

Masarykova univerzita

Farmaceutická fakulta

Ústav přírodních léčiv

Praktické fytochemické úlohy pro farmakognozi a fytochemii

Návody pro laboratorní cvičení

Prof. PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D.

PharmDr. Markéta Gazdová, Ph.D.

PharmDr. Zuzana Hanáková, Ph.D.

1 Izolace obsahových látek rostlin – extrakční metody, purifikace

Obsahové látky v rostlinách:

- Primární metabolity (cukry, AMK, puriny a pyrimidiny NK, tuky, MK, chlorofyl a ostatní rostlinná barviva)
- Sekundární metabolity (terpenoidy, dusíkaté látky, fenolické látky, acetáty)

Dělení látek v rostlinách:

- Hlavní
- Vedlejší
- Balastní (chlorofyl, celulóza, lignin)

Fixace účinných látek:

- Chemicky
- Fyzikálně

Metody získávání účinných látek:

EXTRAKCE

Metoda, při níž dochází k dělení mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které mohou být v různých skupenstvích (pevná látka/kapalina; kapalina/kapalina)

Typy extrakcí dle extrakčních médií:

- Kapalina
- Plyn
- Pevná látka

Dělení extrakcí kapalinou:

- Totální
- Selektivní

Typy extrakcí kapalinou podle průběhu:

- Periodické
 - Macerace
 - Digesce
 - Nálev
 - Odvar
- Semikontinuální
- Kontinuální

Video:

Microwave extrakce

Superkritická extrakce

Vytřepávání

Soxhletův extraktor

Destilace s vodní parou (hydrodestilace)

MIKROSUBLIMACE

Metoda, jejímž principem je přeměna některých látek ze skupenství pevného do skupenství plynného s následnou desublimací na vhodném nosiči.

Video:

Mikrosublimate kofeinu

PURIFIKACE

Vhodně zvolenou metodou extrakce lze získat co největší podíl látek žádoucích ku množství nečistot, které jsou oddělovány dalšími extrakčními či purifikačními postupy.

- Liquid-liquid extrakce

Video:

Vytřepávání

- Lyofilizace
- Precipitace
- Krystalizace

1.1 Úloha č. 1: Zpracování rostlinného materiálu pro fytochemickou analýzu, macerace

Nejjednodušší extrakční metodou používanou ve fytochemické laboratoři pro získávání obsahových látek rostlin je macerace. Jejími hlavními výhodami jsou jednoduchost provedení, nenáročnost finanční i přístrojová, při vhodném nastavení také účinnost a selektivita.

Macerace se provádí v dobře uzavřených nádobách chráněných před světlem za normální teploty. Jednorázová vsádka materiálu se extrahuje daným množstvím extrakčního činidla po určitou dobu (nejčastěji 24 h).

V rámci této úlohy budeme zpracovávat vybraný rostlinný a připravovat z něj macerát, se kterým budeme dále pracovat na následujícím cvičení.

Postup:

Cca 100 g rostlinného materiálu vložíme do připravené stojatky. Následně zalijeme 500-1000 ml ethanolu tak, aby byl extrahovaný materiál zcela ponořený. Obsah promícháme pomocí skleněné tyčinky a nádobu uzavřeme a řádně označíme. Necháme macerovat do následujícího cvičení.

Nákres:

Závěr:

1.2 Úloha č. 2: Izolace rostlinných barviv z *Urtica dioica*

Video:

Soxhletův extraktor

Urtica dioica (Urticaceae), kopřiva dvoudomá, obsahuje v listech mj. vysoký podíl rostlinných barviv, především chlorofyl, karotenoidy, flavonoidy a xanthofyly. V acetonovém extraktu budeme tato barviva později identifikovat pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (TLC) a izolovat sloupcovou chromatografií (CC).

Postup:

10 g čerstvých kopřivových listů se nastříhá a extrahuje se 300 ml acetonu v Soxhletově extraktoru po dobu 4 hodin. Extrakt se poté vysuší bezvodým síranem sodným, zfiltruje se a na vakuové odparce se následně odpaří na objem cca 10 ml.

Schéma Soxhletova extraktoru:

Závěr:

1.3 Úloha č. 3: Izolace extraktivních látek ze *Species urologicae*

Species urologicae je rostlinná směs k přípravě čaje s diuretickými a antiseptickými účinky. Izolací methanolem získáme zejména fenolové glykosidy a flavonoidy.

Postup:

1 g čajové směsi se 15 minut vaří s 10 ml vody a 10 ml methanolu pod zpětným chladičem na vodní lázni. Směs se poté ještě za horka zfiltruje přes vatou, k filtrátu se po ochlazení přidá 5 ml roztoku octanu olovnatého (vysrážení tříslovin) a opět se zfiltruje. Filtrát se zahustí a uschová se do lékovky pro chromatografické stanovení.

Nákres aparatury:

Závěr:

1.4 Úloha č. 4: Mikrosublimate kofeinu

Video:

Mikrosublimate kofeinu

Při opatrném zahřívání kávy sublimuje při 140–150 °C kofein ve formě drobných jehličkovitých krystalů, které pozorujeme pod mikroskopem.

Postup:

Asi 0,1 g zkoušené práškové drogy umístěte do středu hodinového skla o průměru asi 7 cm. Sklo se pokryje plochou skleněnou destičkou, jejíž okraje přesahují asi o 1 cm hodinové sklo (lze také nahradit druhým hodinovým sklíčkem menšího průměru). Na horní destičku umístíme kádinku se studenou vodou, aby docházelo ke kondenzaci par. V případě horního hodinového sklíčka na něj umístíme vatou namočenou ve studené vodě. Droga se opatrně zahřívá minimálně 15 minut na azbestové síťce malým plamenem (nejméně 10–12 cm pod síťkou). Po skončení sublimace z horní destičky nebo sklíčka odpaříme vodu, po ochlazení pozorujeme pod mikroskopem a krystalky zakreslíme do protokolu.

Nákres mikrosublimateční aparatury:

Nákres jehličkovitých krystalků kofeinu:

Závěr:

1.5 Úloha č. 5: Purifikace vybraného extraktu liquid-liquid extrakcí

Rozdělování mezi nemísitelná rozpouštědla (liquid-liquid extrakce) neboli vytřepávání je metodou, pro jejíž provedení využíváme omezenou mísitelnost rozpouštědel, nacházejících se na opačných koncích eluotropní řady. Vzorek rozpuštěný v jedné fázi se vloží do dělicí nálevky a přidá se druhé, nemísící se rozpouštědlo (nejčastěji v poměru 1:1). Při vytřepávání dochází k difuzi extrahovaných látek a ustanovení koncentrační rovnováhy podle rozpustnosti látek v rozpouštědlech. Po separaci jsou jednotlivé fáze odděleny a odpařeny na rotační vakuové odparce.

