vibrací C-H vazby; symetrická (symmetric stretch) (1), asymetrická (asymmetric stretch) (2), nůžková (*in plane* scissoring) (3), vějířová (*in plane* rocking) (4), kyvadlová (*out of plane* wagging) (5), kroutivá (*out of plane* twisting) (6).

Pro strukturní analýzu přírodních látek je používána střední oblast infračerveného spektra (30-2,5  $\mu\text{m}$ ). Pro praktické účely popisujeme spektrum ne vlnovou délkou, ale vlnočtem, což je převrácená hodnota vlnové délky s jednotkou  $\text{cm}^{-1}$ . V praxi se tak pro analýzu využívá oblast 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Střední infračervenou oblast lze rozdělit na 3 části: 4000-1300  $\text{cm}^{-1}$  – oblast charakteristických silných vibrací, 1300-600  $\text{cm}^{-1}$  – oblast otisku prstu, z které je někdy vyčleněna oblast 900-600  $\text{cm}^{-1}$  – oblast absorpce benzenového jádra.



Obr. 27: Příklad infračerveného spektra (geranylovaný flavanon)

Oblast charakteristických vibrací je typická intenzivními absorpčními pásy s charakteristickými vlničky, které je možno přiřadit poměrně spolehlivě různým funkčním skupinám. Funkční skupiny jsou složeny z různých atomů, obvykle s rozdílnou elektronegativitou, a od skeletu látky izolovaných vazbou uhlík-uhlík. To při vibracích přináší výraznou změnu dipólového momentu, a proto i intenzivní absorpci v infračerveném spektru. Přírodní látky jsou obvykle složeny z uhlíku, vodíku, kyslíku a dusíku, proto se můžeme omezit jen na popis těch nejzákladnějších příkladů takových funkčních skupin (Tab. 4).

Typ vazby	Typ sloučeniny	Rozsah typických frekvencí, typ vibrace
<b>C-H</b>	Alkany	2960-2850 (s) stretch
		1470-1350 (w) scissoring a bending
	Alkeny	3080-3020 (m) stretch
		1000-675 (s) bend
	Aromatické sloučeniny	3000 stretch
		1050-1020 <i>in plane</i> bend 1040 <i>out of plane</i> bend
<b>C-O</b>	Aromatické sloučeniny	1600-1400 stretch kruhu
	Alkoholy, ethery, karboxylové kyseliny, estery	1260-1000 (s) stretch
<b>C=O</b>	Aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny, estery	1760-1670 (s) stretch
<b>O-H</b>	Primární alkoholy	3640-3160 (s, br) stretch
	Alkoholy a fenoly s vodíkovým můstkem	3600-3200 (br) stretch
	Karboxylové kyseliny	3000-2500 (br) stretch
<b>N-H</b>	Primární aminy	3500 a 3400 stretch (w)
		1650-1580 bending (m-s)
	Sekundární aminy	3350-3310 stretch (w) 1515 bending
<b>C-N</b>	Primární, sekundární i terciární aminy	909-666 wagging (kapalné vzorky)
		1250-1020 stretch
	Aromatické aminy	1342-1266 stretch

Tabulka 4: Příklady typických vazeb a rozsahy frekvencí (s – strong, m – medium, w – weak, br – broad)

Oblast otisku prstu je zajímavá pro porovnávání látek s knihovnamí spekter nebo látek mezi sebou. V této oblasti už se poměrně nesnadno určuje strukturní charakteristika

zodpovědná za absorpční pás, protože je zde celá řada méně intenzivních absorpčních pásů a pásů s výraznými překryty. Projevují se zde především vibrace vazeb uhlík-uhlík a jiné skeletární vibrace. Každá látka je skeletárními vibracemi charakteristická a shoda infračervených spekter v této části znamená shodu ve struktuře.

Použití infračervené spektroskopie ve fytochemii v kontextu s rozšířením NMR analýzy (kapitola 3.4) poněkud ztratilo na významu, přesto mohou být IR spektra zajímavým nástrojem strukturní analýzy. Pomocí analýzy oblasti charakteristických vibrací je možno identifikovat charakteristické funkční skupiny a usnadnit tak další analýzu. Porovnáním s knihovnou spekter nebo se standardem je možno neznámou látku identifikovat. Analýzou spekter je možno zjistit čistotu a odhalit přítomnost konkrétních nečistot. Sledováním intenzity vybraného absorpčního pásu je možno provést i kvantitativní analýzu, a to i ve směsi nebo v matrici. Při kvantitativní analýze musí existovat v infračerveném spektru absorpční pás analytu, který není překrytý absorpčními pásy dalších složek směsi, nebo je třeba předchozí separace směsi (často pomocí TLC). Sledováním změn v infračerveném spektru je možno monitorovat také průběh jednoduchých chemických reakcí (podobně jako v UV/Vis spektrofotometrii).

Spektrum v infračerveném světle lze měřit jak pro kapalně, tak plynné a pevné vzorky. Záleží na technickém řešení přístroje. U přírodních látek měření v plynném stavu příliš nevyužijeme (kromě on-line detekce GC). V úvahu proto připadají pevné a kapalně vzorky.

Ve formě kapalného vzorku můžeme měřit kapaliny nebo pevné látky ve formě roztoku. Infračervená spektra-roztoků obvykle vykazují od spekter naměřených v pevném stavu rozdíly způsobené interakcí látky a rozpouštědla. Měří se v různých rozpouštědlech, podmínkou je absorpce rozpouštědla v jiné oblasti spektra než vzorek. Pro měření je nutná krátká optická dráha, proto měření probíhá v kyvetách o tloušťce vrstvy 0,1 mm, nebo je vzorek injektován mezi dvě křemenné destičky nebo se používá technika ATR (viz dále).

Pro měření vzorku v pevném skupenství jsou nejběžnější dvě techniky, a to měření v tabletě KBr a technika ATR (attenuated total reflection). Měření tablet KBr spočívá v rozdrčení vzorku na jemný prášek, jeho smíchání a homogenizaci s bromidem draselným (přibližně v poměru 1:200). Po homogenizaci je prášek slisován na tabletu a měří se průchod infračerveného záření přes tabletu. Při ATR technice je měřený vzorek (cca 1 mg) mechanicky přitlačen na krystal, který je součástí přístroje (u kapalných vzorků se mechanické přitlačení nepoužívá). Využívá se několikanásobného odrazu záření mezi vzorkem (opakovaná absorpce) a krystalem, čímž získáme spektrum bez nutnosti přípravy KBr tablety.

V současnosti nejužívanějším zařízením pro infračervenou spektroskopii jsou tzv. infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR). Infračervené záření v celém měřeném rozsahu vlnočtů je v nich směřováno na vzorek přes interferometr. V interferometru dochází k rozdělení vstupujícího záření na dva paprsky, fázovému posunu jednoho z paprsků (paprsky prochází systémem zrcadel a každý z nich urazí různě dlouhou dráhu) a opětovnému spojení těchto paprsků. Vlivem fázového posunu paprsků dochází ke konstruktivní nebo destruktivní interferenci v závislosti na vlnové délce. Toto výsledné modulované záření je přivedeno na vzorek a následně na detektor. Zaznamenávaný signál nazývaný interferogram představuje intenzitu záření jako funkci dráhového rozdílu paprsků. Zpracování dat pomocí matematické operace zvané Fourierova transformace převede tato data na infračervená spektra (absorbance nebo transmitance v závislosti na vlnové délce).

## 5.2.2 UV/Vis spektrofotometrie

UV/Vis spektrofotometrie zjišťuje, pro které vlnové délky a do jaké míry vzorek pohlcuje (absorbuje) ultrafialové (200-400 nm) nebo viditelné záření (400-800 nm). Měření absorpce záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm patří mezi nejčastější metody využívané ve fytochemické analýze (měření absorpce UV záření s vlnovou délkou <190 nm se prakticky neprovádí, protože při těchto vlnových délkách absorbuje i kyslík). UV/Vis spektrofotometrie je metodou jednoduchou, oblíbenou a levnou. Často je využívána pro detekci např. ve spojení s HPLC nebo kapilární elektroforézou. Zejména v HPLC jsou dnes využívány tzv. DAD detektory (popsané v kapitole 2.5.7.1).

UV/Vis spektrofotometrie je založena absorpcí elektromagnetického záření, jehož energie způsobí přechody valenčních elektronů na vyšší energetické hladiny. Přechody elektronů jsou doprovázeny změnami vibračních stavů molekuly (tedy změnami, které pozorujeme při infračervené spektroskopii). Dochází k překryvu všech těchto absorpčních pásů, což má za následek vznik širokých málo charakteristických elektronových pásů, které jsou typické pro UV/Vis spektra. Pro fytochemii jsou v UV/Vis spektrofotometrii důležité zejména přechody intramolekulární, tedy přechody vazebných elektronů z orbitalů  $\sigma$  nebo  $\pi$  a nevazebných elektronů  $n$  do antivazebných orbitalů  $\sigma^*$  nebo  $\pi^*$ , a také charge-transfer přechody u kterých dochází k přenosu elektronu z jedné části molekuly na druhou (přechod elektronu ze základního vazebného orbitalu  $\pi$  nebo nevazebného orbitalu  $n$  donoru na antivazebný orbital akceptoru  $\pi^*$ ). Za absorpci jsou zodpovědná určitá strukturní uskupení

umožňující tyto elektronové přechody, nazývané chromofory. Typy intramolekulárních přechodů s příklady chromoforů jsou uvedeny v tabulce 5.

Přechod	Oblast absorpce	Příklady chromoforů
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	pod 190 nm	Alifatické sloučeniny
$n \rightarrow \sigma^*$	UV záření	Molekuly obsahující atom s volným elektronovým párem (např. chloroform)
$\pi \rightarrow \pi^*$	UV/Vis záření	Nenasycené sloučeniny (zvýšení počtu vazeb v konjugaci vede ke zvýšení vlnové délky absorbovaného záření)
$n \rightarrow \pi^*$	UV/Vis záření	Funkční skupiny mající na dvojně vazbě atom s volným elektronovým párem (např. nitro-, keto-, azo-)

Tab. 5: Typy intramolekulárních přechodů.

Dalšími funkčními skupinami, které se podílejí na UV/Vis absorpci jsou tzv. auxochromy. Tyto funkční skupiny ovlivňují polohu a intenzitu absorpčních maxim chromoforů přítomných v molekule. Podle druhu auxochromu může docházet k modifikacím spektra způsobením tzv. bathochromního posunu (červený) – směrem k vyšším vlnovým délkám, hypsochromního posunu (modrý) směrem k nižším vlnovým délkám, a dále hyperchromnímu posunu (zvýšení intenzity absorpce) a hypochromnímu posunu (snížení intenzity absorpce). Mezi typické auxochromy patří na aromát navázané různá elektron donorová nebo akceptorová uskupení (např. substituce hydroxylovou skupinou, amino skupinou). Takové posuny nastávají také např. při reakcích flavonoidů se specifickými činidly a je tak možno jich využít při identifikaci substituce flavonoidů. Pro látky přírodního původu je nejtypičtější přítomnost chromoforů konjugovaných systémů dvojných vazeb, a to zejména u aromatických sloučenin. Ze spektra tak lze obvykle určit, je-li látka aromatického charakteru, případně další detaily. Spektrum pásového charakteru však nelze interpretovat přesně podle funkčních skupin, a mnoho funkčních uskupení struktury analyzované látky se na spektru jednoznačně neprojeví.

### 5.2.2.1 Kvalitativní analýza

Tento druh analýzy se uplatňuje zejména ve spojení se separačními metodami, kde můžeme porovnávat UV spektra získaná pro jednotlivé separované látky mezi sebou nebo s knihovnou standardů. Samozřejmě je možno i využít klasického spektrofotometru a kvalitativní měření a porovnání se standardem provést v kyvetě. Jak již bylo zmíněno, strukturně-informační hodnota UV/Vis spektra však není oproti jiným analytickým metodám tak významná, obvykle analýzou spektra získáme pouze představu o elektronovém stavu molekuly a základním skeletu látky.

### 5.2.2.2 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýzu pomocí UV/Vis spektrofotometrie lze provést aplikací tzv. Lambert-Beerova zákona.

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (7)$$

A – absorbance

$\varepsilon$  – molární absorpční koeficient [ $\text{dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ]

c – koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]

l – délka kyvety (optická dráha) [cm]

Z tohoto vztahu vyplývá, že absorbance látky je přímo úměrná koncentraci látky v roztoku, čehož lze využít při měření. Obvykle se měří absorbance v maximu absorpčního pásu. Pokud neznáme molární absorpční koeficient analyzované látky, můžeme pomocí série roztoků o známých koncentracích analyzované látky vytvořit kalibrační křivku a zní odečíst koncentraci analyzované látky v neznámém vzorku. UV/Vis kvantitativní analýzu používáme ve fytochemii nejčastěji ve spojení se separačními metodami, kdy analyzujeme jednotlivé separované látky. Při klasickém měření v kyvetě můžeme provést stanovení jen v případě, že se námi vybraný absorpční pás analyzované látky nepřekrývá s dalšími pásy, pocházejícími od dalších látek přítomných v analyzované směsi. Protože vzorky analyzované ve fytochemii jsou většinou složité směsi látek, a přímé stanovení jednotlivých látek není možné, využívají se někdy více či méně selektivní činidla umožňující skupinové reakce, při kterých vznikají

barevné produkty s typickými maximy absorpce vhodnými k analýze. Výsledkem takového stanovení je přibližné určení obsahu celé skupiny sloučenin, které poskytují reakci s použitým činidlem. Příkladem může být Baljetovo činidlo pro kardioaktivní glykosidy, Folin-Ciocalteuovo činidlo pro polyfenoly, chlorid hlinitý pro flavonoidy a další.

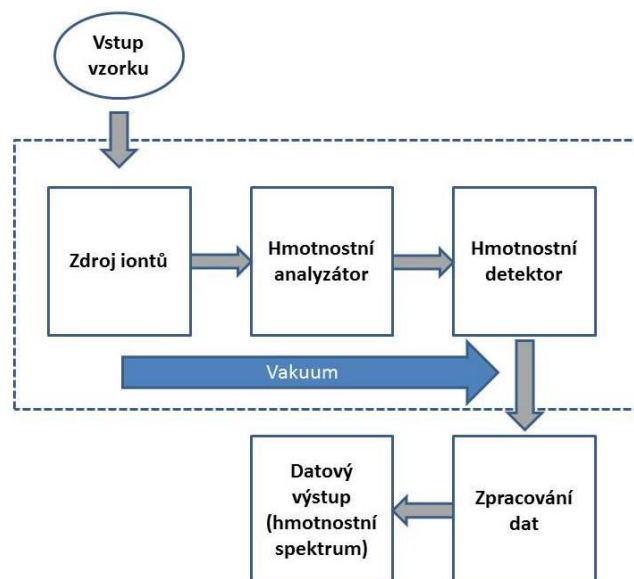


### 5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich fragmentů. Jako hmotnostní spektrometr jsou označovány přístroje se schopností převést atomy nebo molekuly na ionty a ty dále rozdělit podle poměru jejich hmotnosti  $m$  k náboji  $z$  ( $m/z$ ). Principem takového rozdělení je, že trajektorie pohybu iontů v magnetickém a elektrostatickém poli závisí na jejich hmotě a náboji. Při vhodné interpretaci výsledků měření má metoda velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. Hmotnostní spektrometrie je pravděpodobně nejcitlivější technika používaná na poli analýzy a identifikace přírodních látek. Pomocí této metody získáme informace o molekulové hmotnosti a strukturních fragmentech molekul ze submikrogramových množství materiálu. Je to jedna z mála metod využitelných pro identifikace malých strukturních elementů z molekulární „skládačky“. Tento způsob využití, tj. skládání menších strukturních fragmentů, tzv. sekvenování, je stále využíván v analýze peptidů, glykosidů, oligosacharidů apod. Fragmentační studie zůstávají důležité, zvláště v kombinaci s NMR analýzou a jsou důležité pro dotváření představy o struktuře.

Je třeba zdůraznit význam tzv. hmotnostní spektrometrie ve vysokém rozlišení (HRMS – High Resolution Mass Spectrometry). Tato metoda, schopná měřit molekulovou hmotnost s přesností na tisíce Da, umožňuje stanovení sumárního vzorce a nahrazuje tak elementární analýzu, která pro stejný účel vyžaduje podstatně větší množství analyzovaného materiálu (několik miligramů).

