



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

ZADANIE 1C

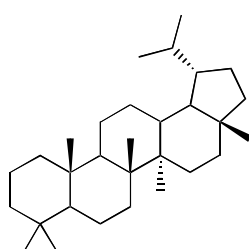
BETULINA



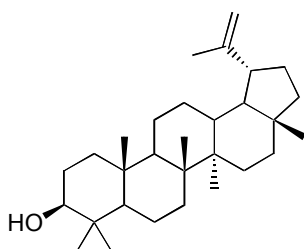
Celem ćwiczenia jest wyizolowanie z kory brzozy brodawkowatej (*Betula pendula*) triterpenoidu zwanego betulina. Związek ten wywodzi się od węglowodoru zwanego lupanem i razem z innymi jego pochodnymi (np. lupeolem) wchodzi w skład zewnętrznej (białej) warstwy kory brzozy. Zawartość betuliny w tej warstwie kory jest znacząco duża i może dochodzić do 30%. Struktura terpenoidów zawierających szkielet lupanu bardzo przypomina grupę związków zwaną steroidami, które występują powszechnie w komórkach roślin, zwierząt i grzybów, pełniąc bardzo różnicowane funkcje biologiczne. Rola jaką pełni betulina w korze brzozy nie jest jednak znana. Brzoza jest cenionym drzewem nie tylko ze względów estetycznych. Stosowanie brzozy w medycynie ludowej ma bardzo długą tradycję (np. w chorobach skóry oraz dróg moczowych). Jako surowiec leczniczy wykorzystuje się korę, liście oraz sok. Betulina jest stosowana w leczeniu trądziku a badania kliniczne wskazują, że związek ten oraz inne pochodne lupanu (np. lupeol, kwas betulinowy) wykazują u ludzi znaczną aktywność przeciwnowotworową wobec różnych typów nowotworów.



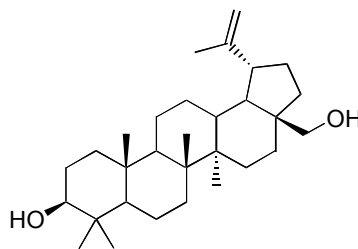
Brzoza brodawkowata



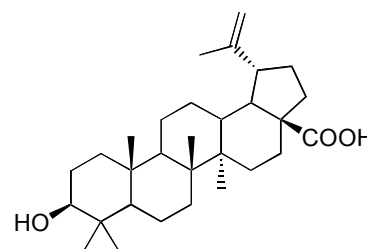
lupan



lupeol



betulina



kwas betulinowy

Rys. 1 Lupan i wywodzące się od niego terpenoidy zawarte w korze brzozy brodawkowatej



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Odczynniki:

wysuszona kora brzozy białej ^S	10 g
chloroform ^D	ok. 200 cm ³
etanol ^S	do krystalizacji
odczynnik cerowo-molibdenowy ^S	do TLC
chloroform i aceton ^D	do chromatografii kolumnowej

^S - dostępne w szafie; ^D - dostępne pod dygestorium

⚡ możliwość przerwania

Suchą korę brzozy należy pociąć na bardzo małe kawałki i umieścić jej dokładnie odważoną ilość w komorze aparatu Soxhleta (o poj. 100 cm³, można nie używać gilzy - zabezpieczyć jedynie odpływ syfonu). Aparat Soxhleta wraz z chłodnicą zamocować w szyjce kolby o poj. 250 cm³, zawierającej ok. 150 cm³ chloroformu. Ekstrakcję należy prowadzić przez 1 godzinę.⚡ W czasie trwania ekstrakcji należy przygotować zestaw do przeprowadzenia tzw. chromatografii flash. Sposób jej wykonania należy skonsultować z prowadzącym zajęcia. Proponowany sposób przygotowania zestawu jest następujący: W szyjce kolby stożkowej z tubusem bocznym (o pojemności większej niż objętość ekstraktu) umieścić wąski, cylindryczny lejek ze spiekem szklanym (lejek Shotta). Lejek wypełnić żelem krzemionkowym (ok. 15 g żelu) a na wierzch położyć krążek bibuły filtracyjnej.