V rámci cvičení budeme provádět vytřepávání acetonového extraktu, který jsme získali extrakcí rostlinného materiálu na předchozím cvičení a následným vysušením na rotační vakuové odparce.

Postup:

Suchý ethanolický extrakt rozpustíme ve 200 ml 80 % methanolu, přidáme 100 ml hexanu a přelijeme do dělicí nálevky, kde pozorujeme dvě zřetelně ohraničené vrstvy. Dělicí nálevku vyjmeme ze stojanu a **opatrně** protřepáváme za současného průběžného odpouštění par pomocí kohoutu. Vložíme zpět do stojanu, necháme ustálit a následně oddělíme obě získané vrstvy do připravených kádinek, kvantitativně je přeneseme do varných baněk a odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha. Methanolický podíl poté rozpustíme ve stejných objemových dílech (200 ml) chloroformu a vody a opět pozorujeme oddělování dvou nemísitelných kapalin. Provedeme vytřepání za současného odpouštění par, necháme ustálit, a jakmile jsou kapaliny viditelně odděleny, odpustíme chloroformovou vrstvu do připravené kádinky. Chloroformový podíl odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha, k vodnému zbytku přidáme stejný objemový díl (200 ml) ethylacetátu. Po protřepání a oddělení obou vrstev je postupně odpustíme do připravených kádinek. Ethylacetátový podíl odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha, z vodného podílu je zbytková voda vhodně odstraněna technikou lyofilizace. Získané 4 podíly budou použity pro chromatografickou separaci v následujících cvičeních.

Nákres aparatury a schéma postupu:

Závěr:

2 Chromatografická analýza a separace rostlinných extraktů

Video:

Analytická HPLC

Preparativní HPLC

HPLC-ELSD-CD

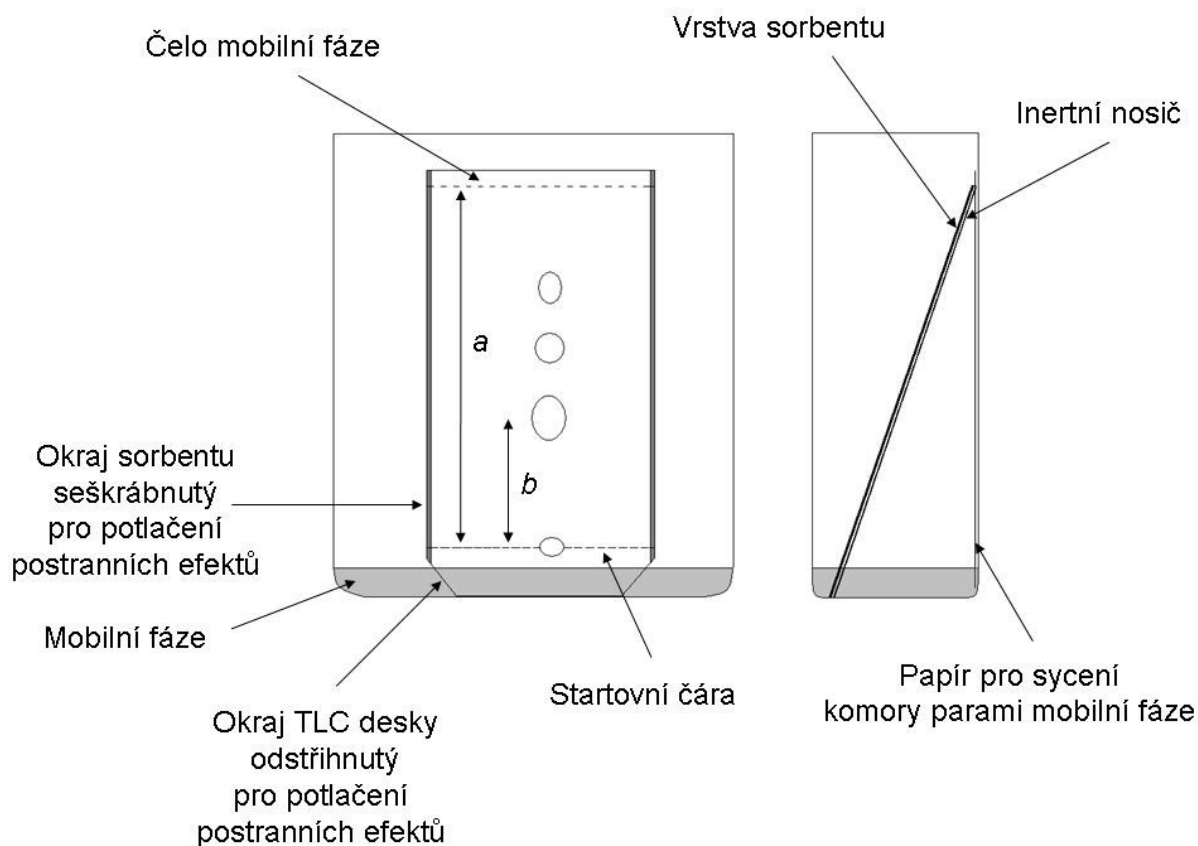
Analytická separační metoda, při níž dochází k rozdělování molekul analyzovaného vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, přičemž látky mají různou afinitu k jednotlivým fázím.

- Fáze mobilní
- Fáze stacionární

Dělení dle různých kritérií:

- 1) Dle charakteru stacionární fáze (SF)
 - Uložena v ploše
 - Uložena v koloně
- 2) Dle charakteru mobilní fáze (MF)
 - Kapalina
 - Plyn
- 3) Dle povahy sil, které způsobují dělení mezi SF a MF
 - Adsorpční
 - Rozdělovací
 - Iontová výměna
 - Vylučovací
 - Afinitní
- 4) Dle požadovaného využití
 - Analytická
 - Preparativní

TLC: chromatografie na tenké vrstvě, hojně rozšířená metoda v analýze sekundárních metabolitů. Provádí se v plošném uspořádání, SF (nejčastěji silikagel) je v tenké vrstvě na inertním podkladu, kterým je kovová folie nebo sklo.



Chování látek separovaných pomocí TLC popisujeme pomocí tzv. retenčního faktoru (R_f).