Vývoj v oblasti MS byl zaměřen na zvýšení citlivosti, rozlišení a také na vývoj iontových zdrojů schopných získat ionty z netěkavých a vysokomolekulárních látek. Hmotnostní spektrometry bývají často používány ve spojení s výkonnými separačními metodami, jako je plynová nebo kapalinová chromatografie. Zjednodušené schéma zařízení pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie přináší obrázek 28. Následující kapitoly obsahují stručný přehled ionizačních technik a způsobů hmotnostní analýzy.



Obr. 28: Schematický náčrt hmotnostního spektrometru

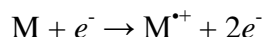
### 5.3.1 Iontové zdroje

Iontové zdroje jsou základní součástí hmotnostních spektrometrů. Veškeré informace, které o látkách získáme, vychází z částic nesoucích náboj, elektroneutrální částice jsou v hmotnostní spektrometrii nedokovatelné. Ionizace je energeticky náročný proces. Množství energie, které je pro ionizaci nutné se liší podle typu a struktury sloučeniny. U obvyklých typů sloučenin se pohybuje v rozmezí 7-16 elektronvoltů (eV). Množství dodávané ionizační energie ovlivňuje způsob ionizace a tím i aplikační využití techniky. Jak již bylo zmíněno, současné ionizační zdroje dokážou ionty uvolnit i z netěkavého materiálu a vysokomolekulárních látek, což aplikace rozšiřuje.

Podle množství dodané energie můžeme ionizační techniky rozlišit na měkké (soft) a tvrdé (hard). U měkkých technik je dodaná energie a zejména její přebytek malý, a proto je pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu nízká. U těchto technik je vysoká pravděpodobnost zachování mateřského, molekulového iontu a tyto techniky jsou proto používány pro stanovení molekulové hmotnosti. Tvrdé techniky jsou ty, které při ionizaci dodávají výrazný přebytek energie ( $>$  energie vazby) a tím umožňují rozpad struktury na fragmenty. Jiné dělení může být na ionizace z plynné fáze – zde je látka odpařena do vakua, a ionizace z kondenzované fáze – vhodné pro netěkavé sloučeniny. Dále bude stručně objasněn princip různých typů ionizace.

### **EI (Electron Impact)**

Ionizace dopadem elektronů patří mezi tvrdé ionizační techniky z plynné fáze. Je to jeden z nejstarších, a proto nejpropracovanějších a nejčastějších způsobů MS ionizace. Princip je v interakci analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Zdrojem proudu elektronů je rozžhavené rheniové nebo wolframové vlákno. Molekuly při reakci s elektronem ztrácejí z valenční sféry vlastní elektron (je jakoby vyražen) a při ztrátě elektronu vzniká radikál kation  $M^{*+}$ .



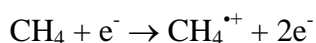
Hmotnost vzniklého iontu je však vzhledem k zanedbatelné hmotnosti elektronu prakticky stejná jako hmotnost rodičovské molekuly. Vznik radikál aniontu (tedy záchyt elektronu) je málo pravděpodobný a připadá v úvahu pouze v přítomnosti vysoce elektronegativního prvku ve struktuře analyzované látky. Proud iontů je pak směřován elektrickým polem k anodě, a z prostoru ionizace jsou pak ionty pomocí jiného elektrického pole (repeleru) vytlačovány směrem k iontovému analyzátoru (viz kapitola 3.3.2).

Vzhledem k energiím, které jsou částicím látky dodávány (obvykle 70 eV) dochází velmi snadno u tohoto typu ionizace ke štěpení na fragmenty a molekulový pík je často potlačen. Metoda se proto využívá zejména ve strukturní analýze malých molekul, a to nejčastěji ve spojení s plynovou chromatografií.

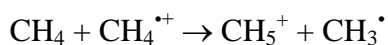
### **CI (Chemical Ionization)**

Chemická ionizace patří podobně jako EI mezi techniky z plynné fáze, avšak je zařazena mezi měkké ionizační techniky. Primární zdroj energie je opět rychle letící proud elektronů, ale energie je na analyzované látky přenášena prostřednictvím reakčního média (nejčastěji používaný je methan), které je pod tlakem vháněno do ionizační komory. Z reakčního média vznikají radikál kationty, ze kterých vznikají sekundární reakční kationty, které pak reagují s analyzovanou látkou za vzniku kvasi-molekulárních iontů  $[M+H]^{+}$ . Přebytek energie není tak výrazný, látka nefragmentuje tak jako v EI, molekulový pík není výrazně potlačen a metodu je tak možno použít i pro stanovení molekulové hmotnosti. Podobně jako EI se chemická ionizace používá zejména ve spojení s plynovou chromatografií.

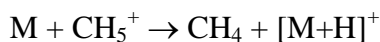
Tvorba primárních iontů



Tvorba sekundárních iontů



Tvorba iontových produktů



### **FAB (Fast Atom Bombardement)**

Ionizace analyzované látky pomocí bombardování urychlenými atomy vzácného plynu (xenon, argon) patří mezi měkké ionizační techniky z kondenzované fáze. Dopad atomů na materiál matrice, ve které je látka umístěna (např. glycerol), způsobuje desorpci a ionizaci látky. Vznikají ionty  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Relativně nízká fragmentace umožňuje snadno odečíst molekulový pík a tím i molekulovou hmotnost analyzované látky. Metoda je používána zejména pro analýzu netěkavých termolabilních sloučenin.

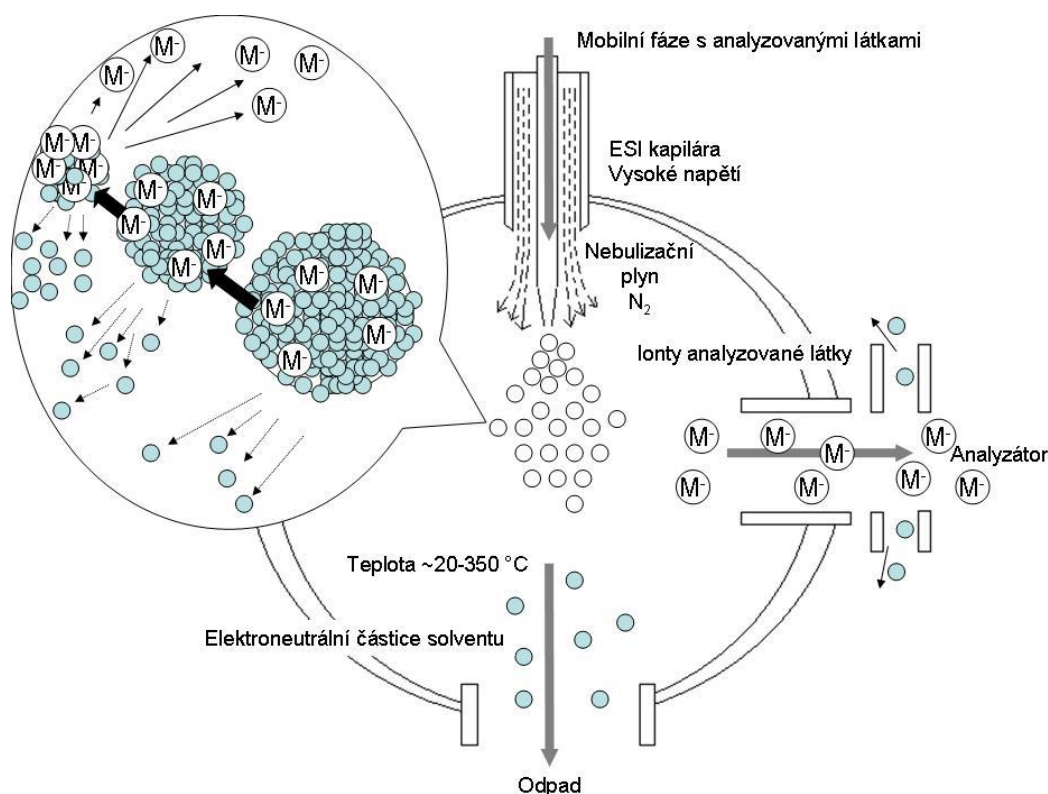
### **MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)**

MALDI je jednou z nejmodernějších ionizačních technik. Je to měkká technika pro kondenzovanou fázi. Využívá laserové záření o vhodné vlnové délce pro desorpci látky z matrice a ionizaci. Přítomnost matrice, nejčastěji slabé aromatické kyseliny, zajišťuje desorpci a ionizaci velkých molekul analytu, aniž by došlo k jejich významnější fragmentaci. Matrice absorbuje energii laserového pulsu a předá ji velmi šetrně molekulám analytu s výrazně nižší vnitřní energií než při ionizaci laserem v nepřítomnosti matrice. Významnou výhodou tvorby pouze molekulových iontů je možnost aplikace metody při analýze směsí, která tak není komplikována přítomností vícečetných signálů. Tato metoda se často používá s TOF (Time of Flight) hmotnostním analyzátozem. Metoda MALDI je používána zejména v biochemii, biotechnologii a fytochemii pro analýzu proteinů, polymerů typu polysacharidů a složitých přírodních látek.

### **Sprejové techniky ESI (Electrospray Ionization) a TSI (Thermospray Ionization)**

Tyto dvě techniky jsou v současnosti široce využívány zejména ve spojení s kapalinovou chromatografií. Patří mezi měkké ionizační techniky z kapalné fáze. Princip ionizace je v rychlém rozprášení a odpaření kapalné fáze (Obr. 29). U TSI se kapalná fáze zahřívá na teplotu 200-300 °C a k rozprášení dojde prudkým varem. S postupným

odpařováním vzniklé mlhy dochází ke zvyšování povrchového náboje, až do doby kdy dojde k disociaci iontů a jejich přechodu do plynné fáze. Takto vzniklé ionty jsou pomocí repeleru přivedeny do hmotnostního analyzátoru. ESI je asi nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro kombinaci LC-MS. K rozprášení kapalné fáze dochází při jejím průchodu kapilárou, na níž je přivedeno vysoké napětí. Při tomto procesu vznikají velmi drobné kapky s vysokou hustotou povrchového náboje, které jsou rychle vysušeny protiproudem horkého (150-200 °C) inertního plynu. Dochází opět k disociaci a přechodu do plynné fáze a následně k odvedení vzniklých iontů do hmotnostního analyzátoru. Je možno pracovat jak v pozitivním  $[M+H]^+$ , tak v negativním  $[M-H]^-$  módu v závislosti na polaritě vloženého napětí. Elektroneutrální částice rozpouštědla jsou u obou popsaných sprejových technik odtaženy vakuem.



Obr. 29: Schematický náčrt zařízení ESI

### 5.3.2 Hmotnostní analyzátoary

Nedílnou součástí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor. Slouží k filtraci a separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje  $m/z$ . V případě, že  $z$  je rovno jedné (obvyklý případ),  $m/z$  pak vyjadřuje molekulovou hmotnost iontu. Konstrukčně je možno

separaci iontů vyřešit různými způsoby, v podstatě ve všech je využito pohybu částic v elektrickém a někdy i v magnetickém poli. Pro získání kvalitních hmotnostních spekter je důležité zajistit vysoké vakuum uvnitř zařízení. K tomuto účelu se používají speciální pumpy schopné dosáhnout vysokého vakua.

### **Magnetický hmotnostní analyzátor (Sektorový elektromagnetický analyzátor)**

Jeden z nejstarších a rozšířených typů hmotnostních analyzátorů. Konstrukčně se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci mohou procházet ionty (obr. 30). Ty po urychlení v iontovém zdroji mají kinetickou energii

$$E_K = mv^2/2 = zV \quad (8)$$

kde  $m$  je hmotnost iontu,  $v$  jeho rychlost,  $z$  jeho náboj a  $V$  je akcelerační napětí iontového zdroje. V homogenním magnetickém poli dochází k pohybu iontů po zakřivené dráze a začne na ně působit radiální Lorentzova síla

$$F_L = BzV \quad (9)$$

( $B$  je magnetická indukce), která je v rovnováze se silou odstředivou ( $r$  je poloměr dráhy iontu).

$$F_O = mv^2/r \quad (10)$$

Platí tedy

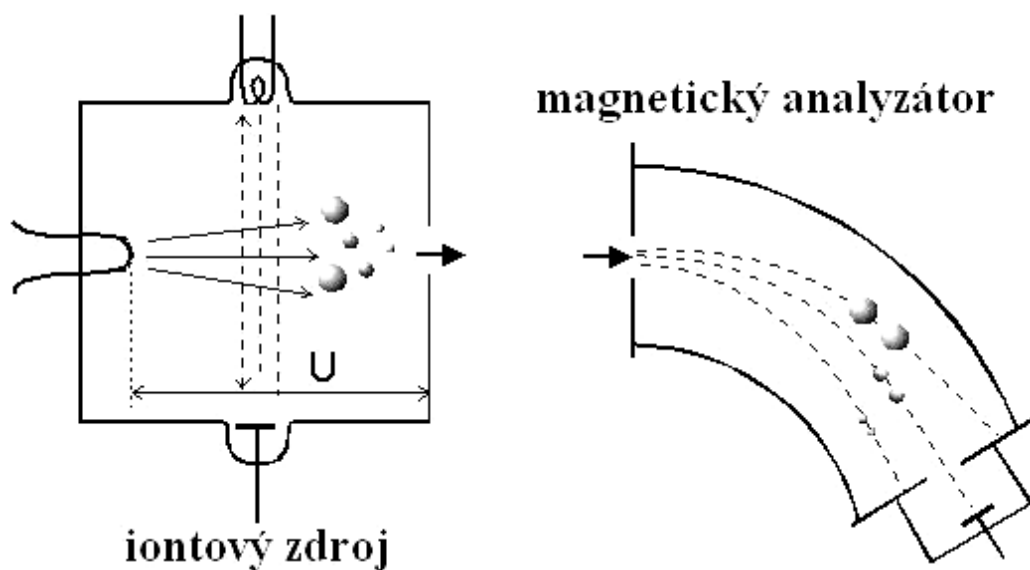
$$BzV = mv^2/r \quad (11)$$

Spojením a úpravou rovnic (1) a (4) získáme vztah:

$$m/z = B^2 r^2 / 2V \quad (12)$$

Z rovnice 12 vyplývá, že ionty rozdílných  $m/z$  opisují dráhy o různých poloměrech. Tím je možno ionty třídit skenováním magnetickým polem. Pro zlepšení rozlišení jsou ionty po

jisté fokusaci opakovaně separovány v sektoru s magnetickým polem a pak prolétají dále do detektoru.

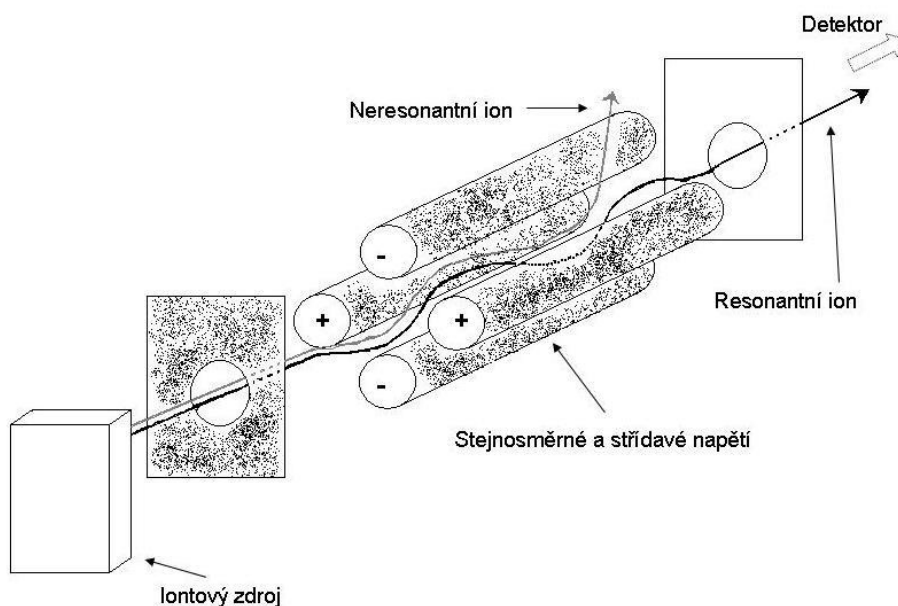


Obr. 30: Schematický nákres magnetického analyzátoru

Tento typ detekce je s rozšířením TOF na ústupu, ale přesto bývá stále ještě běžně v provozu spojený s GC, a EI nebo CI ionizací.