Po zakończeniu ekstrakcji jeszcze ciepły roztwór chloroformowy przesączyć grawitacyjnie przez przygotowany żel krzemionkowy. Jeśli obserwuje się wytrącanie kryształów z ekstraktu, należy ogrzewać sączony roztwór na płaszczy grzejnym. Następnie przemyć żel niewielką ilością czystego, ciepłego chloroformu. Po przemyciu, podciśnieniowo usunąć rozpuszczalnik z żelu.⚡ Otrzymany roztwór przenieść do uprzednio zważonej kolby kulistej i odparować całkowicie na wyparce rotacyjnej.¹

UWAGA: Odbieralnik wyparki musi być czysty i suchy! Oddestylowany rozpuszczalnik należy umieścić w pojemniku podpisanym "Zlewki chloroformu"! W przypadku braku pojemnika należy poinformować prowadzącego. Nie wylewać do odpadów!

Zważyć kolbę ponownie, w celu określenia ilości uzyskanego surowego produktu.⚡ Następnie poddać produkt krystalizacji z etanolu. Ilość etanolu do krystalizacji należy dobrać tak, by pierwsze kryształy pojawiły się po dość długim czasie (po co najmniej kilku minutach). Wydzielony produkt odsączyć na lejku Hirsha, wysuszyć i zważyć.²



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Uzyskany produkt jest mieszaniną kilku substancji z przewagą betuliny. W dalszej części doświadczenia należy dokonać próby rozdziału tych substancji metodą chromatografii kolumnowej. Przed przystąpieniem do wykonania chromatografii kolumnowej należy wykonać chromatogram dla uzyskanego preparatu metodą TLC i skonsultować z prowadzącym ćwiczenie decyzję o podjęciu (lub nie) próby jego rozdziału tą metodą.

Chromatografia TLC

Chromatogram wykonać na płytce pokrytej żelalem krzemionkowym. Jako eluentu użyć mieszaniny chloroform-aceton 10:1. Chromatogram wywołać za pomocą odczynnika cerowo-molibdenowego (*należy skonsultować z prowadzącym ćwiczenie sposób wykonania tej czynności*).

Chromatografia kolumnowa

Przed wykonaniem chromatografii kolumnowej należy skonsultować z prowadzącym ćwiczenie rozmiar kolumny i ilość próbek, która będzie poddawana rozdzielaniu. Wszelkie dalsze czynności (przygotowanie kolumny, nanoszenie próbek, zbieranie frakcji, wycinanie płytek do TLC w celu monitorowania zawartości eluatu) należy wykonywać pod nadzorem prowadzącego ćwiczenie i konsultować w razie jakichkolwiek wątpliwości.

Przygotować kolumnę ($\text{SiO}_2/\text{CHCl}_3$). Próbkę rozpuścić w chloroformie. Jako eluentu użyć mieszaniny chloroform-aceton 20:1. Zawartość eluatu monitorować za pomocą TLC, korzystając z odczynnika cerowo-molibdenowego do wizualizacji chromatogramu. Przy wymywaniu ostatniej z widocznych na chromatogramie substancji zwiększyć polarność eluentu (chloroform-aceton 10:1).³

Dokonać pomiaru skręcalności optycznej i temperatury topnienia dla wyizolowanych produktów, wykonać widma IR.

Zadania:

1. Wizualizacja chromatogramów TLC substancji organicznych bardzo często wykonywana jest z zastosowaniem światła ultrafioletowego. W tym doświadczeniu nie jest to możliwe, stąd użycie odczynnika cerowo-molibdenowego. Wyjaśnij dlaczego.
2. Podaj przykłady terpenów innych niż wymienione w tej instrukcji i wstępie teoretycznym, należących do grupy mono-, seskwi-, tri- i tetraterpenów oraz źródła naturalne ich występowania. Wyjaśnij terminologię terpenów zawartą w tym pytaniu.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

3. Dokonaj pełnej interpretacji widm IR i NMR zarejestrowanych dla wyodrębnionych produktów. Co można powiedzieć na ich podstawie o czystości tych związków?
4. Aparat Soxhleta stosowany jest nie tylko w preparatyce, ale również w analizie chemicznej. Opisz krótko jedno z możliwych analitycznych zastosowań tego ekstraktora.

UWAGI I ZAGOSPODAROWANIE ODPADÓW

- ¹ Chloroform po ekstrakcji należy zebrać do czystego odbieralnika wyparki i umieścić w pojemniku oznakowanym "Zlewki chloroformu"! Korę należy wysuszyć i wyrzucić do kosza. W przypadku stosowania gilzy należy ją wysuszyć i zwrócić do przygotowalni
- ² Roztwór po odsączeniu umieścić w pojemniku na odpady O
- ³ Zużyty eluent umieścić w pojemniku na odpady F