Retenční faktor:

Bezrozměrná veličina, pro každou látku je za přesně daných podmínek konstantní

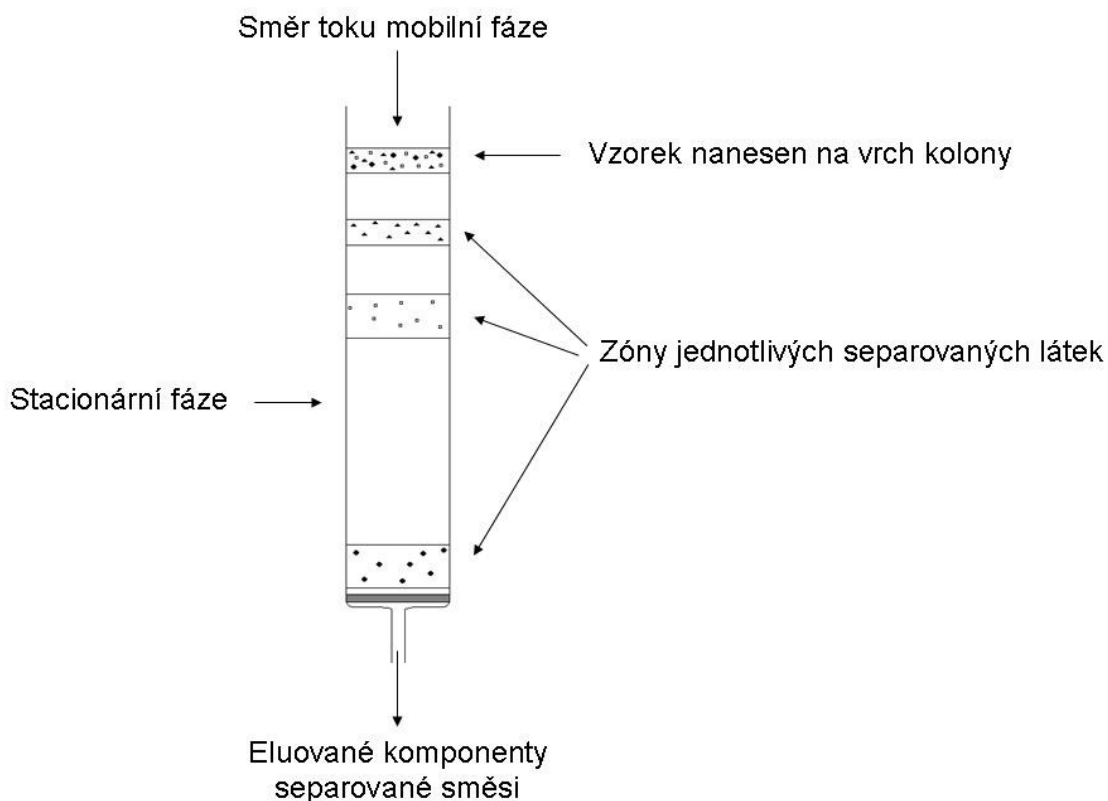
Výpočet:

Detekční metody pro TLC:

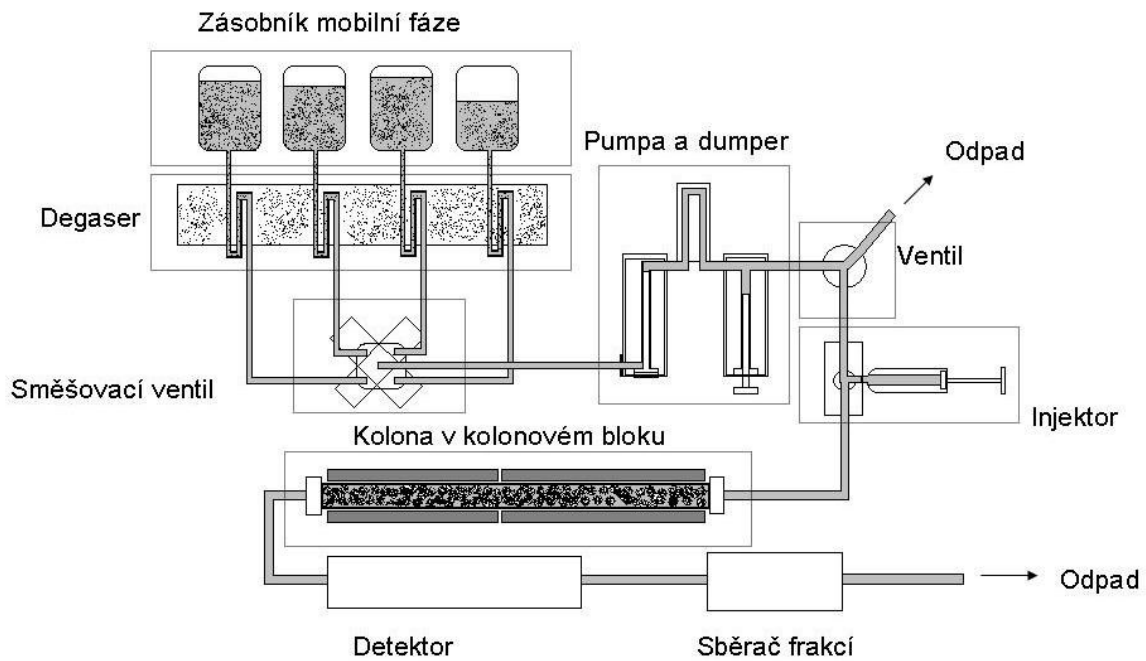
- Nedestruktivní
- Destruktivní
 - Nespecifické
 - Specifické

CC: typ chromatografie, kdy je SF uložena v skleněné koloně, kde probíhá dělení látek. K plnění kolony stacionární fází dochází přímo v laboratoři v čase potřeby. Látky opakovaně přechází mezi SF a MF a na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jsou různě dlouho

zadržovány stacionární fází. MF přechází přes SF nejčastěji pomocí gravitace, příp. mírným přetlakem nebo podtlakem.



HPLC: analytická metoda, při které dochází k dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (SF a MF), přičemž stacionární fáze s velmi malými částicemi o standardní velikosti homogenně vyplňuje kolonu (kolony pro HPLC jsou vyráběny komerčně a jsou kovové) a mobilní fáze protéká kolonou za zvýšeného tlaku. Zařízení pro HPLC jsou mnohem složitější než u klasické sloupcové chromatografie a jsou ovládána pomocí počítače.



2.1 Úloha č. 6: TLC extraktu ze *Species urologicae* – důkaz arbutinu

Video:

TLC arbutin

Detekce TLC

Zkoušený roztok: Extrakt *Species urologicae* připravený na předchozím cvičení

Porovnávací roztok: Methanolický roztok arbutinu (2 mg/10 ml)

Vyvíjecí směs: Ethylacetát: methanol: voda (100:17:13)

Detekční činidlo I: Diazotovaná kyselina sulfanilová (připravit v čase potřeby – k 5 ml kyseliny sulfanilové přidejte dusitan sodný do světle žlutého zabarvení roztoku)

Detekční činidlo II: Ethanolový roztok KOH

Postup:

Na TLC destičku se nanesou odděleně dvě skvrny zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjí se po dráze 10–12 cm (cca 1 cm pod horní okraj desky). Po vysušení fénem se postříká detekčním činidlem I a po 5 minutách činidlem II. Objeví se červené skvrny v místě, kde se nachází arbutin.