### **Kvadrupólový hmotnostní analyzátor**

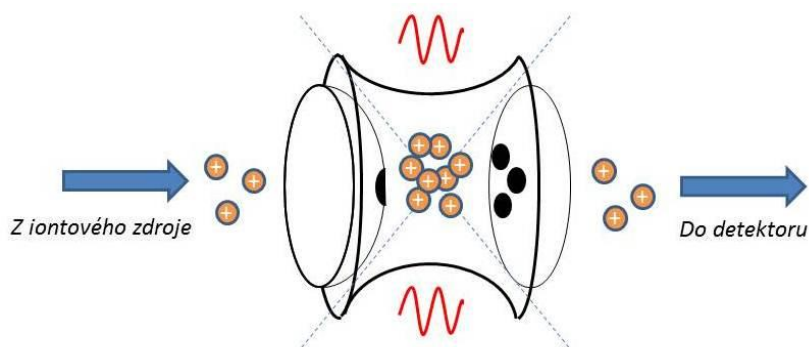
Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je jedním z nejrozšířenějších typů hmotnostních analyzátorů. V praxi se používá samostatně nebo zapojen v sérii s několika dalšími kvadrupóly (triple-Q) nebo jiným hmotnostním analyzátozem (iontová past, TOF). Kvadrupólový filtr bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením vhodných pro spojení s plynovou chromatografií a s HPLC. Kvadrupólem je pojmenovaný podle konstrukčního uspořádání. Je sestaven ze 4 kovových tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu připojených ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Po ionizaci ionty vlétnou do prostoru mezi tyčemi, dostanou se do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Na změnách střídavého a stejnosměrného napětí je založena „filtrace iontů“, protože při daných hodnotách proletí pouze ionty o určitém  $m/z$ . Změnou napětí je pak možno selektovat ionty o určitém  $m/z$ , ostatní jsou zachyceny tyčemi.



Obr. 31: Schematický náčrt kvadrupólového hmotnostního analyzátoru

### Iontová past (Ion Trap)

Iontová past je zařízení, které umožňuje působením elektromagnetického pole ionty uzavřít v ohraničeném prostoru (Obr. 32). Existuje několik typů iontových pastí, v hmotnostní spektrometrii se využívá zejména Penningova past. Tato iontová past se skládá ze vstupní a výstupní elektrody a středové elektrody tvořící prsteneček. Ionty vniknou do pasti vstupní elektrodou a nastavením elektromagnetického pole jsou nuceny kroužit uvnitř pasti po uzavřených drahách s minimem kolizí. Se změnou amplitudy napětí vkládaného na elektrody se mění trajektorie a ionty mohou být výstupem vypuzeny směrem do detektoru. Zařízení umožňuje akumulaci iontů v pasti do určitého počtu nebo v určitém čase, což zvyšuje možnost jejich detekce a tím citlivost přístroje. Uplatnění nachází iontová past zejména při spojení LC-MS.

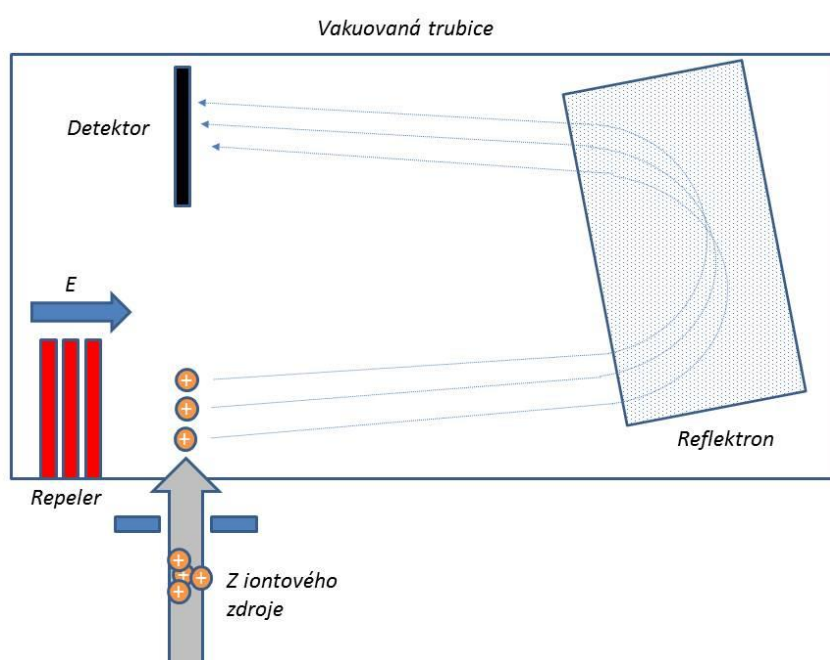


Obr. 32: Schematický náčrt iontové pasti



### Průletový analyzátor (Time of Flight, TOF)

Jedním z nejjednodušších a nejpřesnějších hmotnostních analyzátorů je TOF. Je v principu tvořen pouze vzduchoprázdnou trubicí, do které jsou pomocí repeleru přivedeny ionty z iontového zdroje. Rychlost pohybu iontů je závislá na poměru  $m/z$ . Měří se čas, za který částice urazí dráhu do detektoru. Těžší částice dosáhnou nižší rychlost a tím pádem delšího času, který může být velmi přesně změřen. Ve spojení s počítačem můžeme z těchto údajů vypočítat hodnotu  $m/z$ . TOF v moderním provedení je využíván zejména v kombinaci s ESI nebo MALDI ionizací a pro vysokorozlišovací měření, tzn. pro stanovení sumárního vzorce.



Obr. 33: Schematický náčrt TOF

### 5.3.3 Detektory v MS

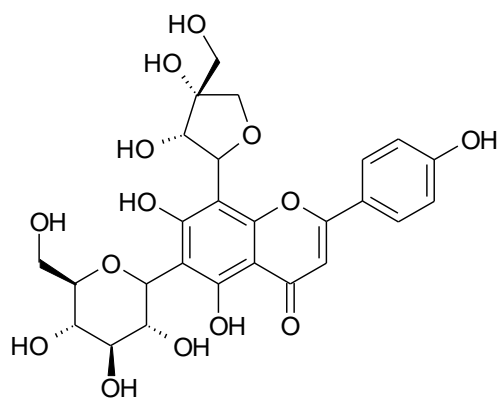
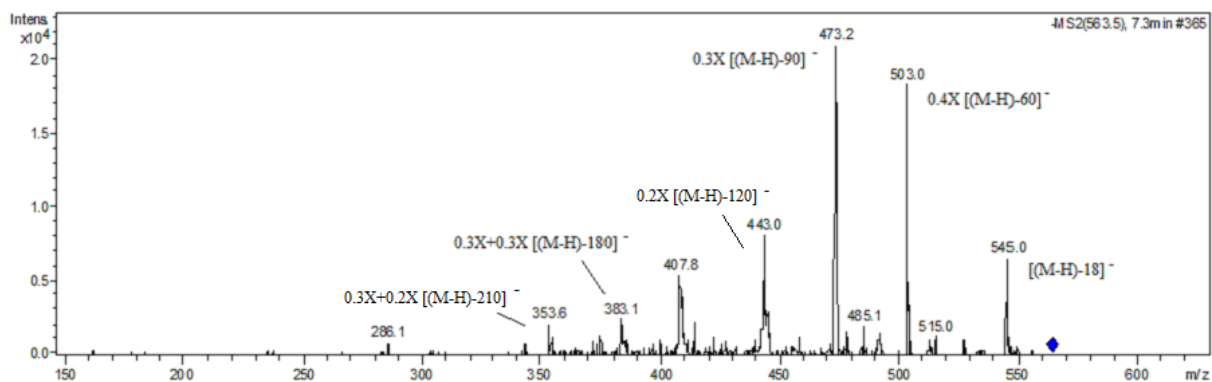
Po separaci iontů v hmotnostním analyzátoru je třeba jejich přítomnost a počet zaznamenat. Existují dva typy detektorů. **Detektory pro přímú měření** detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů a **násobičové detektory** využívající efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Vznikající elektrický proud je pak převeden na intenzitu signálu pro danou hodnotu  $m/z$ . Násobičové detektory jsou nejčastěji používaným typem detektorů v MS.

### 5.3.4 Využití hmotnostní spektrometrie

Výstupem hmotnostní spektrometrie je hmotnostní spektrum, které představuje závislost odezvy detektoru na  $m/z$ . V normalizovaném tvaru je nejintenzivnějšímu píku přiřazena 100% odezva, ostatní se vyjadřují v poměrných hodnotách. Ve spektru pozorujeme jednak molekulový pík analyzované látky, jednak potenciální adukty s rozpouštědlem nebo sodnými ionty, a pak také v závislosti na použité metodě (dodané energii) fragmenty látky. Pozorovat můžeme pouze ty fragmenty, u kterých zůstal zachovaný charakter iontu, tzv. neutrální ztráty jsou neviditelné.

Jako příklad uvádíme analýzu hmotnostního spektra flavonoidního glykosidu. Prezentovaná sloučenina byla izolována z *Pulicaria crispa* pomocí preparativní HPLC na reverzní fázi (Obr. 34). Látka byla analyzována pomocí spektrofotometrie v ultrafialové oblasti, shodou s knihovnou spekter bylo potvrzeno, že se jedná o flavonoid a dále byla látka analyzována pomocí LC-MS ESI v negativním módu (vhodné pro fenolické sloučeniny kyselého charakteru) pro získání dalších údajů. Z hmotnostního spektra byl jako první při analýze identifikován mateřský ion  $m/z$   $[M-H]^-$  563, z něhož byla zjištěna molekulová hmotnost sloučeniny 564. To je poměrně vysoká hodnota pro flavonoidy, z níž, spolu s analýzou retenčního času při HPLC, je možno dedukovat glykosidický charakter látky. *O*-glykosidy (cukerná jednotka vázaná přes kyslík) jsou poměrně labilní sloučeniny a za ESI podmínek použitých v experimentu se snadno štěpí. V hmotnostním spektru je možno vypočítat ztráty, které odpovídají odštěpení celé molekuly hexosy nebo pentosy a jsou pak nacházeny typické fragmenty odpovídající iontům aglykonů  $m/z$   $[M-H-180]^-$  nebo  $m/z$   $[M-H-150]^-$ . V hmotnostním spektru se ale nevyskytovaly žádné fragmenty typické pro *O*-glykosidy. Pro další práci bylo proto použito MS/MS. Při této technice je pomocí iontové pasti selektován mateřský ion (v našem případě  $m/z$   $[M-H]^-$  563), je akumulován a následně po dodání určitého množství energie rozštěpen na dceřiné fragmenty odvozené od určitých funkčních skupin přítomných ve struktuře analyzované látky. Jako první jsme analyzovali fragment  $m/z$   $[M-H-18]^-$  545. Ztráta 18 jednotek typicky odpovídá odštěpení hydroxylové skupiny. Bohužel nelze jednoduše identifikovat původ hydroxyly a pozici hydroxylové substituce. Dále jsme analyzovali fragmenty  $m/z$   $[M-H-90]^-$  473 a  $m/z$   $[M-H-120]^-$  443. Fragment  $m/z$  473 odpovídá štěpení *C*-glykosidicky vázané hexopyranosy,  $m/z$  443 odštěpení pentofuranosy. Štěpení cukerné jednotky odpovídá také fragment  $m/z$   $[M-H-60]^-$  503. Zde není možno identifikovat pozici štěpení, možnost fragmentace je jak u hexopyranosy, tak u

pentofuranosy. Přítomnost takových fragmentů je tedy typická pro C-glykosidy. U C-glykosidů se cukry neodštěpují vcelku, ale často u nich dochází díky stabilitě C-C vazby mezi cukrem a aglykonem ke fragmentaci cukerné jednotky. Z kombinované analýzy UV/Vis spektra a MS/MS spektra jsme mohli vyvodit tyto závěry: aglykonem izolované sloučeniny je flavon s třemi hydroxylovými skupinami, pravděpodobně apigenin. Po rešerši v literatuře jsme fragmenty v MS/MS identifikovali jako typické pro C-6 a C-8 diglykosid a porovnáním s literaturou látku označili pravděpodobně za apigenin 6-C-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-apiofuranosid. Tyto závěry byly následně potvrzeny <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR analýzou. Jak je vidět z předchozího výkladu, obvykle je možno z MS analýzy získat údaje o molekulové hmotnosti analyzované látky a informace o funkčních skupinách. Pro kompletní určení struktury bylo nutné doplnit <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR analýzu, která potvrdila naše předpoklady.



Obr. 34: Příklad hmotnostního spektra ESI MS/MS v negativním módu a vzorec analyzované látky

## 5.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

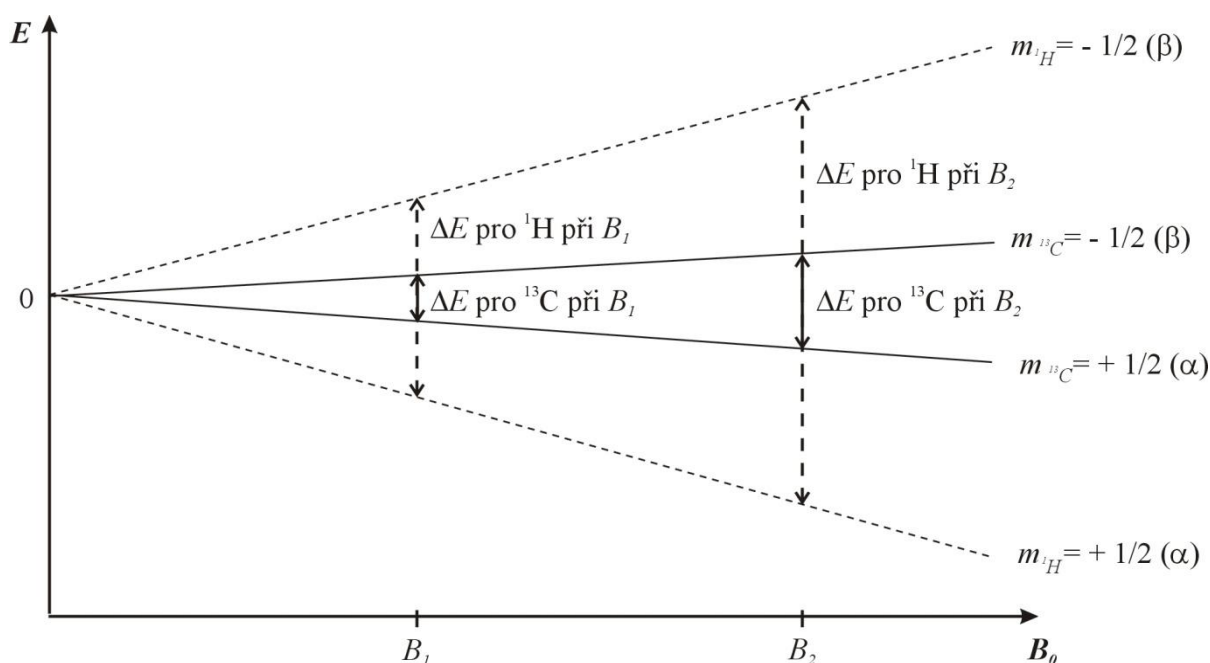
Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jedním z hlavních nástrojů pro strukturní analýzu přírodních látek, zejména sekundárních metabolitů. Díky velkému rozvoji NMR technologie zavedením FT-NMR spektrometrů s vysokým rozlišením se stal podíl NMR spektroskopie v strukturální identifikaci přírodních látek velmi významný. Masové rozšíření NMR spektroskopie je však omezeno vysokými pořizovacími náklady NMR spektrometrů pohybující se řádově v desítkách milionů korun.

### 5.4.1 Princip NMR spektroskopie

Základním principem nukleární magnetické rezonance je interakce jader atomů, jež jsou umístěny v silném magnetickém poli, s radiofrekvenčním zářením (RF). K interakci dochází pouze u jader, která mají nenulovou hodnotu spinového kvantového čísla  $I$ , tedy mohou vykazovat magnetický moment (projevují se jako miniaturní magnety). U přírodních látek je NMR spojena s protony  $^1\text{H}$  a s  $^{13}\text{C}$  izotopem uhlíku ( $I = 1/2$ ), v menším rozsahu s izotopem dusíku  $^{15}\text{N}$  ( $I = 1/2$ ). Ten je v poslední době preferován i přes své malé přirozené zastoupení (0,37 %) před dříve využívaným izotopem  $^{14}\text{N}$  (99,67 %;  $I = 1$ ), jenž poskytoval v NMR spektru velmi široké signály a neumožňoval rozlišení neekvivalentních dusíků v molekule. NMR spektra kyslíku lze měřit jen omezeně (nízkomolekulární sloučeniny). Přirozeně vyskytující se jádra  $^{16}\text{O}$  ( $I = 0$ ) jsou však v tomto smyslu v NMR neviditelná, měřitelný je pouze jediný magneticky aktivní izotop  $^{17}\text{O}$  ( $I = 5/2$ ) s velmi nízkým přirozeným zastoupením (0,037 %), což vede k obtížné detekci (široké signály) a nízké citlivosti.