Spočítejte R_F standartu a skvrny ve vzorku.

Výpočet R_F standartu a skvrny v zkoušeném vzorku:

Závěr:

2.2 Úloha č. 7: TLC extraktu *Urtica dioica* – identifikace rostlinných barviv

Video:

TLC rostlinných barviv

Detekce TLC

Zkoušený roztok: Extrakt *Urtica dioica* připravený na minulém cvičení

Vyvíjecí směs: Ether: petrolether (1:1)

Pracovní postup:

Na vrstvu se nanese zkoušený roztok. Nanáška musí být natolik vysoká, aby byla dostatečně dobře patrná již po nanesení na start. TLC destička se vyvíjí po dráze 10–12 cm. Po vysušení při pokojové teplotě pozorujeme oddělené skvrny jednotlivých barviv.

$R_F = 1,0$	Karotenoidy	žlutá
$R_F = 0,48$	Feofytin	zelenohnědá
$R_F = 0,35$	Chlorofyl A	zelenomodrá
$R_F = 0,20$	Chlorofyl B	zelenožlutá
$R_F = 0,11-0$	Xanthofyly	světle zelená, žlutá

Spočítejte R_F hodnoty jednotlivých barviv na TLC destičce a zaznamenejte je do protokolu.

Výpočet R_F hodnot jednotlivých barviv:

Závěr:

2.3 Úloha č. 8: Preparativní TLC extraktu *Species urologicae* – izolace látek flavonoidní povahy

Video:

Robotické nanášení TLC

Chromatografické destičky lze využít jak pro analytické, tak pro preparativní účely. V případě analytického TLC zjišťujeme, zdali je analyzovaná látka totožná s referenčním standardem, případně v jakém množství je zastoupena v analyzované frakci. Cílem preparativní TLC je po vyvinutí destičky izolace látky ze směsi.

V této úloze budeme provádět preparativní TLC frakce získané pomocí sloupcové chromatografie methanolového podílu extraktu paulovnie, s cílem izolovat látky flavonoidní povahy, které budeme následně analyzovat pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Zkoušený roztok: 10 mg frakce ze sloupcové chromatografie rozpuštěné v 0,5 ml methanolu

Vyvíjecí směs: Chloroform: ethylacetát (9:1)

Postup: Na start chromatografické desky nanese pomocí pipety vzorek. Na rozdíl od analytického TLC budeme pro preparativní účely nanášet vzorek v pruzích po celé délce startu a následně na krátkou dobu vložíme do kádinky s methanolem pro „vyrovnání“ pruhu na startu. TLC destičku vysušíme a necháme vyvíjet v mobilní fázi po dráze 10 cm. Po vysušení při pokojové teplotě detekujeme chromatogram pod UV lampou a zaznačíme polohu pásů pomocí tužky. Následně pomocí kopistky seškrábneme jednotlivé pásy a získaný silikagel přeneseme do připravené eppendorfky s 0,5 ml methanolu. Po centrifugaci přeneseme získaný supernatant do skleněného insertu ve vialce a vzorek dále analyzujeme pomocí HPLC.

Závěr:

2.4 Úloha č. 9: Sloupcová chromatografie (CC), izolace karotenoidních barviv z *Urticae folium*

Video:

Příprava sloupce pro chromatografii

Sloupcová chromatografie

Extrakt z kopřivových listů obsahuje chlorofyl, který je směsí dvou látek: modrozeleného chlorofylu A a světlezeleného chlorofylu B. Kromě toho obsahuje žlutá barviva xanthofyly a karoteny. Jednotlivá barviva lze od sebe úspěšně oddělit metodou sloupcové chromatografie na silikagelu.

Cílem tohoto cvičení je izolace žlutých karotenoidních barviv pomocí sloupcové chromatografie. Získaná barviva budou použita na dalším cvičení pro stanovení obsahu pomocí spektrofotometrických metod.

Zkoušený vzorek: Extrakt *Urticae folium* připravený na předchozím cvičení

Stacionární fáze: silikagel

Mobilní fáze: Ether : petrolether (1:1)

Pracovní postup:

Příprava kolony:

Zúžený konec těsně nad kohoutem ucpěte kouskem vaty, kohout kolony uzavřete, do kolony nalijte přibližně 10 ml mobilní fáze a přesvědčte se, že kohout neprotéká a vata nevyplave. Pomocí dlouhé skleněné tyčinky opatrně vytlačte z vaty všechen vzduch. Do kádinky na 100 ml nasypete přibližně 30 ml silikagelu a přilévejte (za současného míchání suspenze skleněnou tyčinkou) přibližně 60 ml mobilní fáze tak, aby hmota nebyla příliš tuhá a mohla téci do kolony. Jakmile se už ze silikagelu neuvolňují vzduchové bubliny (není slyšet syčení), nalijte suspenzi po částech nálevkou do kolony, otevřete kohout a nechte silikagel usadit. Jakmile povrch stacionární fáze dále neklesá a hladina mobilní fáze dosáhla 1 cm nad úroveň stacionární fáze, kohout uzavřete. Na povrch silikagelu nyní opatrně spusťte připravené kolečko filtračního papíru s rozměry přesně stejnými, jaký je průměr kolony.

Příprava vzorku:

Vzorek byl získán na předchozím cvičení extrakcí kopřivových listů acetonem v Soxhletově extraktoru po dobu 4 hodin. Po extrakci byl vysušen bezvodým síranem sodným, zfiltrován a následně odpařen na objem cca 10 ml.

Nanášení vzorku:

Otevřete kohout kolony a nechte mobilní fázi dosáhnout těsně k povrchu silikagelu, kohout uzavřete. Do pipety naberte pomocí balonku 0,2 ml vzorku a opatrně naneste do středu filtračního papíru na začátku kolony tak, aby se povrch silikagelu neporušil a nechte vsáknout.

Opatrně převrstvěte 1 ml mobilní fáze a opět nechte vsáknout, zopakujte totéž ještě minimálně jednou do té doby, než se mobilní fáze přestane barvit. Při této činnosti je důležité, aby byl kohout střídavě otevřen a uzavřen, aby nedošlo k vyschnutí povrchu silikagelu. Opatrně doplňte kolonu mobilní fází. Otevřete kohout a nastavte rychlost jeho průtoku na přibližně 40 kapek/min.