V nepřítomnosti vnějšího magnetického pole mají magnetické momenty jader s nenulovým spinem nahodilou orientaci bez energetického rozdílu. Po vložení těchto jader do magnetického pole dojde k rozštěpení energetických hladin jejich jaderných spinů. Počet vzniklých energetických hladin je určen hodnotou spinového kvantového čísla  $I$  (počet stavů  $= 2I+1$ ), např. u izotopů s  $I = 1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) zaujmou jaderné spiny dva energetické stavy - spinový stav  $\alpha$  (magnetický moment jádra je shodný s orientací vnějšího magnetického pole; charakterizovaný magnetickým kvantovým číslem  $m = +1/2$ ) a spinový stav  $\beta$  (magnetický moment jádra směřuje proti vnějšímu magnetickému poli; charakterizovaný magnetickým kvantovým číslem  $m = -1/2$ ). Energetický rozdíl těchto stavů je však velmi malý a proto

převládá vždy jen malý přebytek jader ( $< 10^{-5}$ ) v energeticky nižším spinovém stavu  $\alpha$ . Absorbci dodaného elektromagnetického záření o tzv. rezonanční frekvenci (energie záření je rovna energetickému rozdílu mezi stavy  $\alpha$  a  $\beta$ ) lze jádra excitovat do stavu vyšší energie (spinový stav  $\beta$ ). Při absorpci RF záření dochází k vyrovnání populace těchto stavů. Frekvence elektromagnetického záření, která je potřebná pro rezonanci, je závislá na indukci magnetického pole a na druhu sledovaného jádra. Čím větší je intenzita vnějšího magnetického pole, tím větší je energetický rozdíl mezi stavy  $\alpha$  a  $\beta$  a zároveň je i více jader v nižším energetickém stavu  $\alpha$ . Proto se bude absorbovat více RF záření a roste tím citlivost měření a rozlišení přístroje (viz Obr. 35).



Obr. 35: Rozdíl energií jaderných spinových stavů  $\alpha$  a  $\beta$  pro jádra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  v závislosti na magnetické indukci  $B_0$ . (Při dané intenzitě magnetického pole mají jádra  $^1\text{H}$  vyšší rezonanční frekvenci a jsou citlivější než  $^{13}\text{C}$  jádra).

#### 5.4.2 Chemický posun

Podle výše uvedeného by měla být rezonanční frekvence při konstantní indukci magnetického pole pro všechna jádra téhož izotopu stejná. Neměříme však samotná jádra atomů. Ve vnějším magnetickém poli cirkulují okolo jader též jejich elektrony, které tak vytváří vlastní indukované magnetické pole. Je-li orientováno proti směru vnějšího pole, dochází k tzv. stínění (shielding) - mírné zeslabení vnějšího pole, naopak při stejné orientaci

dochází k mírnému zesílení vnějšího pole - tzv. odstínění (deshielding). Rezonanční frekvence konkrétního jádra je tedy závislá na elektronovém uspořádání jeho okolí, různě stíněná jádra (tzv. chemicky neekvivalentní jádra) rezonují při různých frekvencích. Absolutní hodnoty rezonančních frekvencí jsou řádově v MHz, ale rozdíl (posun) rezonančních frekvencí způsobený stíněním je jen řádově v Hz. Vyjadřování absolutní hodnoty rezonanční frekvence by bylo značně nepraktické, a proto se chemický posun konkrétního jádra vyjadřuje jako rozdíl absolutní hodnoty rezonanční frekvence tohoto jádra vůči absolutní hodnotě rezonanční frekvence standardu. Získaný chemický posun v Hz je však závislý na pracovní frekvenci spektrometru. Abychom mohli porovnávat data naměřená na různých spektrometrech, byla vytvořena stupnice  $\delta$  chemického posunu s bezrozměrnými jednotkami ppm (miliontina pracovní frekvence spektrometru):

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{st}}{\nu_0} \times 10^6 \quad (13)$$

$\nu$  = rezonanční frekvence měřeného jádra

$\nu_{st}$  = rezonanční frekvence standardu

$\nu_0$  = pracovní frekvence spektrometru

V  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopii byl jako standard zvolen tetramethylsilan (TMS;  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) a jeho chemický posun  $\delta$  je dle výše uvedeného vztahu roven 0 ppm. TMS byl zvolen kvůli jeho spektrálním a fyzikálně-chemickým vlastnostem. V  $^1\text{H}$  NMR spektru dává jediný velmi intenzivní signál (má 12 ekvivalentních vodíků), proto ho stačí přidávat ke vzorku ve velmi malém množství. Díky značnému stínění protonů (vazba methylových skupin na elektro pozitivní křemík) je tento signál posunut do oblasti s minimální resonancí jiných jader. Navíc je chemicky nereaktivní a jeho teplota varu je 26,5 °C, proto se dá jednoduše odstranit ze vzorku.

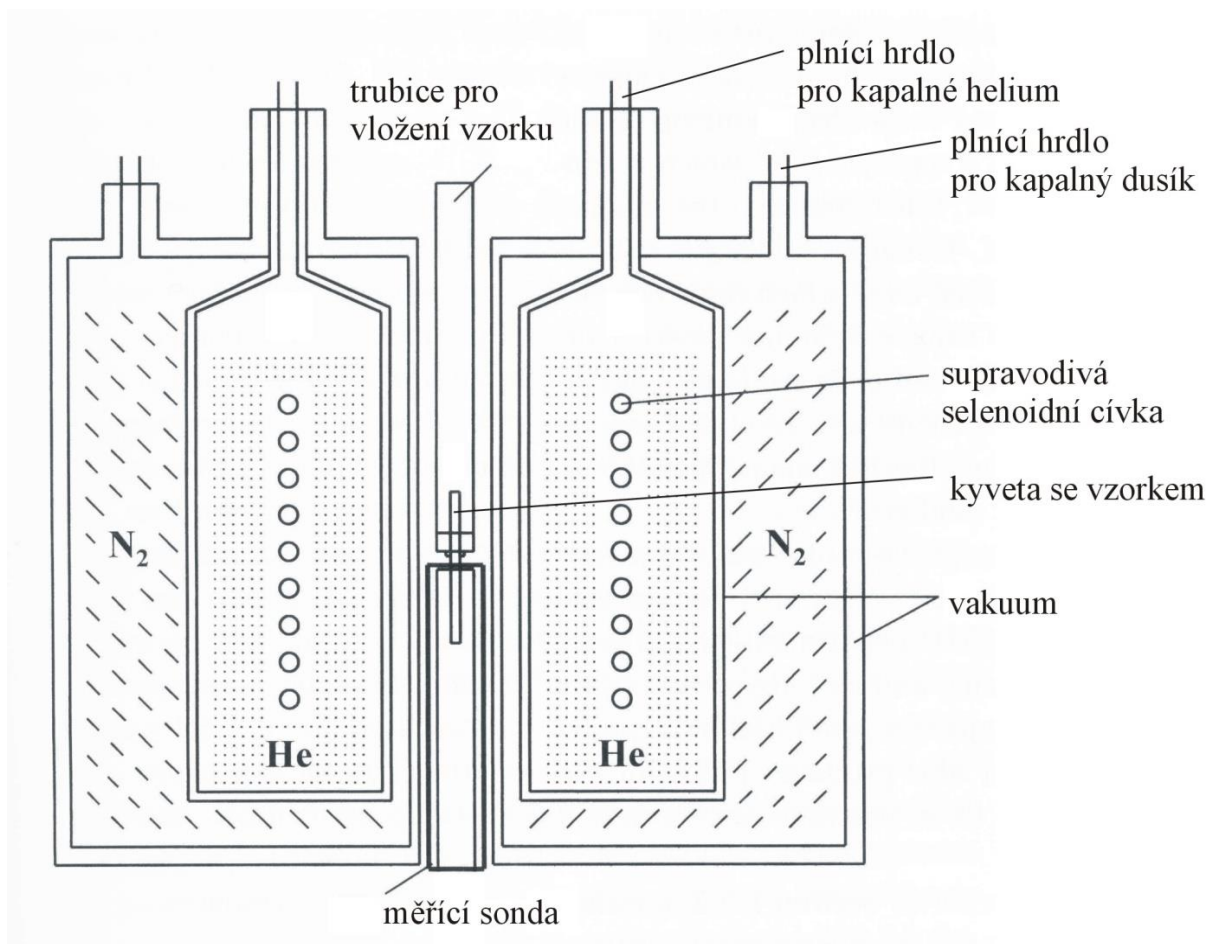
### 5.4.3 Instrumentace NMR a postup měření

Původní CW(continuous wave)-NMR spektrometry se skládaly z permanentního magnetu či elektromagnetu se železným jádrem, RF-vysílače, přijímače registrujícího absorpci energie vzorkem a zapisovače. Vzorek se umístil mezi póly magnetu o statické magnetické indukci  $B_0$  a ozařoval se RF-zářením s plynule se měnící frekvencí (nebo se spojitě měnila intenzita magnetického pole za působení RF-záření o konstantní frekvenci).

Kontinuálně tak byly nacházeny jednotlivé rezonanční frekvence chemicky ekvivalentních jader a výsledné spektrum bylo záznamem intenzity absorpce v závislosti na frekvenci.

Moderní pulzní NMR spektrometry s Fourierovou transformací (FT-NMR) jsou velmi složitá zařízení. Základem FT-NMR spektrometru je supravodivý magnet (Obr. 36), který je tvořený solenoidní cívkou ze supravodivého materiálu (nejčastěji slitina Nb<sub>3</sub>Ti nebo Nb<sub>3</sub>Sn). Supravodivost je dosaženo jen při velmi nízkých teplotách, a proto je cívka umístěna v kryostatu s kapalným heliem. Vnější plášť kryostatu je naplněn kapalným dusíkem a snižuje tak odpařování helia. Kryostat má vejčité tvar a v otvoru procházející osou magnetu se nachází měřící sonda, do které se spouští skleněná kyveta s roztokem měřené látky. Hlavní částí sondy jsou elektrické obvody, které slouží k dodání energie do vzorku RF-pulsem a k detekci frekvencí emitovaných vzorkem při relaxaci. Sonda a magnet jsou propojeny s tzv. konzolou, která obsahuje různé elektronické obvody (vysílací a přijímací obvody, převodníky, zdroje pro napájení korekčních cívek, modulátory a zesilovače RF pulzů atd.). Konzola spektrometru je propojena a řízena centrálním počítačem. Při FT-NMR spektrometrii se zkoumaný vzorek ozáří krátkým vysokofrekvenčním pulzem, který obsahuje celý rozsah rezonančních frekvencí. Všechna jádra sledovaného izotopu jsou tak excitována současně. Návrat jader do rovnovážného stavu je možno sledovat jako tzv. FID (free induction decay, volné doznívání indukce), jenž představuje záznam závislosti intenzity signálu na čase. FID je ukládán do počítače a následně převeden matematickou operací (Fourierovou transformací) na vlastní NMR spektrum - závislost intenzity signálu na frekvenci. Výhodou této metody je možnost rychlého opakování jednotlivých měření a výsledné FID signály zprůměrovat, čímž dojde k eliminaci šumu a zvýšení citlivosti měření. FT-NMR spektrometry mají také díky několikanásobně silnějším magnetickým polím větší rozlišovací schopnost. Pracovní frekvence spektrometru se obvykle udává jako rezonanční frekvence jader <sup>1</sup>H. Zatímco předchozí CW-spektrometry mohly dosahovat jen relativně nízkých pracovních frekvencí (30 - 100 MHz), FT-NMR spektrometry pracují při 200 až 900 MHz. V roce 2009 byl uveden firmou Bruker první 1GHz NMR spektrometr.





Obr. 36: Schematický průřez supravodivým magnetem; (převzato z [Friebolin, H.: Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Wiley-VCH, 1998.] a upraveno)

Před vlastním měřením se příslušný vzorek (řádově mg pro  $^1\text{H}$  a desítky mg pro  $^{13}\text{C}$ ) rozpustí v deuterovaném rozpouštědle (např.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ). Rozpouštědla obsahující vodík by totiž při analýze NMR rušila měření (signál  $^1\text{H}$  rozpouštědla by byl v  $^1\text{H}$  NMR spektru mnohem intenzivnější a mohl by překrýt signály měřené látky), navíc deuterium slouží k naladění přístroje. Roztok vzorku (0,5-0,7 ml) se dle potřeby zfiltruje a přenesení do speciální kyvety z borosilikátového skla (tenkostěnná zkumavka o průměru 5 nebo 10 mm a délky cca 20 cm). Kyveta se vloží do rotačního nástavce a na vzduchovém polštáři stlačeného vzduchu se spustí do měřicí sondy magnetu. Pro zvýšení homogenity magnetického pole kyveta v přístroji rotuje. Následují procesy tzv. ladění přístroje - nalezení rezonanční podmínky (locking) a optimalizace homogenity magnetického pole (shimming) změnou hodnoty magnetického pole  $B_0$  pomocí korekčních cívek. Při vlastním měření se vzorek ozařuje elektromagnetickým pulzem či pulzy dle typu zvoleného experimentu a zaznamenává se zpětné vyzařování vzorku. Proces měření se mnohokrát opakuje (pro  $^{13}\text{C}$

spektra i 10000×). Získané FID signály se Fourierovou transformací převedou na klasické NMR spektrum. Konečnou fází je pak vlastní interpretace získaného spektra.

#### 5.4.4 Jednodimenzionální $^1\text{H}$ NMR

Jednodimenzionální  $^1\text{H}$  NMR poskytuje velmi rychlé informace o povaze nebo čistotě analyzované látky. Z vodíkového spektra můžeme vyčíst, kolik druhů chemicky neekvivalentních atomů vodíku molekula obsahuje, dle polohy a tvaru píku ve spektru můžeme rozpoznat chemickou povahu těchto protonů a jejich bezprostředního okolí, dle intenzity píku určíme počet ekvivalentních protonů.

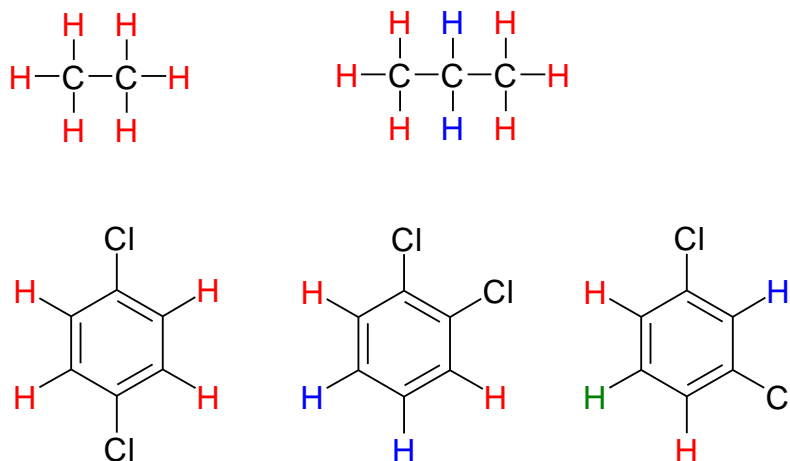
Chemický posun  $\delta$  protonů v  $^1\text{H}$  NMR spektroskopii je obvykle v rozmezí 0-13 ppm. V tabulce 6 jsou uvedeny chemické posuny protonů, podle nichž lze signál přiřadit určitému strukturnímu seskupení. Chemické posuny závisí především na okolní elektronové hustotě. Více stíněná jádra budou mít nižší hodnoty chemického posunu  $\delta$  (např. alkany), s rostoucí elektronegativitou sousedního atomu nebo skupiny klesá stínění a roste hodnota chemického posunu, taktéž přítomnost násobné vazby se projeví posunem k vyšším hodnotám  $\delta$ . Nejvyšších hodnot chemického posunu dosahují nejméně stíněné protony (např. vodíky aldehydické skupiny). Chemické posuny protonů vázaných na heteroatomech (NH, OH, SH) jsou silně závislé na použitém rozpouštědle, teplotě, koncentraci vzorku. Na rozdíl od protonů vázaných na uhlík jsou vyměnitelné, v přítomnosti vhodného rozpouštědla (např.  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dochází k výměně vodíku za deuterium a příslušný signál ve spektru je zeslaben nebo může zcela vymizet.