Izolace karotenoidních barviv:

Mobilní fázi jímáme do zkumavek či vialek po frakcích o objemu 10 ml. Vzhledem k tomu, že karotenoidní barviva jdou v tomto případě s čelem rozpouštědla, můžeme si dovolit jímat několik prvních frakcí dohromady do kádinky a použít je znova jako mobilní fázi. Jakmile se dostane žlutá zóna karotenoidních barviv 3 cm nad zúženou část kolony, začneme jímat do připravené lahvičky frakci karotenoidů.

Na koloně můžeme pozorovat několik barevných zón

$R_f = 1,0$	Karotenoidy	Žlutá
$R_f = 0,48$	Feofytin	Zelenohnědá
$R_f = 0,35$	Chlorofyl A	Zelenomodrá
$R_f = 0,20$	Chlorofyl B	Zelenožlutá
$R_f = 0,11-0$	Xantofyly	Světle zelená, žlutá

Nákres aparatury:

Závěr:

2.5 Úloha č. 10: HPLC analýza extraktu *Species urologicae*

Video:

Instrument: HPLC systém Agilent 1100 series s DAD detektorem

Zkoušený vzorek: extrakt získané extrakcí *Species urologicae* na předcházejícím cvičení

Mobilní fáze: methanol (MeOH), 0,2% HCOOH, acetonitril (ACN); gradientová eluce

Stacionární fáze: kolona Ascentis® Express RP-amide 100 × 2,1 mm, velikost částic 2,7 μm

Teplota: 40 °C

Tlak: do 400 bar

Průtok: 0,3 ml/min

Nástřik: 1 μl

Průběh metody:	0. minuta	10 % ACN, 90 % 0,2% HCOOH
	36. minuta	100 % ACN
	36.– 40. minuta	100 % ACN

Detekce: DAD, pozorujeme při vlnových délkách 254 nm, 280 nm

Pracovní postup: Testované roztoky (každý o přibližné koncentraci 1 mg/ml) připravíme rozpuštěním požadovaného množství suchého extraktu v 10 ml methanolu. Následně z každého připraveného roztoku odebereme 1 ml, který vložíme pomocí automatické pipety do označené vialky, kterou umístíme na požadované místo do stojanu v HPLC systému. Pomocí řídicí PC jednotky spustíme dle instrukcí vyučujícího jednotlivé části HPLC systému a vyplníme požadované parametry měření (název sekvence, pořadí a popis vialek, metoda). Jakmile jsou všechny části systému i analyzovaná sekvence připraveny, spustíme měření.

Nákres HPLC aparatury:

Základní HPLC charakteristiky:

Závěr:

3 Identifikace obsahových látek rostlin – spektroskopické metody (UV, IČ, NMR, CD)

Určení struktury přírodní látky je úkolem nesmírně obtížným a jeho splnění vyžaduje znalosti z oblasti chemie, fyziky, studium literatury, ale také práci s různými typy přístrojů a spekter z nich získaných.

Nejběžněji používanými technikami pro určení struktury přírodních látek jsou techniky spektroskopické a jejich vzájemná kombinace, neboť každá z těchto metod slouží pro určení jiné charakteristiky ve struktuře přírodních látek.

UV/VIS spektrofotometrie:

Metoda založená na absorpci záření v oblasti vlnových délek ultrafialového (200–400 nm) nebo viditelného (400–800 nm) světla a následném přechodu valenčních elektronů na vyšší energetické hladiny. Patří mezi základní metody ve fytochemické analýze, je jednoduchá a levná. Nejčastěji je metoda využívána ve spojení s HPLC nebo kapilární elektroforézou.

Infračervená spektrofotometrie (IČ):

Metoda založená na absorpci infračerveného záření testovanou látkou. Pro strukturní analýzu přírodních látek je používána střední oblast infračerveného spektra (30–2,5 μm), která odpovídá vlnočtu 4000–600 cm^{-1} . Pro určení struktury analyzované látky má největší význam oblast charakteristických silných vibrací (4000–1300 cm^{-1}) s intenzivními absorpčními pásy, které je možno přiřadit různým funkčním skupinám. Oblast otisku prstu (1300–600 cm^{-1}) je zajímavá pro porovnání látek s knihovnami spekter, případně látek mezi sebou.

Nukleární magnetická rezonance (NMR):

Základem nukleární magnetické rezonance je interakce radiofrekvenčního pole s jádry atomů umístěnými ve statickém magnetickém poli. Obvyklé je rozpuštění vzorku v deuterovaném rozpouštědle, podle povahy vzorku CDCl_3 , MeOD nebo d_6 -DMSO. Rozpouštědla obsahující vodík by při analýze NMR rušila měření. Používají se speciální kyvety z křemenného skla (trubice o průměru 2–5 mm, objem vzorku přibližně 0,7 ml). Jednodimenzionální ^1H NMR poskytuje rychlé informace o struktuře a čistotě analyzované látky, informuje o povaze protonů a jejich bezprostředním okolí. Pro kompletní identifikaci látky se potom využívá dvoudimenzionálních spekter poskytujících např. informace o vazbách H-H nebo C-H.

Cirkulární dichroismus (CD):

Metoda používaná k zjištění relativní konfigurace chirálních molekul. Lze ji použít u molekul, jejichž chirální centra se nacházejí v chromoforu dané molekuly, tj. v části molekuly zodpovědné za absorpci záření v UV oblasti. Taková opticky aktivní látka rozdílně absorbuje

levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované záření a deformuje jej do elipsy. Z charakteristik této deformace lze výpočtem odvodit tzv. Cottonův efekt, nabývající pozitivních nebo negativních hodnot v závislosti na vlnové délce. Porovnáním těchto hodnot s literaturou potom odvodíme relativní konfiguraci chirálních center.

3.1 Úloha č. 11: Spektrofotometrické stanovení karotenoidních barviv v extraktu *Urticae folium*

Z extraktu *Urticae folium* byly izolována pomocí sloupcové chromatografie karotenoidní barviva (směs α -karotenu a β -karotenu). Jejich obsah ve vzorku je možné stanovit spektrofotometricky v oblasti viditelného světla (VIS).

Dle Lambert-Beerova zákona ($A = \epsilon \times b \times c$) je absorpce roztoku přímo úměrná koncentraci karotenoidů.

Cílem této úlohy je stanovení obsahu karotenoidů pomocí metody UV/VIS spektrofotometrie.

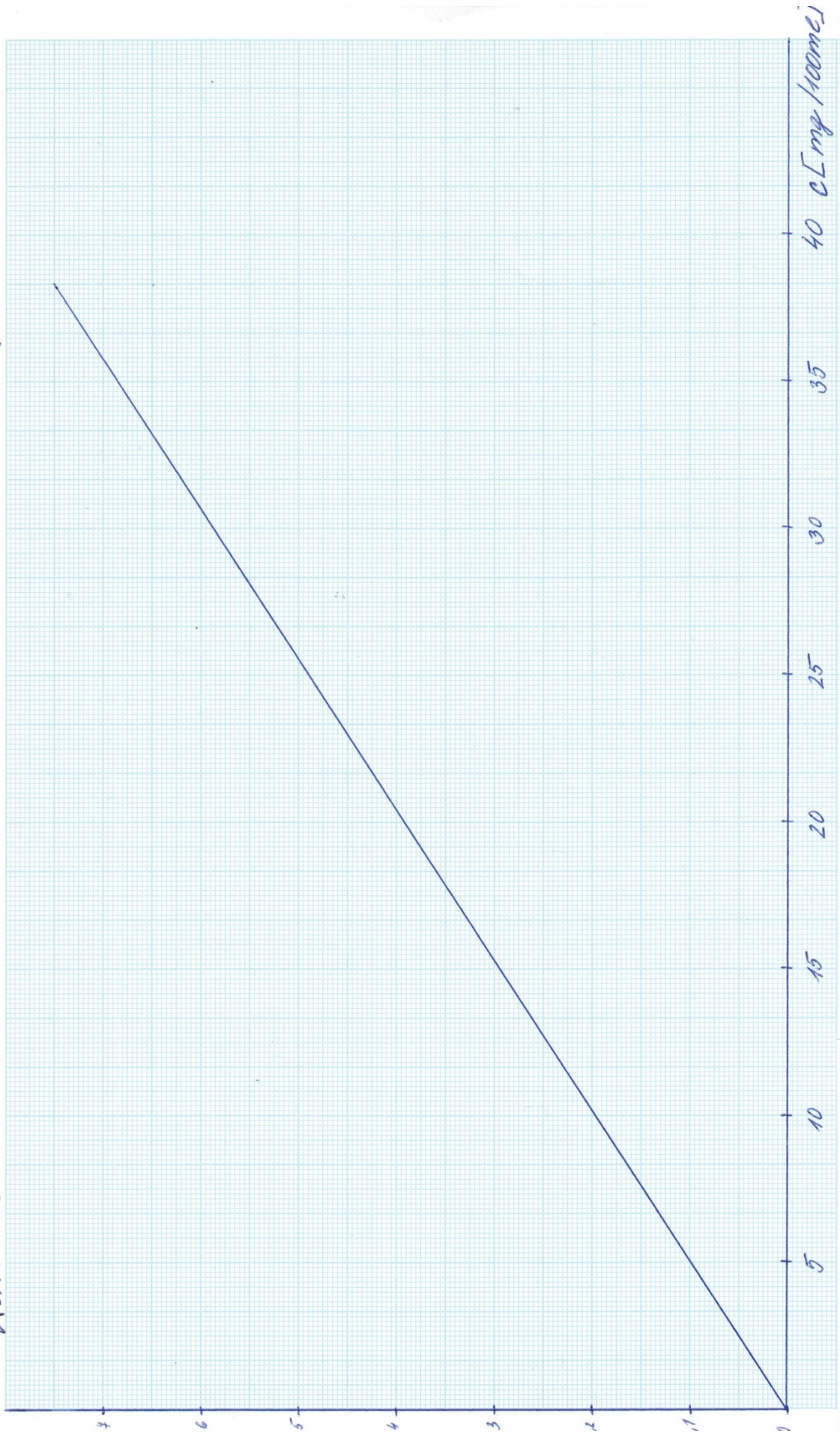
Pracovní postup:

Vzorek získaný na předchozím cvičení ze sloupcové chromatografie kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplníme po rysku směsí petrolether: ether (1:1). Roztok přelijeme do kyvety a měříme jeho absorbanci při vlnové délce $\lambda=460$ nm oproti slepému vzorku (čisté rozpouštědlo). Obsah karotenoidů (v mg/100 ml) odečteme z kalibrační křivky a přepočítáme dle vzorce na obsah karotenoidů v droze. Výsledek vyjádříme v procentech (%).

Výpočet:

Závěr:

Zavislost absorbance na koncentraci karotenoidu pri 460 nm



3.2 Úloha č. 12: IČ analýza neznámé látky izolované z extraktu plodů *Species uroogicae*

Metodu spektrofotometrie v IČ oblasti můžeme využít pro orientační určení přítomnosti charakteristických funkčních skupin v neznámém vzorku, porovnáním s knihovnou spekter nebo se standardem je možné neznámou látku identifikovat.

Cílem této úlohy je určení charakteristických funkčních skupin a návrh struktury neznámé čisté látky, jejíž přítomnost a čistotu jsme zjistili HPLC analýzou flavonoidní frakce *P. tomentosa*.