$\delta$ [ppm]	Typ protonu	Konkrétní příklady ( $\delta$ [ppm])
0,8 - 1,7	protony v nasyceném uhlovodíkovém řetězci	primární alkyl ( $R-CH_3$ ; 0,8-1,1) sekundární alkyl ( $R-CH_2-R$ ; 1,2-1,4) terciární alkyl ( $R_3CH$ ; 1,4 - 1,7)
1,5 - 3,0	protony na atomu uhlíku v sousedství dvojných vazeb	allyl ( $R_2C=CR-CH_3$ ; 1,5-2,2) keton ( $RC=OCH_3$ ; 2,1-2,6) benzyl ( $C_6H_5CH_2R$ ; 2,2 - 3,0)
2,5 - 5,0	protony na atomu uhlíku vázaného na elektronegativní atom(y)	alkohol, ether ( $RCH_2-O$ ; 2,5-5,0) alkylamin ( $RCH_2-N$ ; 2,5 - 3,5) alkylhalogenid ( $RCH_2-X$ ; 2,5 (I) - 4,5 (F))
4,5 - 6,5	protony na atomu uhlíku s dvojnou vazbou	vinylové skupiny ( $R_2C=CH_2$ ; 4,5 - 5,0) ( $R_2C=CH-R$ ; 5,2 - 5,7)
6,5 - 8	aromatické a heteroaromatické protony	benzen ( $C_6H_6$ ; 7,26) pyridin ( $C_5H_5N$ ; 7,2 - 8,6)
9,5 - 13	protony v silně elektronakceptorních skupinách	aldehydy ( $RCH=O$ ; 9,5 - 10,5) karboxylové kyseliny ( $-COOH$ ; 11,0-13)

Tab. 6: Přibližné oblasti chemických posunů  $\delta$  vybraných protonů v organických sloučeninách

Chemicky ekvivalentní vodíky (**homotopické** vodíky) poskytují v NMR spektru jediný signál. Jedná se o atomy vodíku, které jsou v dané molekule vázány stejným způsobem, mají tedy stejné elektronové okolí a rezonují tak při stejné frekvenci. Chemicky neekvivalentní vodíky (**heterotopické** vodíky) se liší svým elektronovým okolím a poskytují tak v NMR spektru odlišné signály. K posouzení ekvivalence jednotlivých protonů v molekule nám může posloužit záměnná operace. Postupně budeme nahrazovat každý vodík v molekule (vždy jen jeden) hypotetickým substituentem a porovnáme vzniklé struktury. Pokud vznikají identické sloučeniny, jsou vodíky ekvivalentní, pokud vzniká nová sloučenina, vodíky jsou neekvivalentní a budou mít v NMR rozdílné signály. Například náhradou jakéhokoli vodíku v molekule ethanu bude vznikat vždy jen 1-substituovaný ethan a ve spektru ethanu tak bude jediný signál. V případě propanu již bude vznikat 1- nebo 2-substituovaný propan a ve spektru propanu tak nalezneme 2 signály, jeden pro methylenovou skupinu a druhý pro obě methylové skupiny (Obr. 37). Jinou možností posouzení ekvivalence jednotlivých protonů je zavedení operace symetrie (rotace, zrcadlení). Atomy, které jsou navzájem vztaženy operací

symetrie, jsou ekvivalentní. Např. vzhledem k symetrii molekuly jsou všechny atomy vodíku v *p*-dichlorbenzenu homotopické, *o*-dichlorbenzen již obsahuje dva typy vodíků a *m*-chlorbenzen tři (Obr. 37).



Obr. 37: Příklady sloučenin s vyznačením ekvivalentních atomů vodíků (atomy vodíků stejné barvy v dané sloučenině jsou homotopické)

Intenzity jednotlivých signálů v  $^1\text{H-NMR}$  spektru odpovídají počtu ekvivalentních vodíků podílejících se na daném signálu. Plocha pod signálem je tedy přímo úměrná počtu protonů. Kvantitativně ji určujeme integrací. V případě propanu tak bude vzájemný poměr ploch obou signálů 6:2 (resp. 3:1).

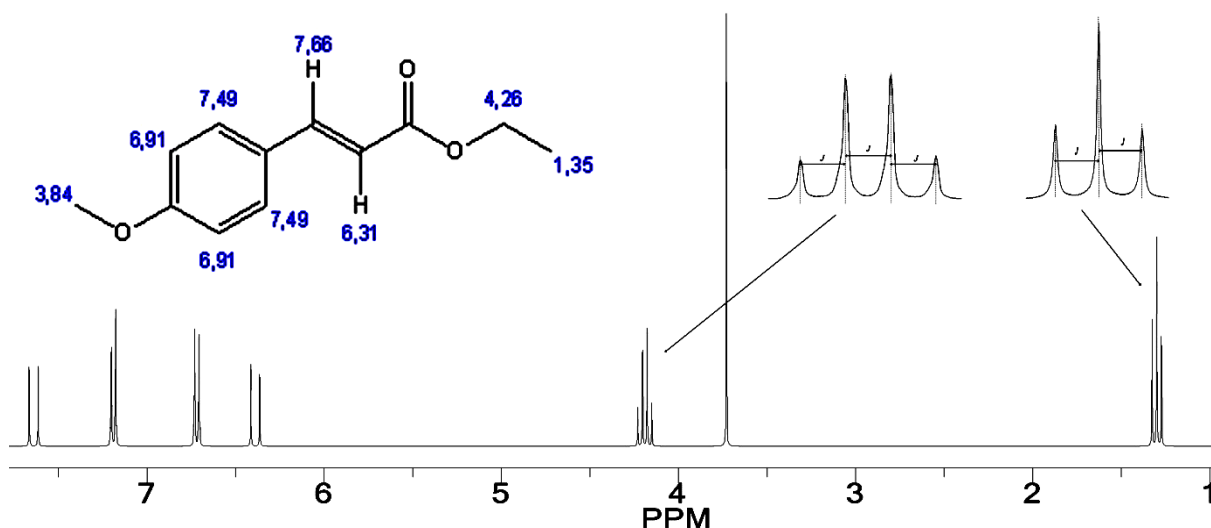
Většinou nejsou signály v  $^1\text{H-NMR}$  spektru tvořeny jednoduchým píkem, ale jsou rozštěpeny na více linií - tvoří tzv. multiplet. Toto štěpení je způsobeno spin-spinovou interakcí (spin-spin coupling) se sousedními neekvivalentními jádry (obvykle max. přes tři vazby). Obecně pro magneticky aktivní jádra platí, že pík sledovaného jádra (či ekvivalentních jader), který má v sousedství  $n$  jiných vzájemně ekvivalentních jader se spinovým kvantovým číslem  $I$ , se štěpí na  $2nI+1$  linií, konkrétně pro vodíky ( $I = \frac{1}{2}$ ) pak  $n+1$  linií. Intenzita linií v multipletu odpovídá možným kombinacím spinů sousedních jader (viz Tab. 7).

Počet sousedních vzájemně ekvivalentních protonů	Typ multipletu sledovaného protonu či ekvivalentních protonů (symbol)	Poměr intenzit
0	singlet (s)	1
1	dublet (d)	1:1
2	triplet (t)	1:2:1
3	kvartet (q)	1:3:3:1
4	kvintet (qi)	1:4:6:4:1
6	septet (sep)	1:6:15:20:15:6:1

Tab. 7: Typy multipletů a poměr intenzit jednotlivých linií

Kvantitativní hodnotou štěpení je **interakční konstanta  $J$**  (coupling constant), jenž představuje vzdálenost mezi jednotlivými liniemi multipletu udávanou v Hz. Spin-spinová interakce je vzájemná, skupina ekvivalentních vodíků A štěpí signál skupiny vodíků B a naopak se stejnou interakční konstantou  $J$  (viz Obr. 38). Jsou-li však sousední protony sledovaného jádra (či ekvivalentních jader) vzájemně neekvivalentní, bude docházet ke vzniku kombinovaných multipletů (např. dublet dubletů, triplet dubletů). Není-li zřejmé, jakou strukturu signál vlastně má, nazýváme ho obecně multipletem (m).

Multiplicita signálů tak poskytuje cennou informaci o okolí jader atomů vodíků a je klíčem ke strukturní analýze organických sloučenin.



Obr. 38:  $^1\text{H}$  NMR spektrum ethylesteru kyseliny 4-methoxykořicové:

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,66$  (d, 1H,  $J = 16,0$  Hz),  $7,49$  (d, 2H,  $J = 8,8$  Hz),  $6,91$  (d, 2H,  $J = 8,8$  Hz),  $6,31$  (d, 1H,  $J = 16,0$  Hz),  $4,26$  (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz),  $3,84$  (s, 3H),  $1,35$  (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz)

U složitějších přírodních látek bývá však díky značným překryvům přiřazení multiplicity signálů velmi obtížné. Zdrojem informací o prostorově blízkých protonech tak může být **NOE (Nuclear Overhauser Effect) experiment**. Nukleární Overhauserův efekt je důsledek dipolární interakce mezi dvěma jádry. Vzniká přímou interakcí volně přes prostor a není ovlivněn chemickými vazbami jako nepřímá spin-spinová interakce. Nukleární Overhauserův efekt klesá s šestou mocninou vzdálenosti mezi jádry a proto se velmi často používá k měření vzdálenosti mezi jádry především v 2D-NMR spektroskopii (viz **NOESY**).

#### 5.4.5 Jednodimenzionální $^{13}\text{C}$ NMR

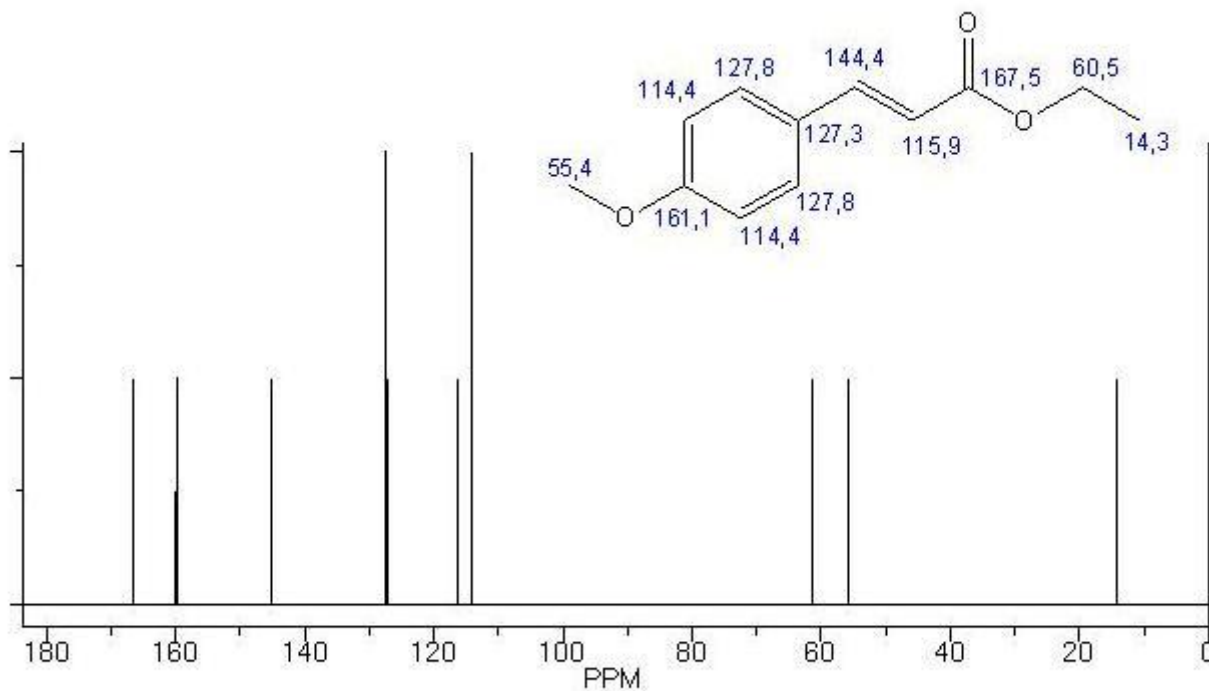
NMR spektroskopie uhlíkového atomu je umožněna díky přirozenému zastoupení izotopu  $^{13}\text{C}$  (běžný izotop  $^{12}\text{C}$  má  $I = 0$ , a proto neposkytuje NMR signál). Zastoupení izotopu  $^{13}\text{C}$  je však poměrně malé (1,11 %), navíc je jeho rezonanční frekvence cca  $4\times$  menší než rezonanční frekvence atomů vodíku (např. při měření na 200 MHz spektrometru bude rezonanční frekvence uhlíkových atomů při cca 50 MHz). Pro měření uhlíkových spekter tak musí být použity citlivější spektrometry (FT-NMR) a doba měření může být řádově i v hodinách (dle množství vzorku a kvality přístroje). Chemické posuny v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech jsou stejně jako u vodíkových spekter závislé na elektronové hustotě okolo daného jádra, poskytují však větší rozsah stupnice nejčastěji 0-220 ppm (vtaženo k  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm). Příklady posunů pro konkrétní typy uhlíkových atomů jsou uvedeny v tabulce 8.

Typ uhlíku (typ vazby)	$\delta$ [ppm]	Typ uhlíku (typ vazby)	$\delta$ [ppm]
primární alkyly ( $R-CH_3$ )	0-30	alkeny ( $C=C$ )	100-150
sekundární alkyly ( $R_2-CH_2$ )	10-50	areny (arom. $C=C$ )	110-160
terciární alkyly ( $R_3-CH$ )	15-50	nitrily ( $C\equiv N$ )	115-130
alkylhalogenidy ( $R_3C-X$ )	10 (I)-75(F)	amidy ( $CO-NR_2$ )	150-180
aminy ( $C-N$ )	40-70	karboxylové kyseliny, estery ( $R-O-C=O$ )	160-185
alkoholy, ethery ( $C-O$ )	40-80	aldehydy, ketony ( $R_2-C=O$ )	175-215
alkyny ( $C\equiv C$ )	60-90		

Tab. 8: Přibližné oblasti chemických posunů  $\delta$  vybraných typů atomů uhlíku v organických sloučeninách

Na rozdíl od  $^1H$  NMR signálů ne vždy odpovídají intenzity jednotlivých signálů v uhlíkových spektrech počtu ekvivalentních uhlíků podílejících se na daném signálu. Např. signály kvartérních uhlíků dávají slabší signály než uhlíky s vázanými atomy vodíku.

Obdobně jako u vodíkových spekter i uhlíkové signály mohou být štěpeny sousedními neekvivalentními magneticky aktivními jádry. Vzhledem k velmi malé pravděpodobnosti výskytu dvou jader izotopu  $^{13}C$  v těsné blízkosti je homonukleární interakce  $^{13}C-^{13}C$  za běžných podmínek nepozorovatelná. Může se však projevit heteronukleární spin-spinová interakce  $^1H-^{13}C$ , pro určení multiplicity signálu lze pak využít již dříve zmiňované pravidlo  $n+1$ , kde  $n$  je počet vázaných atomů vodíku na daném uhlíkovém atomu. Signál kvartérního uhlíku tak bude singlet, signál uhlíku methinové skupiny dublet, methylenové skupiny triplet a methylové skupiny kvartet. Daný jev by tak měl usnadňovat interpretaci naměřeného spektra. Ve skutečnosti však naopak dochází díky těmto interakcím jednak ke značnému snížení citlivosti měření (rozštěpením signálu na jednotlivé linie se zmenší jeho intenzita), navíc v oblasti spektra s větším výskytem signálů dochází k jejich překryvům. Při měření běžných uhlíkových spekter se proto využívá tzv. **širokopásmový heteronukleární dekaplink** (broadband heteronuclear decoupling), kdy během měření  $^{13}C$  spekter je vzorek současně ozařován pásmem frekvencí, shodným s rezonanční frekvencí jader vodíků. Tím se odstraní štěpení vodík-uhlík a ve spektru má každý neekvivalentní atom uhlíku jeden signál (singlet) - viz Obr. 39.



Obr. 39: <sup>13</sup>C NMR spektrum ethylesteru kyseliny 4-methoxyskořicové (měřeno s širokopásmovým heteronukleárním dekaplinkem)

Pro jednodušší přiřazení signálů k jednotlivým atomům uhlíku měřené sloučeniny mohou posloužit i jiné 1D <sup>13</sup>C NMR experimenty, při kterých nemusí být vždy prováděno širokopásmové ozařování protonů během celé doby měření uhlíkového spektra, ale pouze během některých úseků, a navíc mohou být i různými pulsy ozařována uhlíková jádra.