Instrument: Nicolet Impact

Zkoušený vzorek: Neznámá čistá látka izolovaná z extraktu plodů *P. tomentosa*

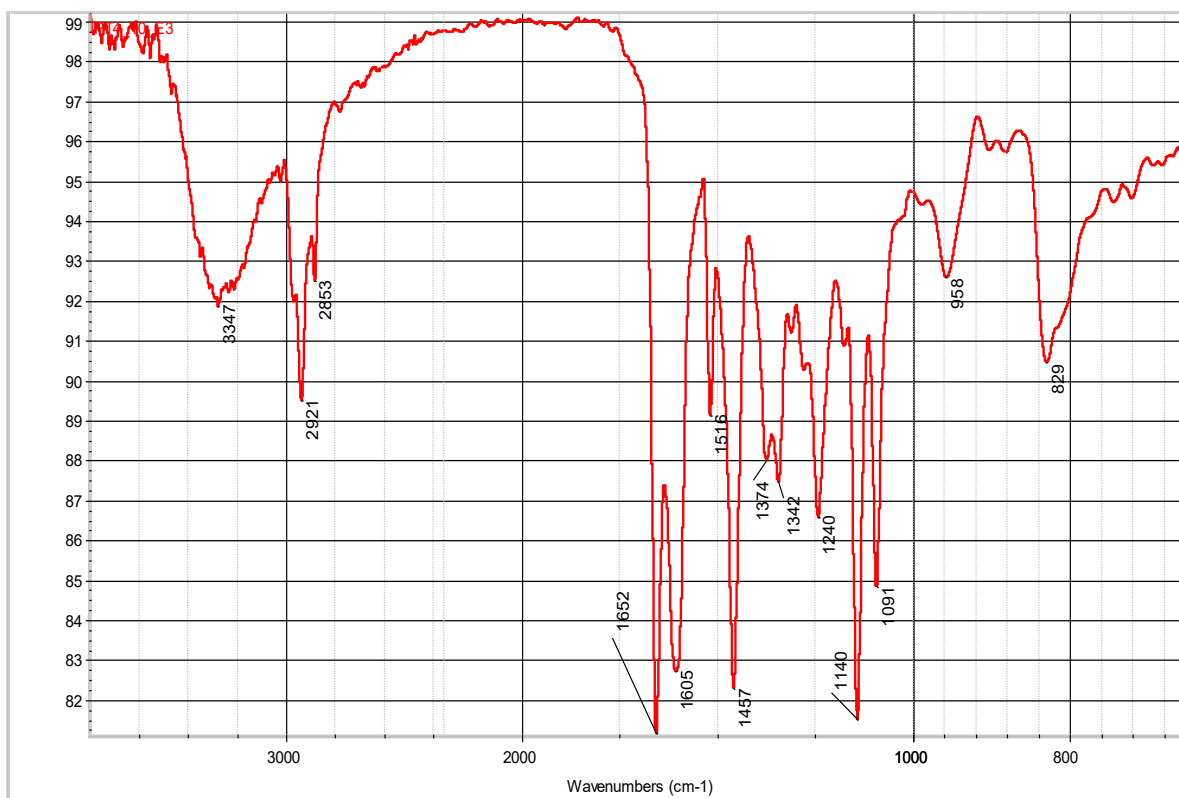
Metoda: ATR jednoodrazový

Korekce: CO₂ a H₂O

Pracovní postup:

Před samotnou analýzou vzorku změříme pozadí (Collect background). Poté cca 1 mg měřeného vzorku mechanicky přitlačíme na krystal, který je součástí přístroje, a spustíme měření (Collect sample). Následně vyhodnocujeme získané IČ spektrum (závislost absorbance nebo transmitance na vlnočtu) a určujeme přítomnost charakteristických funkčních skupin.

Popis získaného IČ spektra:



Závěr:

3.3 Úloha č. 13: Identifikace neznámé látky izolované z extraktu *Species urologicae* – NMR spektroskopie

Protonové spektrum ^1H NMR poskytuje rychlé informace o struktuře a čistotě analyzované látky, informuje o povaze protonů a jejich bezprostředním okolí.

Naměřená UV a IČ spektra naznačila, že se bude jednat pravděpodobně o flavonoid. Vzhledem k tomu, že retenční čas na HPLC chromatogramu vypovídá o lipofilní povaze látky, můžeme očekávat substituci prenylem nebo geranylem (C_5 nebo C_{10} řetězcem), což je pro flavonoidy z paulovnie typické.

U této látky byla zjištěna i hmotnost pomocí hmotnostní spektrometrie, a to 438. Takto vysoká hmotnost odpovídá pravděpodobně geranylovanému flavonoidu.

Cílem této úlohy je pokusit se na základě naměřeného NMR spektra doplnit strukturu látky a přiřadit signály z protonového spektra jednotlivým vodíkům v molekule.

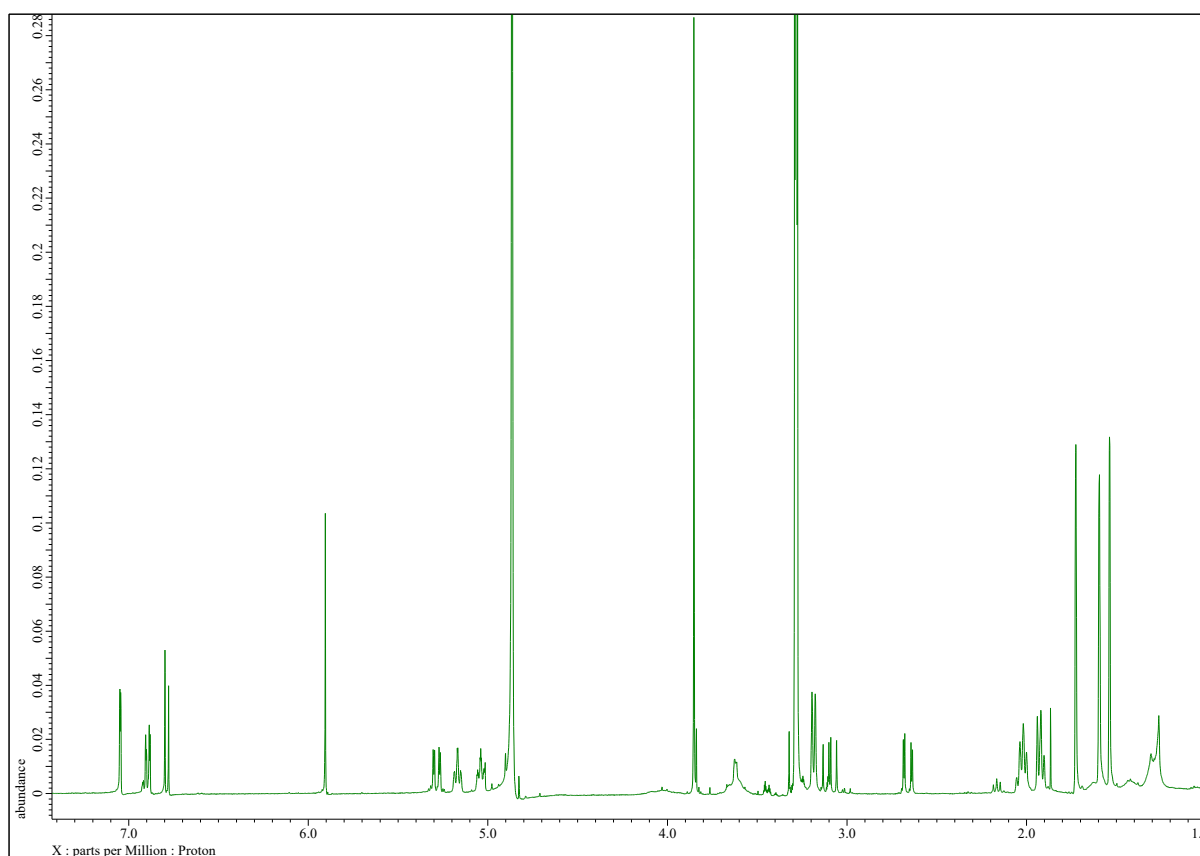
Instrument: NMR spektrometr Jeol ECZR 400 MHz