**APT** (Attached Proton Test) experiment umožňuje s využitím multipulsní sekvence rozlišit signál uhlíků methinové (>CH-) a methylové skupiny (-CH<sub>3</sub>), jež vykazují signály s negativní intenzitou (píky směřují dolů pod základní nulovou linii), od signálů uhlíků methylenové skupiny (-CH<sub>2</sub>-) a kvarterních uhlíků (>C<) se signály s pozitivní intenzitou, přičemž >C< mají výrazně nižší intenzitu signálů oproti -CH<sub>2</sub>-.

**DEPT** (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) experiment umožňuje rozlišit signály primárních, sekundárních a terciárních atomů uhlíku. Nejčastěji je DEPT spektrum získáno použitím série dílčích experimentů - DEPT-45 (zobrazí se všechny uhlíky nesoucí vodíky), DEPT-90 (zobrazení pouze >CH-) a DEPT-135 (zobrazené signály >CH- a -CH<sub>3</sub> jsou pozitivní, signály -CH<sub>2</sub>- negativní) a následným vzájemným odečtením spekter získáme výsledné spektrum složené ze subspekter pro jednotlivé typy C. Signály kvarterních uhlíků jsou potlačeny a je třeba je identifikovat porovnáním s běžným <sup>13</sup>C spektrem.



#### 5.4.6 Dvoudimenzionální $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ NMR

Při strukturální analýze známé látky si většinou vystačíme s jednodimenzionální NMR spektroskopii s případným porovnáním spekter z různých databází. V případě neznámých přírodních látek jsou 1D-NMR experimenty používány pro základní analýzu a určení charakteru zkoumaných látek, tj. zjištění, jestli látka patří mezi terpeny, aromatické sloučeniny, alkaloidy, glykosidy apod. K přesnému určení struktury jsou pak často využívány metody dvourozměrné NMR spektroskopie.

##### Základní princip 2D NMR spektroskopie

Na rozdíl od 1D NMR, kdy FID je záznamem závislosti intenzity signálu na čase, jsou 2D spektra záznamem závislosti intenzity na dvou nezávislých časových proměnných. Obecný průběh 2D experimentu lze rozdělit do čtyř fází. V přípravné fázi dochází k ozařování vzorku prvním pulsem, následuje vývojová fáze pro evoluční dobu  $t_1$ , druhý puls představuje směšovací fázi a následuje detekční fáze po dobu  $t_2$ , přičemž evoluční doba  $t_1$  se během měření mění a doba detekce  $t_2$  je konstantní. Následnou dvojnásobnou Fourierovou transformací se získá trojrozměrné spektrum. Panoramatické 3D zobrazení (stacked plot) zahrnuje kompletní informaci o intenzitě, je však často nepřehledné, těžce interpretovatelné a datově náročné. Zjednodušení představuje vrstevnicové zobrazení (contour plot) odpovídající horizontálním řezům v určité výšce (hladině) intenzit signálů. Volbou hladiny lze eliminovat šum, je-li však příliš vysoká, hrozí ztráta malých signálů.

Na základě korelace druhů jader se 2D experimenty dělí na homonukleární (koreluje jeden druh jader např.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) a heteronukleární (koreluje dva různé druhy jader např.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

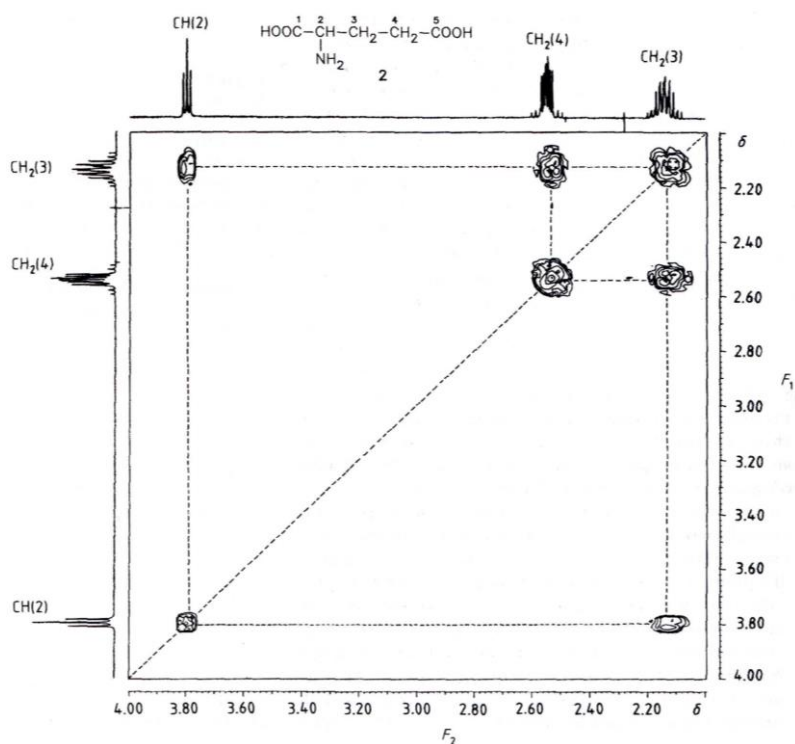
Dále lze dělit 2D NMR spektra na **rozlišená dle interakční konstanty  $J$**  - na jedné ose jsou chemické posuny  $\delta_{\text{C}}$  nebo  $\delta_{\text{H}}$  a na druhé jsou příslušné interakční konstanty  $J_{(\text{H,H})}$  = homonukleární,  $J_{(\text{C,H})}$  = heteronukleární (starší metody, dnes méně používané) a na **korelovaná 2D NMR spektra** (homonukleární nebo heteronukleární - na obou osách jsou chemické posuny  $\delta$ ).

V dnešní době existuje velké množství 2D experimentů, následující přehled se dotýká jen vybraných nejpoužívanějších procedur.

##### Homonukleární 2D NMR experimenty

Jedním z nejčastěji používaných 2D experimentů je **COSY** (Correlation Spectroscopy). Jedná se o homonukleární korelované  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spektrum, které má ve vrstevnicovém zobrazení

čtvercový charakter. Po obou stranách jsou chemické posuny vodíků  $\delta_H$  a spektrum je tak diagonálně symetrické - píky zobrazené na diagonále odpovídají původnímu  $^1H$  spektru. Jsou-li neekvivalentní jádra v interakci, objeví se ve spektru mimodiagonální píky - tzv. krosníky. Interagující jádra lze ve spektru nalézt vedením horizontální a vertikální linie z krosníku. V místě průtoku diagonály se musí nacházet píky pro příslušná vodíková jádra (viz Obr. 40). Byla vytvořena celá řada COSY experimentů s cílem zvýšit rozlišení a kvalitu korelačních schémat. Tyto vylepšené COSY experimenty jsou užitečné zejména v případě, když jsou interakční konstanty velmi malé ( $J < 3$  Hz) a často nejsou v 1D spektru rozlišitelné. Příkladem může být **delayed COSY** (= **long-range COSY**). V tomto experimentu je možno pozorovat interakce mezi protony, u kterých je interakční konstanta menší než 2 Hz (allylové uskupení, strukturální uskupení oddělené kvartérním uhlíkem - interakce na dlouhé vzdálenosti přes více než tři vazby).



Obr. 40:  $^1H$ - $^1H$  COSY spektrum kyseliny glutamové; převzato z [[Friebolin, H.: Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Wiley-VCH, 1998.]

Mezi novější metodu homonukleární korelované 2D-spektroskopie patří **NOESY** (2D-NOE - Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy). Umožňuje měřit NOE v jediném experimentu mezi všemi vodíky molekuly. Ve spektru je na diagonále klasické 1D spektrum, krosníky indikují dipolární interakce prostorem a mají opačnou fázi než signály diagonálních

píků. Intenzita těchto signálů je úměrná intenzitě NOE. Kalibrací spektra využitím známých vzdáleností protonů lze z intenzit krosníků přímo určit meziatomové vzdálenosti. NOESY spektra mají tak využití zejména v konformační analýze biomolekul, kdy zjištěním vzdálenosti jader v prostoru určíme 3D strukturu molekuly. Analýza dat zejména pro velké molekuly vyžaduje výkonné počítače a programy na zpracování.

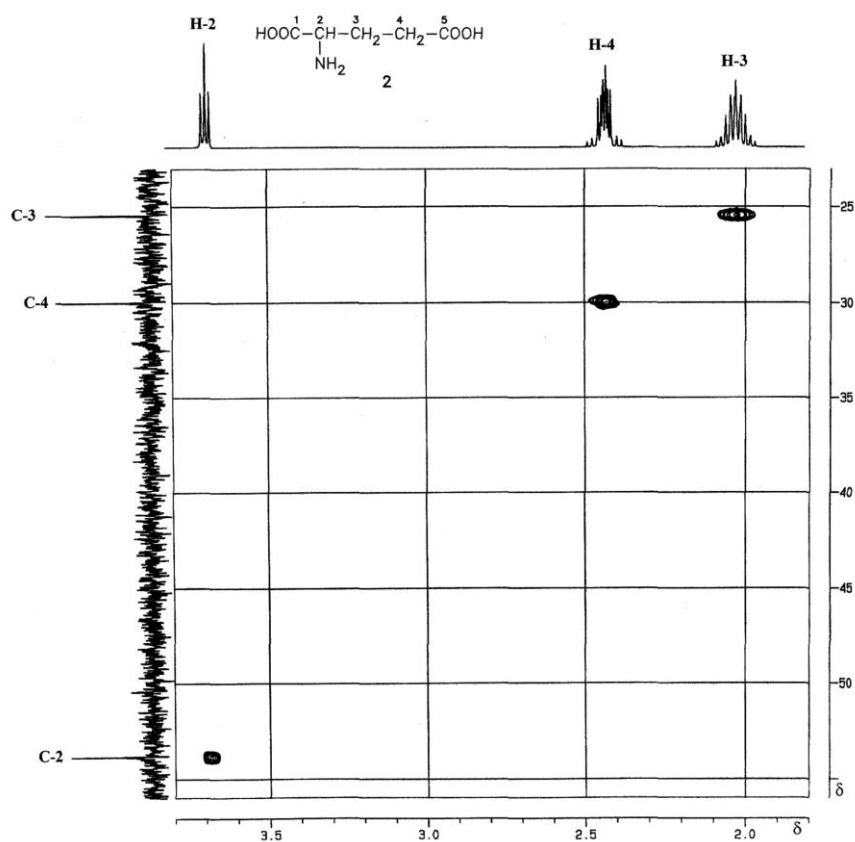
**TOCSY** (Total Correlation Spectroscopy) experiment též nazývaný **HOHAHA** (Homonuclear Hartmann Hahn) experiment využívá tzv. spin-locking techniku měření (speciální kompozitní pulsy „uzamknou“ magnetizaci kolem osy y, dojde k přiblížení energetických hladin jednotlivých spinů, magnetizace může volně přecházet z jednoho na druhý). Výsledkem experimentu jsou spektra, ve kterých jsou korelována všechna jádra spinového systému. Spektrum tak v ideálním případě obsahuje pro každý proton krosníky se všemi ostatními protony spinového systému. Metoda je hlavně využívána při strukturální analýze biomolekul typu peptidů nebo oligosacharidů.

**2D-INADEQUATE** (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer; též C-C-COSY) experiment poskytuje mapu propojení uhlíkových atomů na základě existence interakčních konstant  $J$  ( $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ ). Experiment vyžaduje, aby v molekule byly přítomny dva na sebe vázané atomy  $^{13}\text{C}$ . Díky velmi nízkému zastoupení izotopu  $^{13}\text{C}$  je pravděpodobnost takového seskupení velmi malá (cca 1/10000). Je to náročný experiment a jeden z vrcholů současné NMR techniky. Experiment však vyžaduje velké množství vzorku (okolo 200 mg) a doba měření je značně dlouhá. Až poslední technická vylepšení (dusíkem chlazená sonda, vylepšení sběru dat) umožnila práci i s menším množstvím látky.

### Heteronukleární 2D NMR experimenty

Nejběžnější heteronukleární variantou korelovaných 2D spekter je experiment  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSY = **HETCOR** (Heteronuclear Correlation Spectroscopy). Na jedné ose je chemický posun atomů vodíku  $\delta_{\text{H}}$  a na druhé ose chemický posun atomů uhlíku  $\delta_{\text{C}}$ . Protože chemické posuny jsou v obou dimenzích různé, nejsou HETCOR spektra diagonálně symetrická. Ve spektru se zobrazí krosníky, jenž jsou výsledkem korelací spin-spinových interakcí  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Ze spektra lze jednoduše odečíst, jaké protony jsou vázány na konkrétní atom uhlíku tak, že se od krosníku vede horizontální a vertikální linie, průsečíky na osách určí pozice (chemické posuny  $\delta$ ) interagujících jader (viz. Obr. 41). Touto metodou lze tedy pozorovat pouze uhlíky s přímo vázanými vodíky, signály kvarterních uhlíků se ve spektru neobjeví. Úpravou pulsní sekvence experimentu HETCOR umožňuje tzv. **COLOC** (Correlation via Long-range Coupling) experiment zobrazení interakcí daného uhlíku

s vodíky přes více než jednu vazbu (long-range C-H interakce). Při identifikaci těchto spekter je však vhodné je vždy porovnávat se spektry HETCOR, neboť se v COLOC spektrech mohou objevovat i rezidua jednovazebných interakcí.



Obr. 41:  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSY (HETCOR) spektrum kyseliny glutamové; převzato z [Friebolin, H.: Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Wiley-VCH, 1998.]

V současné době jsou v strukturní analýze často používány 2D heteronukleární experimenty s inverzní detekcí (HMQC, HSQC, HMBC). Mají vyšší citlivost než experimenty s přímou detekcí (HETCOR, COLOC). Vyšší citlivosti lze dosáhnout vhodným uspořádáním experimentu z hlediska excitovaného a detekovaného jádra. Při přímé detekci je excitováno a detekováno stejné jádro. Inverzní techniky spočívají v excitaci jader s velkou citlivostí ( $^1\text{H}$ ), následný přenos polarizace na jádra s nízkou citlivostí ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) a zpět, a detekce jader s velkou citlivostí. Ve výsledném spektru se tak nepřímou detekcí zobrazí informace o málo citlivém jádru. Inverzní experimenty jsou náročnější na přístrojové vybavení a vyžadují speciální sondu.

Experimenty **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) a **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Correlation) poskytují korelace jader  $^1\text{H}$  s jádry  $^{13}\text{C}$  přímo na ně vázanými, tedy přenos magnetizace se děje přes jednovazebnou interakční konstantu  $J_{\text{H-C}}$ .

Ve spektrech se tedy neobjeví atomy kvarterních uhlíků, ale jen uhlíková jádra, která mají přímo vázaný atom  $^1\text{H}$ . Výsledné spektrum poskytuje obdobnou informaci jako HETCOR, má však vyšší citlivost.

Experiment **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) naproti tomu koreluje jádra  $^1\text{H}$  s jádry  $^{13}\text{C}$  (nebo  $^{15}\text{N}$ ) přes dvě nebo tři vazby (interakce dalekého dosahu). Slouží tedy především k identifikaci jader, které nemají přímo vázaný atom  $^1\text{H}$ , např. kvarterních uhlíků. HMBC je např. též využíván při strukturní charakteristice alkaloidů k detekci  $^{15}\text{N}$  a  $^1\text{H}$  korelací.

## 5.5 Rentgenová (RTG) difrakce

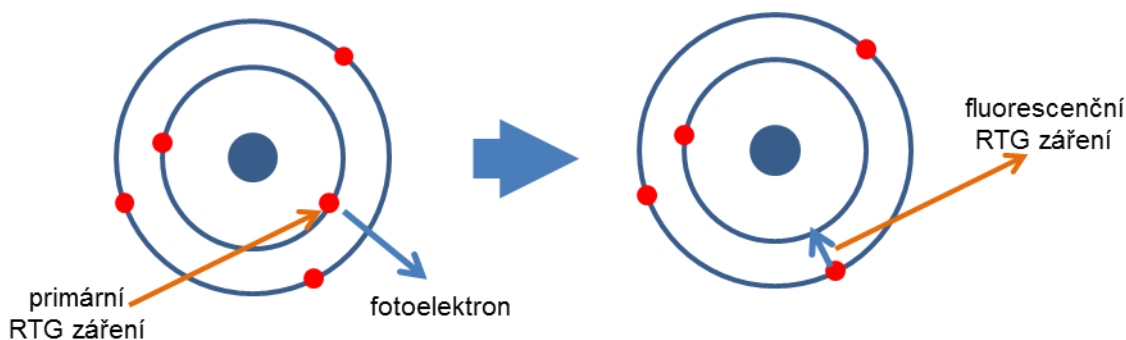
Rentgenová difrakce je metoda určování uspořádání atomů v krystalu. Při dopadu RTG záření na krystal je toto záření difraktováno (odraženo) do mnoha směrů. Z naměřených úhlů a intenzit difraktovaných paprsků rotujícího krystalu můžeme pomocí specializovaných programů zjistit trojrozměrný obraz hustoty elektronů v krystalu a následně můžeme určit pozice atomů v krystalu (3D model molekuly), jejich chemické vazby a další informace.

Rentgenová difrakce se dělí na dvě základní metody, a to na difrakci na monokrystalu a práškovou difrakci. RTG prášková difrakce je využívána zejména jako kontrolní metoda pro charakterizaci krystalického materiálu (průmyslové aplikace) a její hlavní výhody jsou: vysoká rychlost měření, odpadá proces přípravy monokrystalu, možnost analyzovat směsi látek. Avšak pro úplnou strukturní analýzu krystalů se složitou strukturou není RTG prášková difrakce vhodná. Naproti tomu metoda využívající difrakce na monokrystalu umožňuje úplnou strukturní analýzu látky (krystalu) a je tak jednou z hlavních metod při charakterizaci atomové struktury nových látek.

Rentgenovým zářením se rozumí elektromagnetické záření v intervalu vlnových délek 0,001 – 10 nm. Rentgenová difrakce využívá zejména vlnových délek okolo 0,05 – 0,25 nm, tj. vlnových délek srovnatelných s meziatomovými vzdálenostmi v krystalech. K difrakci záření dochází tehdy, blíží-li se vlnová délka záření vzdálenosti atomů v krystalické mřížce, se kterou záření interaguje. Rentgenová difrakce využívá tzv. pružného (koherentního) rozptylu záření, kdy mají rozptýlené paprsky stejnou energii a tím i vlnovou délku jako původní (primární) RTG záření.

Po dopadu RTG záření na analyzovaný materiál může docházet také k nepružnému (nekoherentnímu) rozptylu záření nebo k absorpci záření. Při nekoherentním rozptylu RTG záření ztrácí foton část své energie a rozptýlené záření má vyšší vlnovou délku než dopadající záření. Při absorpci RTG záření je veškerá energie fotonu přenesena na elektron a foton zanikne. Pokud je při nekoherentním rozptylu nebo absorpci RTG záření energie fotonu dostatečná, může dojít k uvolnění elektronu z vnitřního orbitalu atomu a na volné místo padá elektron z vyššího orbitalu. Přebytek energie je vyzářen jako sekundární (fluorescenční) RTG záření (Obr. 42). Vznik fluorescenčního záření není u metody rentgenové difrakce žádoucí, neboť toto záření zvyšuje pozadí při měření, ale lze ho potlačit použitím vhodné vlnové délky primárního rentgenového záření.

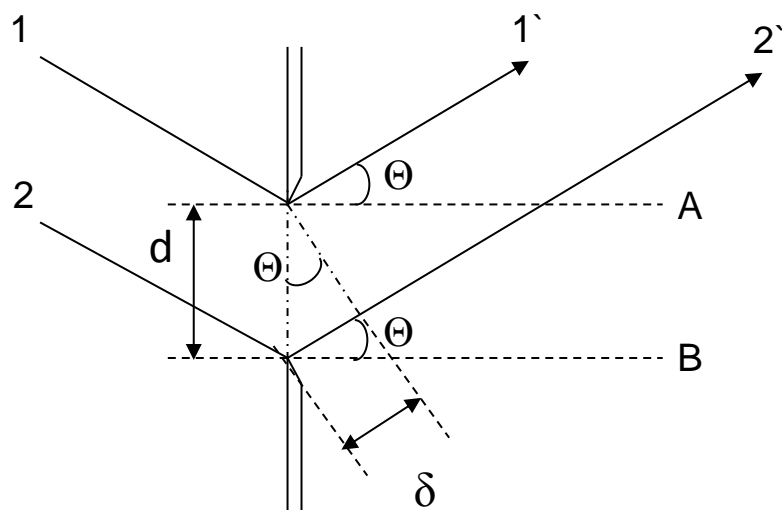
Fluorescenční záření je možné využít i pro analytické účely a tato metoda se nazývá emisní rentgenová spektrometrie. Vlnová délka fluorescenčního záření je delší než primárního RTG záření a je charakteristická pro jednotlivé atomy. Protože při absorpci RTG záření dochází k interakci s vnitřními elektrony (neovlivněnými vazbami atomu v molekule), je výsledné fluorescenční rentgenové záření do značné míry nezávislé na chemickém stavu prvků, čehož lze využít k identifikaci a kvantifikaci chemických prvků ve vzorku.



Obr. 42: Schematické znázornění vzniku fluorescenčního RTG záření.

### 5.5.1 Vznik difraktovaného záření

Difrakce RTG záření je výsledkem pružného rozptylu záření na elektronovém obalu atomů molekul či krystalů a jeho následné interference, vznikající v důsledku rozdílů v délkách dráhy od různých rozptylujících atomů k místu detekce. Výsledkem difrakce je vznik difrakčního obrazu s charakteristickými maximy a minimy intenzit difrakčních skvrn. Analýzou difrakčních skvrn (obraz krystalu v recipročním prostoru) se zjistilo, že krystal se chová, jako by obsahoval velké množství rovin umístěných v pravidelných vzdálenostech od sebe (Braggův popis difrakce). Difraktovaný paprsek vzniká „odrazem“ od této soustavy rovnoběžných rovin, v nichž jsou atomy v krystalu lokalizovány. Dopadající i difraktovaný paprsek svírají s uvažovanou soustavou rovin stejný úhel  $\theta$ , odpovídající zákonu difrakce (Obr. 43). Každá rovina odrazí jen malé množství záření, avšak výsledná difrakce od velkého počtu rovin poskytuje intenzitu dostatečnou pro pozorování.



Obr. 43: Schematické znázornění difrakce na krystalové mřížce;  $\theta$  – úhel dopadu RTG záření;  $d$  – mezivzrostová vzdálenost;  $\delta$  – dráhový rozdíl

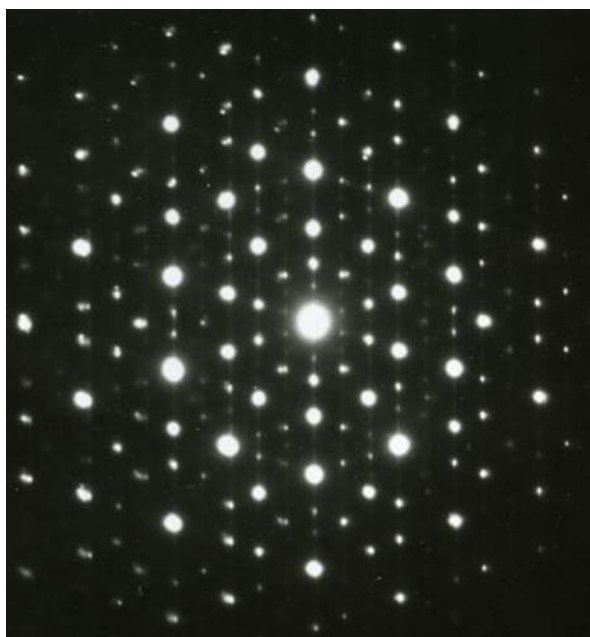
Strukturní informace o polohách atomů v krystalu může být odvozena z poloh a intenzit difrakčních maxim vznikajících difrakcí RTG záření. Rentgenové paprsky jsou difraktovány každou krystalickou látkou rozdílně v závislosti na typu atomů, z nichž se krystal dané látky skládá, a jejich uspořádání. Když rentgenový paprsek zasáhne vzorek a dojde k jeho difrakci, je možné za pomoci Braggova zákona (rovnice 14) změřit vzdálenost mezi jednotlivými rovinami atomů. Vybereme-li dvě libovolné paralelní roviny vzdálené o  $d$  a necháme-li na tyto roviny dopadat svazek rovnoběžných rentgenových paprsků o vlnové délce  $\lambda$ , jsou dopadající paprsky ve fázi. Paprsek 11' je difraktován rovinou A a paprsek 22' je difraktován rovinou B (Obr. 43). Aby i po difrakci byly oba paprsky ve fázi, musí být vzdálenost, kterou urazí paprsek 22' navíc oproti paprsku 11' (dráhový rozdíl  $\delta$ ) rovna celistvému násobku  $n$  vlnové délky  $\lambda$  dopadajícího záření (rovnice 14). Pouze za této podmínky detekujeme interferenční maximum difraktovaných paprsků. Dráhový rozdíl paprsků 11' a 22' je roven  $2d \times \sin \theta$ , kde úhel  $\theta$  je úhel, který svírá dopadající paprsek s rovinou krystalu. Spojením uvedených vztahů dostáváme Braggův zákon:

$$2d \times \sin \theta = n \times \lambda \quad (14)$$

Známe-li vlnovou délku RTG záření  $\lambda$  a změříme-li úhel  $\theta$ , můžeme určit vzdálenosti  $d$  krystalových rovin. Braggův zákon je základní rovnicí rentgenové difrakce.

Při popisu uvedených zákonitostí byla brána v úvahu pouze jedna sada rovin. Otáčením krystalu a změnou úhlu dopadajícího záření budou Braggův zákon splňovat různé sady rovin, a tím získáme bodový difrakční obraz monokrystalu (Obr. 44).

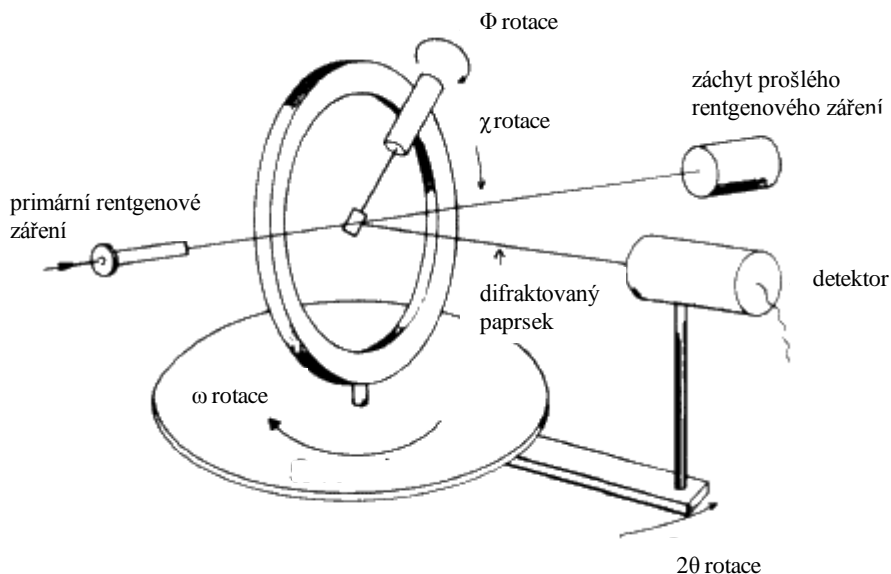




Obr. 44: Bodový difrakční obraz monokrystalu

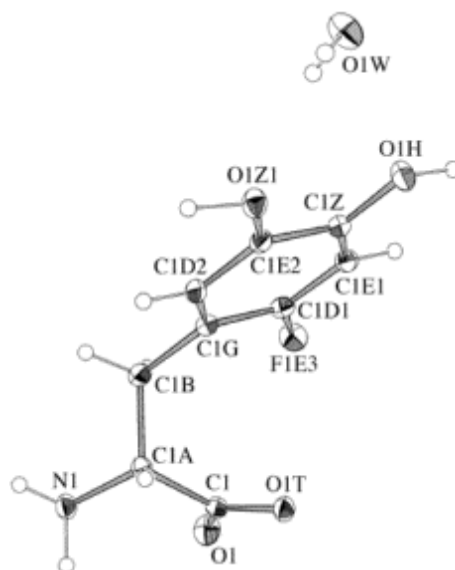
### 5.5.2 Techniky měření a prezentace výsledků

Aby došlo k difrakci RTG záření, musí toto záření dopadat na krystal pod úhlem  $\theta$  (Braggův zákon, rovnice 14). Tuto podmínku lze splnit vhodnou orientací krystalu vůči dopadajícímu RTG záření. Pro získání krystalografické struktury je nedostačující sledovat difraktované záření pouze z jedné polohy analyzovaného krystalu. Pro získání potřebných informací je nutné postupně krystalem otáčet a průběžně zaznamenávat difraktované záření. Pro určení pozic atomů v krystalu musíme znát polohy difrakčních maxim a jejich intenzitu. Zařízení umožňující otáčení krystalu v prostoru a detekci difraktovaného záření se nazývá difraktometr. Pro krystalografickou analýzu monokrystalů neznámých látek jsou zpravidla používány tzv. čtyřkruhové difraktometry (Obr. 45). Toto uspořádání umožňuje otáčení krystalu kolem společné osy (rotace  $\omega$  a  $\theta$ ) a dále otáčení ve dvou dalších směrech  $\chi$  a  $\Phi$ . Krystal se otáčí kolem osy  $\Phi$  a ta se i s krystalem pohybuje uvnitř  $\chi$  kruhu. Tento  $\chi$  kruh se otáčí kolem osy  $\omega$ . Poloha otočení krystalu se tedy vyjadřuje pomocí tří úhlů –  $\omega$ ,  $\chi$ ,  $\Phi$ . Detektor se pak otáčí v rovině goniometru podle úhlu  $2\theta$ . Nastavení krystalu a detektoru je zpravidla řízeno počítačem.



Obr. 45: Schematické znázornění čtyřkruhového difraktometru

Nejobtížnějším krokem při strukturní analýze pomocí difrakce na monokrystalu je příprava vhodného monokrystalu o velikosti 0,1 – 1 mm. Tento krok je také hlavním omezením této metody, protože ne vždy je možné takový krystal připravit. Pokud je vhodný krystal k dispozici jsou naměřena potřebná data (mřížkové parametry, polohy difrakčních maxim a jejich intenzity), ze kterých je vypočtena elektronová hustota. Do takto získané mapy elektronové hustoty je navržen model struktury, který je výpočetně optimalizován. Vzhledem k velkému množství výpočtů je vyhodnocení naměřených dat prováděno téměř výhradně pomocí specializovaných počítačových programů. Výsledná struktura se nejčastěji zobrazuje pomocí vhodného programu ve formě obrázků Ortep (Obr. 46).



Obr. 46: Ortep obrázek znázorňující molekulovou strukturu F-DOPA

### 5.5.3 Zdroje RTG záření a jeho detekce

RTG záření vzniká při dopadu vysoce urychlených elektronů na atomy hmoty. Na tomto principu pracují rentgenové lampy, tzv. rentgenky. Jsou to evakuované keramické trubice se dvěma zatavenými elektrodami, mezi nimiž je vysoké napětí 20 – 60 kV. Jako katoda slouží wolframové vlákno rozžhavené na velmi vysokou teplotu. Katoda produkuje elektrony, které jsou urychlovány v elektrickém poli a s velkou energií dopadají na anodu, tzv. antikatu. Kinetická energie elektronů se při dopadu mění z větší části na teplo (takže rentgenku je nutno intenzivně chladit) a pouze asi 1 % jejich energie se využije na emisi rentgenového záření. Vzniká spojitě a monochromatické záření. Monochromatické záření vzniká tak, že elektrony urychlené na dostatečnou energii proniknou do subvalenčních elektronových hladin anody (elektronové hladiny K a L) a zde vyrazí elektron. Z vyšší elektronové hladiny (vzdálenější od jádra) přeskóčí na uvolněné místo elektron s vyšší energií a tento přebytek energie se vyzáří jako RTG záření. Vlnová délka rentgenového záření, které se při přechodu vyzáří, je dána rozdílem energií obou hladin. Proto je tato vlnová délka charakteristická pro materiál anody a vzniklé záření se nazývá charakteristické. Volba rentgenové lampy (materiálu anody) se řídí povahou analyzovaného materiálu. Není žádoucí, aby docházelo k přílišné absorpci RTG záření vzorkem (prostředím). Nejběžněji používanými materiály anody jsou měď, kobalt nebo molybden.

Dalšími používanými zdroji RTG záření jsou synchrotrony. Rentgenové záření v synchrotronovém prstenci vzniká zakřivením dráhy relativistického elektronu. Rentgenové záření je vyzařováno ve směru pohybu částice (elektronu) podél tečny k její dráze a pokrývá velkou část elektromagnetického spektra (spojité spektrum). Toto záření se vyznačuje vysokou intenzitou. Protože cena tohoto zařízení je výrazně vyšší než běžných zařízení, využívá se k analýze materiálů s krátkou životností, které mohou degradovat vlivem RTG záření (např. krystalografická analýza enzymů). Analýza těchto materiálů je možná díky vysoké intenzitě synchrotronového RTG záření, což umožňuje krátkou dobu expozice a detekce.

Rentgenové záření je po interakci se vzorkem detekováno na základě několika principů (ionizace plynů, luminiscence určitých materiálů, změna vodivosti polovodičů nebo osvit fotografického filmu). Zatímco dříve dominovala metoda uchovávání obrazu na fotografický film, v současnosti se využívají metody digitální a další.

## 6 Testování biologické aktivity

Při přípravě materiálu pro testování biologické aktivity je nutné brát v úvahu rozpustnost. Všechna rozpouštědla, která přicházejí pro rozpouštění vzorků v úvahu, musejí být nejdříve otestována na aktivitu, která bude zkoumána. Jejich aktivita musí být nulová. Další podmínkou je kompatibilita rozpouštědla s prostředím testu a mísitelnost s dalšími používanými rozpouštědly (velmi často problém při testování lipofilních látek ve fyziologickém vodném prostředí). Při smíchání vzorku s prostředím nesmí dojít k precipitaci látek. Nejobvyklejší rozpouštědla pro testování jsou dimethylsulfoxid (DMSO), voda, ethanol, aceton a jejich směsi. Je možno také využít solubilizátorů typu Tween nebo Kremofor.

V současnosti je možno používat velmi široké spektrum testů biologických aktivit *in vitro*, které umožňují simulovat celou řadu fyziologických nebo patofyziologických procesů. Testovat je možné prakticky cokoli a záleží pouze na vybavení laboratoře, finančních možnostech a samozřejmě i schopnostech pracovníků. Testování lze provádět téměř libovolně, ale je lepší se řídit pokud možno racionálním výběrem testů, např. na základě etnofarmakologického průzkumu nebo chemické příbuznosti látek.

V současnosti je při jakémkoli testování biologické aktivity nutno jako pozitivní kontroly využívat standardy. Za standardy aktivity jsou obvykle voleny buď látky používané běžně v praxi pro terapii nemoci, nebo ovlivnění aktivity, kterou hodláme testovat, případně modelové experimentální sloučeniny, např. modelové inhibitory enzymů. Každopádně by taková referenční látka měla mít dobře popsané a charakterizované parametry účinku.

Celkově převládá trend testovat nově izolované látky *in vitro*, kde není potřeba laboratorních zvířat, z důvodů ekonomických, a také protože pro *in vitro* testy je třeba řádově menších množství izolovaných látek než pro *in vivo* experimenty na laboratorních zvířatech. Co se týká podmínek *in vitro* testů, je snaha je přibližovat podmínkám při *in vivo* testech, například použitím buněčných kultur. Čím přesnější simulace přirozeného prostředí, tím lépe. Je však celkem jasné, že pokud je přírodní látka po sériích *in vitro* testů považována za nadějný kandidát pro klinické použití, je třeba jak v rámci preklinického, tak posléze klinického hodnocení testovat *in vivo*. Přehled některých běžných metod a jejich základy jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 9).

<b>Aktivita</b>	<b>Základ testu</b>
Antibakteriální	Bakteriemi naočkovaná živná půda, turbidimetrie
Antifungální	Houbami naočkovaná živná půda, turbidimetrie
Inhibice enzymů	Kolorimetrie, radioaktivní značení, Western blott
Protitumorová, cytotoxická	Buněčné linie (MTT, WST)
Toxicita	Modelový organismus – např. <i>Artemia salina</i>
Antiparazitární	Modelový organismus – např. hmyzí larvy, příslušný parazit
Vazba na receptory	ELISA, chemiluminiscence, fluorescence

Tab. 9: Přehled nejběžnějších metod pro testování biologické aktivity

Moderní postup je tzv. bioaktivitou řízená izolace (bioactivity-guided isolation). Jde o proces, při kterém je v každém kroku získávání přírodní látky monitorována biologická aktivita. Všechny frakce získané separací jsou testovány jak z hlediska obsažených látek, tak biologické aktivity. Selekcí bioaktivních frakcí se fytochemik dostane k účinné látce. Pro určení aktivní látky je třeba aktivitu aspoň přibližně kvantifikovat, obvykle testováním dilučních řad jednotlivých frakcí. Tímto způsobem se zjistí nejen neaktivnější frakce, ale také jestli nedošlo k rozmělnění počáteční aktivity zjištěné u extraktu do mnoha frakcí. V průběhu separace může dojít ke snížení nebo vymizení aktivity frakcí: v extraktu je více než jedna aktivní látka a látka s nejvyšší aktivitou ještě nebyla nalezena, došlo k degradaci účinné složky, při separaci došlo k chybě a aktivní látka zůstala zachycena na koloně nebo aktivní sloučenina je rozložena do většího množství frakcí.

To, že izolace biologicky aktivních sloučenin je úspěšná a testování aktivity přináší nové látky, ukazují následující příklady sloučenin, kterou jsou v posledních fázích klinického výzkumu, nebo léčiva na bázi přírodních látek, která byla v poslední době zavedena do terapie.

**Arteether (Artemotil<sup>TM</sup>) – antimalarikum.** Artemisinin je seskviterpenoidní lakton vyskytující se v rostlinách *Artemisia annua* (tradiční čínská medicína quinghao). Jeho koncentrace v rostlinách je typicky okolo 0,2 %, což je poměrně málo. Více se vyskytující kyselina artemisininová (0,8 %) může být na artemisinin snadno konvertována. Polysynteticky jsou dále z artemisininu vytvářeny např. artemether, arteether nebo artesunát.

**Galanthamin (Reminyl<sup>TM</sup>)** – ovlivnění Alzheimerovy choroby. Galanthamin je alkaloid získávaný ze sněženek (zejména *Galanthus woronowii*), některých narcisů a bledulí. Tento alkaloid je známý poměrně dlouhou dobu v terapii myastenie, ale teprve v posledních letech je používán jako nootropikum, proti příznakům Alzheimerovy choroby a vaskulární demence.

**Leptospermon** – fluoroglucinový derivát izolovaný např. z *Leptospermum* spp. Vykazuje zajímavou antimikrobiální aktivitu proti resistantním druhům bakterií. Jeho další aktivitou je inhibice rostlinné 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasy. Tento efekt může být využit jako nová třída herbicidů. **Nitisonon (Orfadin<sup>TM</sup>)** je syntetický derivát leptospermonu. Využívá se v terapii tyrosinemie typu 1. Tyrosinemie typu 1 (HT-1) je dědičná metabolická porucha, charakterizovaná nedostatkem fumarylacetoacetát-hydrolasy, enzymu, který se účastní posledního stupně katabolismu tyrosinu. Při této poruše dochází k hromadění meziproductů přeměny tyrosinu, které inhibují metabolismus porfyrinů. Nitisonon je kompetitivní inhibitor 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy, enzymu, který se účastní katabolismu tyrosinu. Zásahem do katabolismu tyrosinu tak brání akumulaci toxických meziproductů.

**Tiotropium (Spiriva<sup>TM</sup>)** – semisyntetický derivát skopolaminu (*Atropa belladonna*) s parasymptolytickými vlastnostmi. Nevykazuje úplnou selektivitu ve vazbě na muskarinové receptory, ale lokálně aplikovaný (inhalací) působí hlavně na M<sub>3</sub> receptory lokalizované v hladkých svalech bronchů. Vyvolává bronchodilataci a používá se u chronické obstrukční nemoci plicní.

**Morfin-6-glukuronid** – hlavní aktivní metabolit morfinu (*Papaver somniferum*). Potenciálně velmi zajímavá sloučenina pro krátkodobou pooperační analgezii nebo lokální a periferní analgetickou terapii s nižším množstvím nežádoucích účinků než morfin.

**Vinflunin (Javlor<sup>TM</sup>)** – patří do skupiny látek zvaných vinka-alkaloidy (*Catharanthus roseus*), je to semisyntetický fluorovaný derivát. Vazbou na tubulin tato látka zabraňuje mitóze a potlačuje dělení nádorových buněk. Využití v terapii pokročilého nebo metastazujícího karcinomu močového ústrojí.

**Exatecan** – semisyntetický ve vodě rozpustný derivát kamptothecinu (alkaloidu *Camptotheca acuminata*). Inhibuje topoisomerasu I stabilizováním komplexu topoisomerasa I-DNA, tím inhibuje replikaci DNA a startuje apoptózu. Exatecan nevyžaduje enzymatickou aktivaci a je aktivnější než kamptothecin a jeho analoga.

**Calanolid A** – prenylovaný kumarin izolovaný ze stromu *Calophyllum lanigerum*. Patří do skupiny NNRTI (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors). Je potenciálně uplatnitelný v terapii virových onemocnění (HIV).

**Betulinová kyselina** – pentacyklický triterpen, nalezený např. v *Betula pendula*. Vykazuje antiretrovirové, antimalarické a protizánětlivé účinky. Inhibuje topoisomerasu a zejména její analoga jsou zkoumána jako možné proti-rakovinné látky.

**Silvestrol** – izolovaný z *Aglaia folveolata*, je derivát cyklopenta[*b*]benzofuranu. Je to sloučenina potenciálně využitelná v terapii rakoviny. Zvyšuje úroveň apoptosy, inhibuje nádorovou angiogenezi a inhibuje translaci mRNA souvisejících s malignitou buněk.

## 7 Použitá a doporučená literatura

### Metody extrakce a izolace, identifikační metody

Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 1999. ISBN: 978-1898298637. Lavoisier, 2nd edition.

Walton, N. J. Brown, D. E. (Editors). Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products. 1999. ISBN: 978-9810227739. World Scientific Pub Co Inc.

Cannell, R. J. P. (Editor). Natural Products Isolation. Methods in Biotechnology Volume No.: 4. 1998. ISBN: 978-0-89603-362-7. Humana Press.

Opletal, L., Drašar, P.: Fytochemické metody. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika), skriptum, Karolinum, Praha 1994.

Colegate, S. M., Molyneux, R. J. (Editors). Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. 2008. ISBN: 987-0-8493-7258-2. CRC Press.

### HPLC, GC, principy a teorie chromatografie

Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 2004. ISBN: 978-0470682180. John Wiley & Sons: Chichester, UK,.

Miller, J. M. Chromatography: concepts and contrasts, 2<sup>nd</sup> Edition. 2005. ISBN: 978-0-471-98059-9. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA,.

Štulík K. a kol. Analytické separační metody. Karolinum: Praha, 2006.

Harvey D. Modern Analytical Chemistry. 2000. ISBN: 978-0072375473. The McGraw-Hill Companies: Boston, USA, 2000.

Ardrey R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. 2003. ISBN: 0-471-49799-1. John Wiley & Sons: Chichester, UK.

### Nukleární magnetická resonance

Friebolin, H. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Rev. Ed. 1998. ISBN 35-272-9513-5. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

Lindon, J. C. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry [online]. San Diego: Academic Press, 2000 [cit. 2012-10-18]. ISBN 978-0-12-226680-5. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.katalog.vfu.cz:2048/science/referenceworks/9780122266805>.



Buděšínský, M., Pelnář, J.: Fyzikálně-chemické metody. Nukleární magnetická rezonance. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2000. ISBN 80-86241-07-6.

Výuka NMR spektroskopie - elektronické přednášky. [online] Laboratoř NMR spektroskopie VŠCHT Praha [cit. 2012-11-06] Dostupné z: <http://www.vscht.cz/nmr/vyuka.html>.

McMurry, J.: Organická chemie. Kap. 13. Určování struktury: Nukleární magnetická rezonance. Vyd. 1. 2007. ISBN 978-80-214-3291-8. VUT Brno - VUTIUM, VŠCHT Praha.

### **RTG difrakce**

Single-crystal X-ray Diffraction,

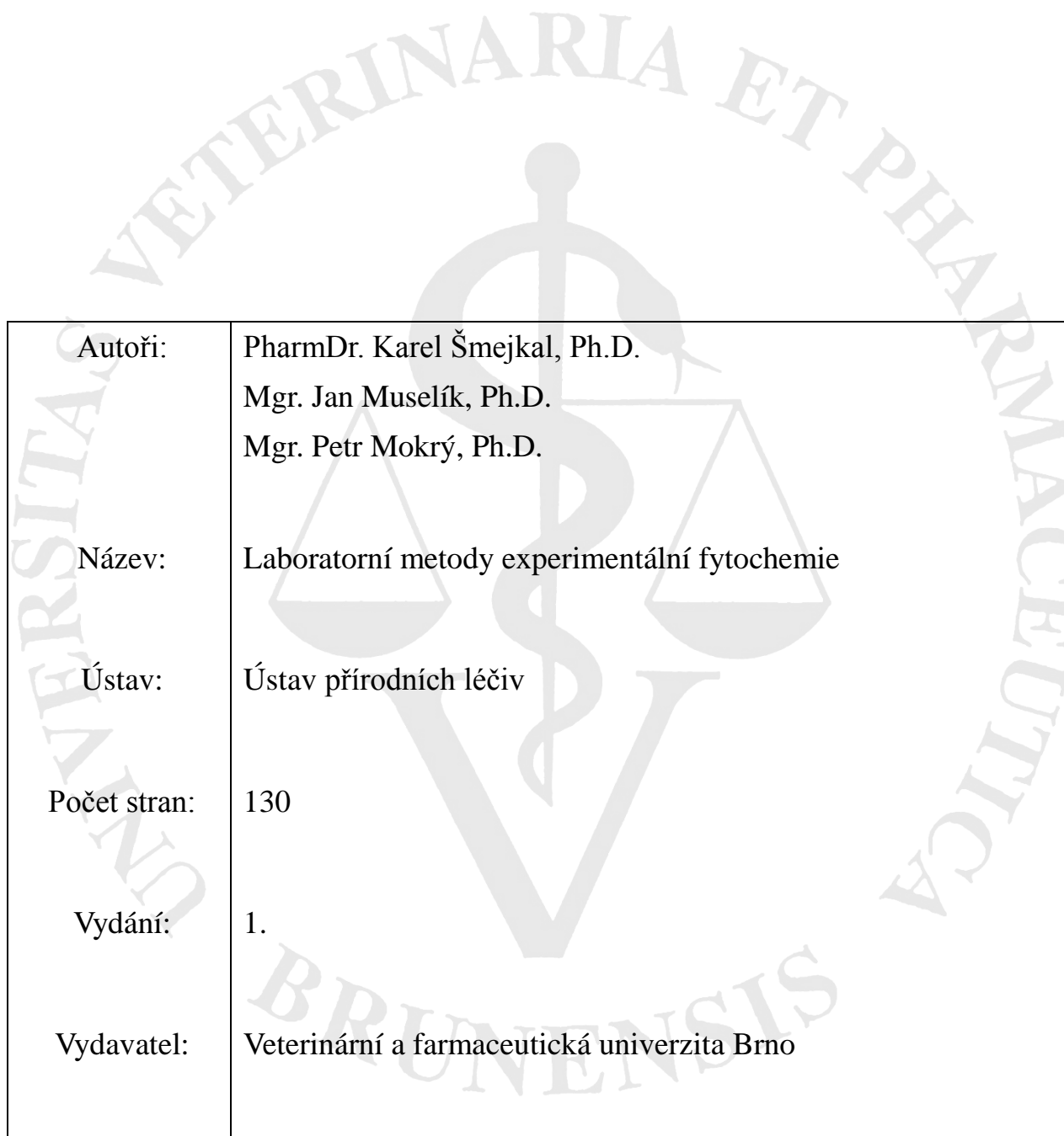
[http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SXD.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SXD.html) [cit. 2011-03-17].

Kraus, I. Úvod do strukturní rentgenografie. 1985. ISBN: 28.00. Academia: Praha.

Warren, B. E. X-Ray Diffraction. 1990. ISBN: 978-0486663173. Dover Publications: New York, USA.

Moderní přístupy k farmaceutické analýze. Dohnal J., Jampílek J., Král V., Řezáčová A., Eds.; 2010. ISBN 978-80-7305-085-6. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno: Praha.

Solid State Characterisation of Pharmaceuticals. Zakrzewski A., Zakrzewski M., Eds.; 2006. ISBN: 978-8392058458. Assa: Danbury, CT, USA.



Autoři:	PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D. Mgr. Jan Muselík, Ph.D. Mgr. Petr Mokrý, Ph.D.
Název:	Laboratorní metody experimentální fytochemie
Ústav:	Ústav přírodních léčiv
Počet stran:	130
Vydání:	1.
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

**ISBN 978-80-7305-649-0**