Zkoušený vzorek: Neznámý flavonoid izolovaný z extraktu plodů *P. tomentosa*

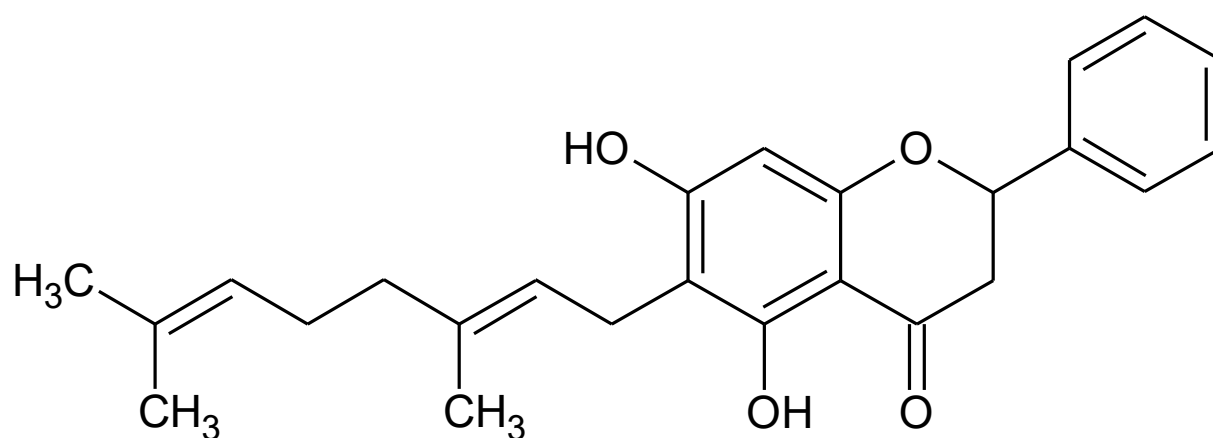
Rozpouštědlo: deuterovaný methanol (MeOD)

Experiment: PROTON

Popis získaného NMR spektra:



7.05 (1H, d, 2.0), 6.89 (1H, dd, 2.0, 8.0), 6.79 (1H, d, 8.0), 5.91 (1H, s), 5.29 (1H, dd, 3.0, 13.0), 5.17 (1H, t, 7.2), 5.04 (1H, t, 7.0), 3.85 (3H, s), 3.19 (2H, d, 7.2), 3.10 (1H, dd, 13.0, 17.0), 2.66 (1H, dd, 3.0, 17.0), 2.02 (2H, q, 7.0), 1.92 (2H, t, 7.0), 1.72 (3H, s), 1.59 (3H, s), 1.54 (3H, s)



Závěr:

3.4 Úloha č. 14: Určení relativní konfigurace látek – cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) patří mezi optické polarimetrické metody a používá se pro určení relativní konfigurace molekul.

Identifikovaný flavonoid, 3'-*O*-methyl diplakon, má jedno chirální centrum na uhlíku C-2. Z literatury (SLADE, D., et al. Circular Dichroism, a Powerful Tool for the Assessment of Absolute Configuration of Flavonoids. *Phytochemistry*. 2005, **66** (18), 2177-2215) víme, že flavanony s 2*S* konfigurací vykazují pozitivní Cottonův efekt při 320–330 nm a negativní Cottonův efekt při 270–290 nm, zatímco flavanony s 2*R* konfigurací vykazují negativní Cottonův efekt při 320–330 nm a pozitivní Cottonův efekt při 270–290 nm.

Vzorek o koncentraci 0,05 mM vložte v kyvetě do polarimetru. Z naměřeného spektra odvoďte, o jaký enantiomer se jedná.

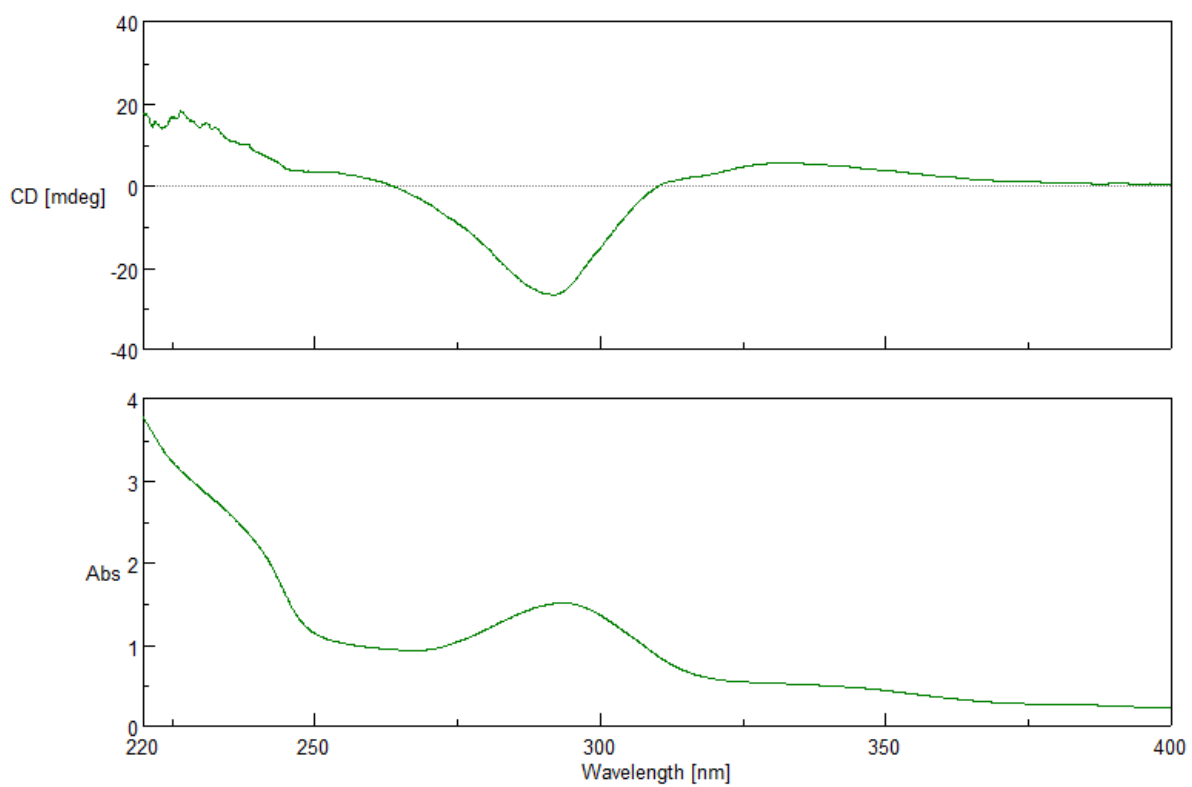
Instrument: Polarimetr Jasco J-815

Zkoušený vzorek: 3'-*O*-methyl diplakon izolovaný z extraktu plodů *P. tomentosa*

Rozpouštědlo: methanol

Vlnová délka: 400–220 nm

Popis získaného CD spektra:



Závěr: