

Blok I

Základní vlastnosti látek (hydrofilnost-hydrofóbnost, polarita, rozpustnost)



Praktické cvičení z lékařské biochemie

Adriana Rybníkářová

2025/2026

Poděkování

Chtěla bych poděkovat kolegům: MUDr. Martinovi Leníčkoví Ph.D., MUDr. Martinovi Vejražkovi Ph.D. a Lence Fialové CSc. za tvorbu některých praktických úloh a textů.



Teorie

Vývoj léku z rostlin

Jak modifikovat léčivo, aby prošlo do CNS? Jak zjistit, jak efektivně extrahovat léky z rostlin? Jak předpokládat, do kterých tkání lék prochází nebo jak podpořit jeho vyloučení z těla? Těmito otázkami se budeme zabývat v tomto praktiku.

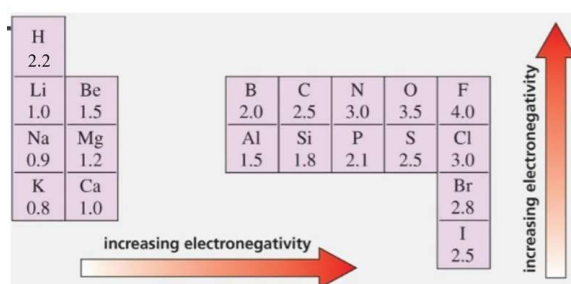
První část teorie se věnuje tomu, jak předpokládat vlastnosti látek. Další část se věnuje technikám jak získat léky z rostlin. Poslední část se věnuje toxikologii léků, jak se vstřebávají, metabolizují a vylučují

Poslední dvě části jsou pouze informační – uvedeny pouze pro zajímavost (kromě TLC). Nejdůležitější je pochopení základních principů z prvních částí a pochopení TLC.

I. Jak předpokládat chemické vlastnosti molekul

Polarita chemické vazby

Představme si dva atomy, spojené vazbou. Elektrony vazby nejsou vždy rozděleny spravedlivě, ale jsou přitaženy k atomu s vyšší elektronegativitou. Elektronegativita je schopnost prvku přitahovat elektrony (**Viz tabulka dole**). Čím vyšší je rozdíl elektronegativit atomů, tím větší je posun elektronů.



Obr. 1. Tabulka elektronegativit prvků. Elektronegativita je uvedena pod prvkem.

Podle rozdílu elektronegativit rozlišujeme:

- Iontovou vazbu: rozdíl elektronegativit je nad 1,7
- Kovalentní - Polární vazbu: rozdíl elektronegativit mezi 0,4-1,7
- Kovalentní - Nepocházející vazbu: rozdíl elektronegativit je pod 0,4

Čím vyšší rozdíl, tím vyšší parciálně záporný náboj vzniká na jednom atomu a parciálně kladný na druhém atomu.

Úkol 1: Rozhodněte, jaké vazby jsou v molekule: oxidu uhličitého, kyslíku, chloridu sodného, metanu a močoviny.

Úkol 2: Najděte polární vazby v sloučenině E133.

Tvar molekuly

U jednoduchých sloučenin bez d orbitalů můžeme jednoduše odhadnout tvar molekul. Všechny volné elektronové páry a sigma vazby se uspořádají tak, aby byli co nejdál od sebe. Když součet je volných elektronových párů a sigma vazeb 2, záporné oblaky jsou na přímce a úhel je 180° . Když je součet 3, záporné oblaky směřují do vrcholu rovnostranného trojúhelníku a úhel je 120° . Když je součet 4, záporné oblaky směřují do vrcholu tetraedru a úhel je $109,5^\circ$. Odpuzování mezi volnými el. páry je větší, proto bývá úhel u nesymetrických sloučenin ve výsledku mírně deformován.

Dipól

Molekula má dipól, když centrum kladného a záporného náboje není na stejném místě.

Úkol 3: Má molekula vody a molekula oxidu uhličitého dipól?

Úkol 4: Proč je voda polární rozpouštědlo? Proč je voda dipól? Proč je chloroform nepolární rozpouštědlo?

Náboj molekuly

Náboj molekuly extrémně zvyšuje rozpustnost ve vodě. Soli, ve kterých je vazba hodně polarizovaná tvoří často ionty, které se lehce rozpouští ve vodě. Neutrální látky, které odštěpí proton (kyseliny) následně tvoří anionty. Naopak neutrální látky, které přijmou proton (báze) následně tvoří kationty. Nabitě části jsou dobře rozpustné ve vodě, protože interagují s dipólem vody. Kolik nabitých částic kyselina může vytvořit lze odhadnout z pKa. Čím silnější kyselina, tím více aniontů tvoří přímo ve vodě.

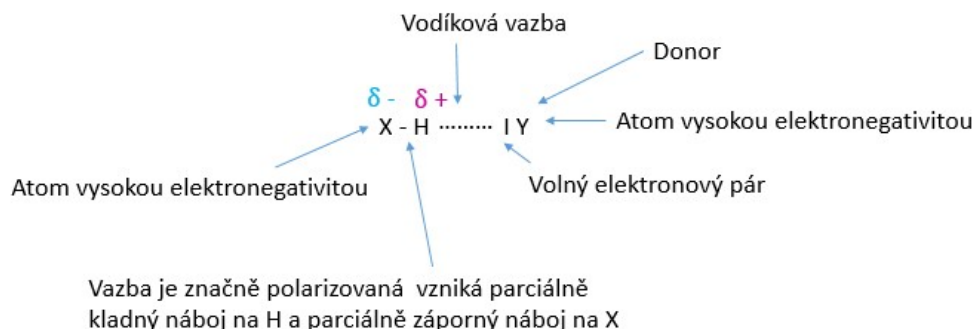
Mezimolekulové interakce

Mezimolekulové interakce jsou zodpovědné za trojrozměrnou strukturu biologických polymerů, jako jsou bílkoviny a DNA a RNA.(1) Podílejí se např. na vyskládání vazebního i katalytického místa enzymu pro substrát, na vytváření receptorů i 3D struktury protilátek.(1) Přenos signálu pomocí hormonů a neurotransmiterů, exprese genu, rychlost enzymatických pochodů je sprostředkován mezimolekulovými interakcemi (1). Zatímco kovalentní vazby mají energii ve stovkách $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ mezimolekulové interakce jsou v desítkách nebo jednotkách $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ nebo i méně (1). Ač individuálně slabé, mohou se libovolně kombinovat a tím pádem zesilovat (1). Výhodou těchto interakcí je, že jsou slabší oproti kovalentním vazbám, a proto jsou často vratné (1). Ligandy se tak mohou nejen vázat na receptor, ale i uvolnit, to samé platí pro enzym a substrát. Produkt, ačkoli podobný substrátu se může uvolnit z enzymu. Tyto interakce působí i mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou.

Mezimolekulové interakce můžeme rozdělit na(1):

- **Elektrostatické interakce:** Mezi kladným a záporným nábojem. Například mezi nabitým postranním řetězcem lysinu a aspartátu $-\text{NH}_3^+$ $-\text{OOC}^-$.
- **Vodíkový můstek:** Vodíková vazba je vazba mezi H a Y. Y je vysoce elektronegativní prvek, který do interakce dá volný elektronový pár. H má volný orbital a je akceptorem elektronu. Podmínkou

je, že na vodík musí být navázaný atom s vysokou elektronegativitou. Ten k sobě přitáhne oba elektrony vazby a na vodíku vzniká parciálně kladný náboj.

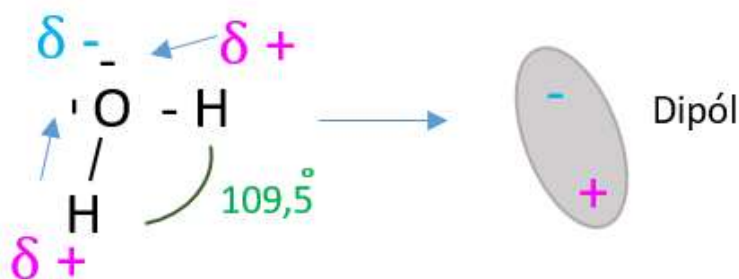


Obr. 2

- **Van der Waalsovy interakce (1):**
 - Interakce mezi permanentními dipóly. Například: $=\text{C}^{\delta+}=\text{O}^{\delta-} \cdots \cdots =\text{C}^{\delta+}=\text{O}^{\delta-}$.
 - Interakce mezi permanentním a indukovaným dipólem. $=\text{C}^{\delta+}=\text{O}^{\delta-} \cdots \cdots \text{H}_3\text{C}^{\delta+}-\text{C}^{\delta-}$.
 - Londonovy disperzní interakce. Jedná se o interakci mezi 2 okamžitými dipóly.
 - Patrové interakce jsou mezi π a π systémy nad a pod aromatickými kruhy, např. DNA.
- **Hydrofóbní interakce (1):** Nejčastěji ji vidíme u řetězce uhlovodíku. Síla hydrofobních interakcí roste s počtem uhlíků. Síla hydrofobních interakcí roste u nerozvětvených řetězců, protože někdy rozvětvené uhlovodíkové řetězce mohou překážet interakci a zabránit lehkému naskládání řetězců. Vysvětlení mechanismu interakcí je předmětem zkoumání. Část teorie vysvětluje spojení kapiček oleje ve vodě díky růstu entropie rozpouštědla - vody.

Rozpustnost

Voda jako rozpouštědlo



Obr. 3 Voda je hydrofilní rozpouštědlo. Vazba mezi atomy vodíku a kyslíku je výrazně polární, rozdíl elektronegativit je 3,5-2,2=1,3, proto se na kyslíku tvoří výrazný parciální záporný náboj a na vodíku parciální kladný náboj. Tvar molekuly je lomený, protože 2 σ a 2 volné elektronové páry jsou co nejdál od sebe a tvoří vazebný úhel o něco menší

než 109,5°. Centrum kladného náboje je mezi vodíky a centrum záporného náboje při kyslíku. Voda je tedy dipól. δ

Chloroform CHCl_3 jako rozpouštědlo

V chloroformu je C-H vazba nepolární a C-Cl na hraně mezi polární a nepolární vazbou. Vazebný úhel je také 109,5°. Malé rozdíly elektronegativit mezi prvky nevytvoří dostatečný parciální náboj. Rozpouštědlo je nepolární.

Hydrofilní látky

Mezimolekulovými interakcemi interagují s vodou.

- Mají často náboj, tím dobře interagují s dipólem vody. (interakce náboj-dipól).
- Mají polární vazby, které se obalují vodou. (interakce dipól- dipól).
- Tvoří s vodou vodíkové můstky.

Hydrofobní látky

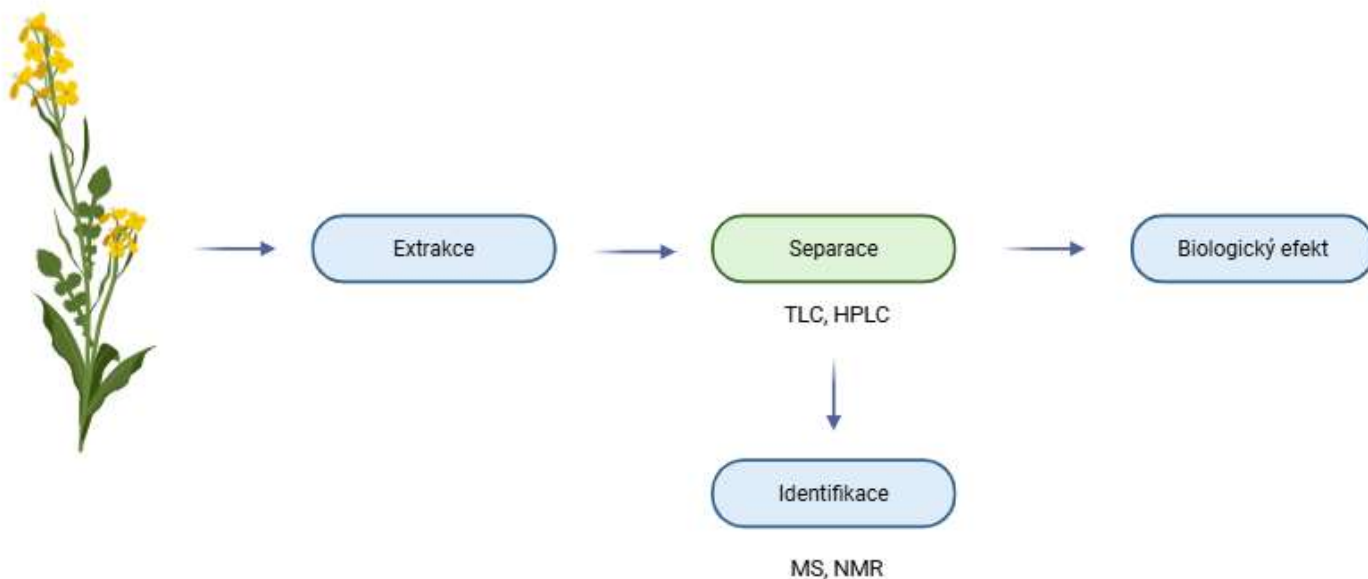
Hydrofobní látky mají nepolární vazby, nemají náboj, a netvoří vodíkové můstky. Často se jedná o alifatické alkanové řetězce nebo aromatické látky.

Hydrofilní látky	Vlastnost	Hydrofobní látky
	Nepolární vazby	✓
✓	Polární vazby	
✓	Náboj	
✓	Vodíkové vazby	

Obr .4

II. Vývoj léku z rostlin (2)

Je zajímavé, že asi polovina léků je odvozená z rostlin (2). V lidovém léčitelství se používají organoleptické vlastnosti a morfologie pro identifikaci rostlin a jejich extraktů. V medicíně se dnes využívají moderní techniky jako mikroskopie, genetická analýza a analytické metody na evaluaci rostliny a standardizaci extraktů (2).



- **Extrakce** Nejstarší způsoby extrakce zahrnují extrakci do rozpouštědla. Organické části molekul rostlin se často dobře extrahují do nepochlívajících rozpouštědel. Polární části molekuly jako náboje, brání extrakci a drží komponenty ve vodné fázi. Jsou proto testovány kyselé, neutrální a zásadité extrakty. Slabé kyseliny v kyselém prostředí jsou nedisociované a bez negativního náboje a lépe se extrahují do hydrofobních rozpouštědel. Naopak slabé zásady v zásaditém prostředí jsou bez náboje a lépe se extrahují do hydrofobních rozpouštědel. Moderní způsoby extrakce zahrnují ultrazvukem asistovanou, mikrovlnami asistovanou nebo enzymaticky asistovanou extrakci.
- **Separace** Nejčastější metodou separace rostlinných komponent je **chromatografie**. V nejčastějším uspořádání jsou přítomny dvě fáze: stacionární a mobilní. Mobilní fáze vzlíná póry stacionární fáze a při tom různou rychlostí posouvá látky obsažené v analyzovaném vzorku ve směru toku mobilní fáze. Rychlost pohybu jednotlivých látek závisí na poměru jejich afinit ke stacionární a mobilní fázi. Látky, které se více poutají ke stacionární fázi, postupují pomaleji a po skončení chromatografického dělení zůstávají blíže startu. Naopak látky s vyšší afinitou k mobilní fázi se pohybují rychleji a doputují do větší vzdálenosti od místa nanesení.

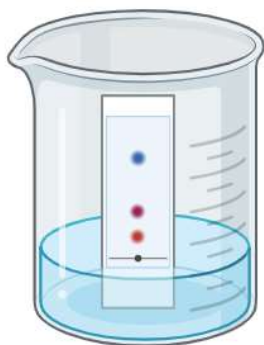
Chromatografie dělí látky na základě různé afinity k stacionární a mobilní fázi.

HPLC-high performance liquid chromatography- vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Je bezpochyby nejúčinnější technikou pro hodnocení komponent v rostlinách. Je spojená s detekcí látky umožňující kvantifikaci. Jako stacionární fáze se využívá kolona. Čím delší dráha (3 metrů) a čím jemnější částice stacionární fáze vytvářející ohromný povrch, tím lepší efekt separace. Aby vzorek a mobilní fáze prošli tak dlouhou dráhou s tak velkým povrchem, je mobilní fáze poháněna vysokým tlakem. Na konci kolony je detektor. Každá látka má charakteristický retenční čas, za který vyjde z kolony. Čím vyšší afinita ke stacionární fázi, tím je delší. Naopak, čím vyšší afinita k mobilní fázi, tím

je retenční čas kratší. Abychom odfiltrovali variabilitu způsobenou instrumentací, používají se standardy, u kterých se retenční čas srovnává s neznámým vzorkem.

TLC- thin layer chromatography- tenkovrstevná chromatografie

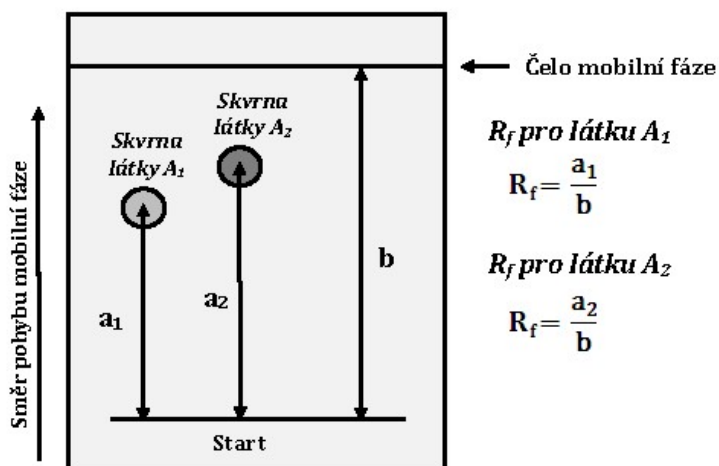


Stacionární fáze má obvykle polární charakter. Využívány jsou jemnozrnné adsorbenty, jako je hydratovaný oxid křemičitý (silikagel), hydratovaný oxid hlinitý nebo prášková celulóza. U komerčně dostupných desek pro TLC je adsorbent ve formě tenké vrstvičky zafixován na hliníkové nebo plastové podložce. **Mobilní fáze** je kapalina, která se pohybuje mezi částicemi pevné fáze. Vhodnou mobilní fází je rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, v nichž se všechny složky analyzované směsi rozpouštějí.

- **Hodnocení** – Vyhodnocení polohy skvrn se provádí pomocí tzv. **retardačního faktoru (R_f)**. Udává vzdálenost, o kterou se látka posune na dané desce při chromatografickém dělení. Vypočte se jako poměr vzdálenosti středu skvrny od startu (označena jako a) ke vzdálenosti čela mobilní fáze od startu (označena jako b)

$$R_f = \frac{\text{a – vzdálenosti středu skvrny od startu}}{\text{b – vzdálenosti čela mobilní fáze od startu}}$$

R_f je bezrozměrná veličina, která může nabývat hodnot od 0 do 1. Hodnotu rovnu 0 mají látky zůstávající na startu a hodnotu 1 látky nezadržené mobilní fází putující s čelem rozpouštědla.



R_f je charakteristický pro jednotlivé látky dělené chromatograficky za přesně definovaných podmínek (např. stejné složení mobilní a stacionární fáze, stejná teplota při vyvíjení). Pro spolehlivou identifikaci skvrn analyzovaných látek je zapotřebí na stejném chromatogramu současně s neznámým vzorkem analyzovat i **standardní čisté látky**, jejichž přítomnost v testovaném vzorku předpokládáme. Pokud standard a sledovaná látka mají stejnou hodnotu R_f a stejně reagují při detekci, jde zpravidla o totožné látky.

Detekce: U detekce rostlinných komponent můžeme použít:

Obecná činidla reagující s většinou látek jako jsou: p-anisaldehyd, fosfomolybdenová kyselina, vanillin (2).

Skupinově specifická činidla- Dragendorfovo činidlo pro alkaloidy, ninhydrin pro amino kyseliny a aminy, dinitrofenylhydrazin pro ketony a aldehydy (2).

Speciálním novým činidlem je NP-PEG- natural product polyethyleneglycol- pro detekci polyphenolu. Produkty po detekci fluoreskují: červeně (chlorofyly), purpurově (antocyaniny), modře (fenoly karboxylové kyselin), žlutooranžově (flavanoly) a zeleně(flavanony)(2).

- **Biologické vlastnosti.** Biologické účinky jsou nejprve testovány na enzymech nebo buněčných modelech, poté na zvířatech a na lidech se současným sledováním nežádoucích účinků. Existují jednoduché testy u rostlinných komponent, kde přímo na TLC desku můžeme nastříkat suspenzi bakterií či plísní rostoucích ve správném médiu a pomocí vhodných látek vizualizovat ničení

patogenu, přímo na TLC desce a tak identifikovat komponentu z rostliny s bakteriocidním nebo bakteriostatickým efektem. Na TLC desce je možné přímo analyzovat (2):

- **Antibakteriální aktivitu**
- **Antioxidační kapacitu**
- **Testovat inhibici speciálních enzymů** (např. test inhibice acetylcholinesterázy pro terapii Alzheimerovy choroby, inhibitory lipázy u obesity)
- **Estrogenní aktivitu**

Poté se identifikují jenom komponenty s výraznou biologickou aktivitou z TLC desky. Existují i přímé metody detekce biologických efektů u HPLC nebo po ní. Celková metoda je složitější a dražší, ale přesnější.

- **Identifikace** se děje pomocí NMR a MS.

NMR identifikuje sloučeninu na základě toho, jak atomová jádra se spinem odpovídají na silné magnetické pole a radiofrekvenční pulzy. V magnetickém poli se nukleární magnety orientují buď ve směru, tím získají nižší energii) nebo proti směru pole (tím získají vyšší energii). Po použití radiofrekvenčních pulzů přecházejí ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií. Když se pulzy vypnou, jádra se vracejí do základního stavu a emitují přitom energii jako signál.

MS- Proces začíná ionizací molekuly na různé ionty se specifickým poměrem hmotnosti k náboji vytvářející unikátní spektrum. Detektor vytvoří hmotnostní spektrum neznámé sloučeniny, které se srovná s hmotnostními spektry látek ze specifických knihoven a identifikuje neznámou komponentu. Identifikace struktury biologicky aktivní komponenty z rostliny může vést k syntéze léku s následnou kontrolovanou koncentrací a sítou v jedné tabletě.

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)



Pl. 61. *Millipertais perforat.* *Hypericum perforatum* L.

Extrakt třezalky tečkované byl delší dobu používán v lidovém léčitelství. Metaanalýza prokázala stejnou účinnost bylinného extraktu s antidepressivem u lehké a střední **deprese** v porovnání s placebem. Deprese je nemoc spojená s poruchou nálady (3). Pacient se cítí dlouhodobě smutně, je pro něj charakteristická anhedonia (nepřítomnost radosti a zájmu), poruchou koncentrace a spánku. Při zkoumání mozku pacientů se zjistilo, že mají nerovnováhu v hladinách některých neurotransmiterů v mozku. Konkrétně byl nalezen deficit: serotoninu, dopaminu a noradrenalinu (3). Extrakty třezalky vedly ke zvýšenému reuptaku serotoninu, dopaminu a noradrenalinu. Současně byla zaznamenána interakce s opioidními receptory a s GABA receptory a inhibice MAO - monoaminoxidáz, degradujících katecholaminy (3). Jako efektivní komponenta extraktu byl identifikován nejprve hypericin a později ještě efektivnější

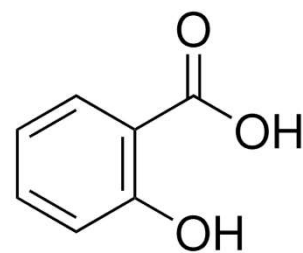
hyperforin (3). Experimentálně se hypericin testuje jako antivirotikum, antibiotikum a protinádorový lék. Hypericin je testován v rámci fotodynamické terapie nádoru. Po aplikaci do nádorové tkáně je topicky ozařen elektromagnetickým zářením, vstupuje do excitovaného stavu, reaguje s molekulárním kyslíkem, který následně tvoří reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) poškozující nádor. Extrakty z třezalky však můžou způsobit **fotosenzitivitu** a výrazně **indukují CYP enzymy degradující léky**, proto mohou snížit účinnost ostatních léků a současné podání s jinou medikací se nedoporučuje (3). Obrázek: www.wikipedia.en

Kyselina salicylová



Salix alba

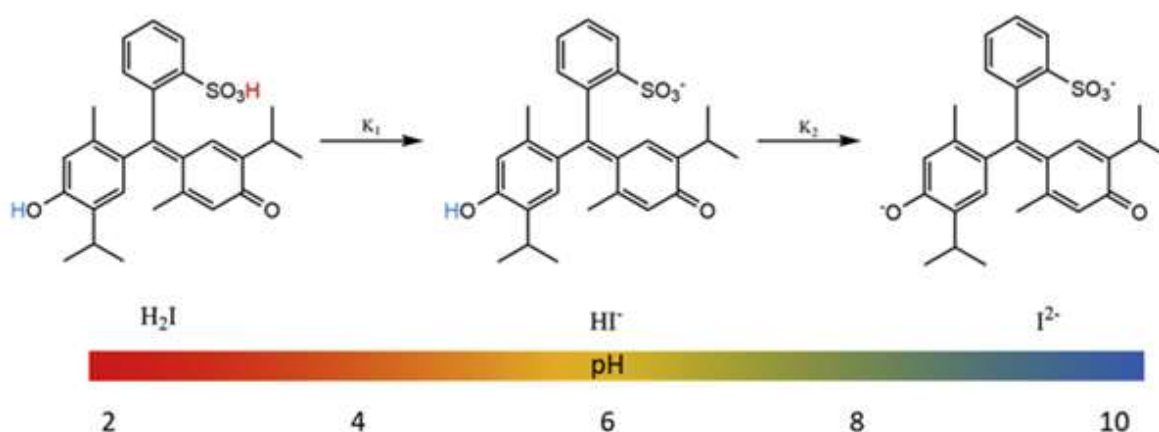
Vrba bílá (*Salix alba*) je přirozeným zdrojem kyseliny salicylové. Kyselina salicylová byla používána pravděpodobně již starověkými národy. Prvně byla využívána jako antipyretikum (lék proti horečce) a analgetikum (lék proti bolesti). Dnes se používá jako keratolytikum v dermatologii (lék rozrušující vrchní vrstvu pokožky). Její derivát kyselina acetylsalicylová se používá jako antiflogistikum, antipyretikum a pro prevenci agregace destiček po infarktu myokardu.



Obrázek: www.wikipedia.en

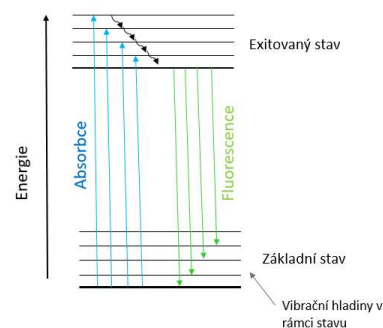
Thymolová modř

Thymolová modř je acidobazický indikátor. Protonací sloučenina absorbuje světlo při jiné vlnové délce a současně se mění i náboj sloučeniny.



Fluorescence (1)

Je vlastnost absorbovat elektromagnetické záření a znovu ho emitovat o nižší vlnové délce (1). Molekula v základním stavu absorbuje foton a projde do excitovaného stavu, který má více vibračních hladin (1). Velmi rychle projde za energeticky nejnižšího vibračního stavu v rámci excitovaného stavu (1). Excitovaná molekula se vrátí do základního stavu a vyzáří při tom foton (1). Kvůli přechodům v rámci vibračních stavů, je emitovaná energie nižší tj. má vyšší vlnovou délku (1). Fluorescence není jedinou možností vrácení se do základního stavu, molekula může například předat tuto energii molekule rozpouštědla či jiné molekule v roztoku (1).



Farmakologie léku (3)

- **Vstřebávání**

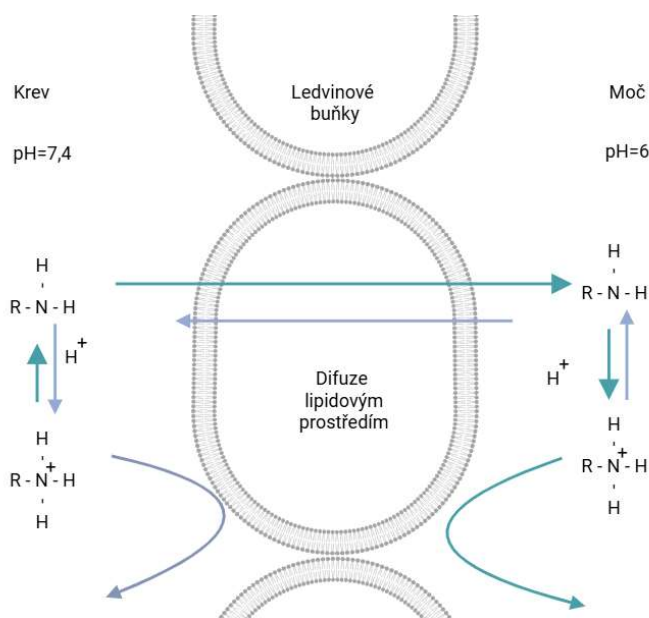
Při nejčastějším perorálním podání se lék musí nejprve dostat z GIT do krve, aby se mohl dostat na místo svého účinku. Musí tak překonat lipofilní bariéru enterocytu tvořeného membránou. Největší část léků jsou slabé kyseliny nebo slabé báze. Přechod lipofilní membránou významně závisí na pH. V kyselém prostředí jsou kyseliny protonované a bez náboje a lépe procházejí membránou. Naopak zásady jsou bez náboje v zásaditém prostředí.

Léky, které jsou příliš polární-hydrofilní, aby prošly membránou, se mohou podávat jenom parenterálně.

- **Vylučování močí**

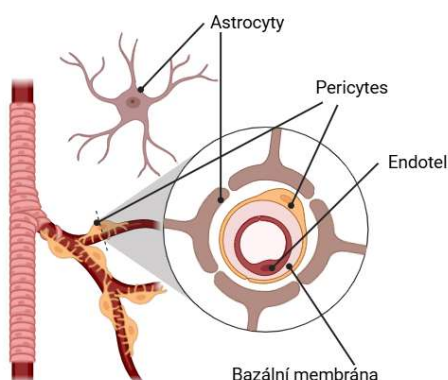
Moč má většinou kyselé pH, ale organismus ho může regulovat od zásadité po kyselou oblast.

Při kyselém pH jsou léky jako neutrální slabé báze protonované s pozitivním nábojem, což inhibuje jejich zpětnou resorpci lipofilní membránou (3). Naopak slabé kyseliny tvoří záporný aniont v bazické oblasti. Alkalizace moči usnadní vyloučení slabě kyselých léků (3).



- **Přechod do CNS**

Mozek je speciálním orgánem chráněným před substancemi v krvi hematoencefalickou bariérou. První vrstvou hematoencefalické bariéry jsou endotelové buňky těsně spojené těsnými spoji (tight junctions). Další vrstvou je bazální membrána s pericyty. Poté košaté výběžky astrocytu, úplně obalují cévy.



Přestup látek z krve do mozku se uskutečňuje na podkladě jejich rozpustnosti v tucích nebo pomocí přenašečových systémů. Snadno prostupuje voda a látky dobře rozpustné v lipidech (např.

ethanol, nikotin, plyny – O₂, CO₂, N₂O). Nezbytné hydrofilní látky (glukóza, neutrální aminokyseliny) jsou do mozku transportovány pomocí specifických transportních systémů. Vezikulární transport je velmi omezený. Neporušená hematoencefalická bariéra prakticky znemožňuje prostup makromolekul do mozkové tkáně. Průniku látek do mozku zabraňuje také enzymatická bariéra, na níž se podílejí enzymové systémy lokalizované ve stěnách mozkových cév (např. monoaminoxidázy – enzymy degradující monoaminy, aminopeptidázy – enzymy rozkládající enkefaliny).

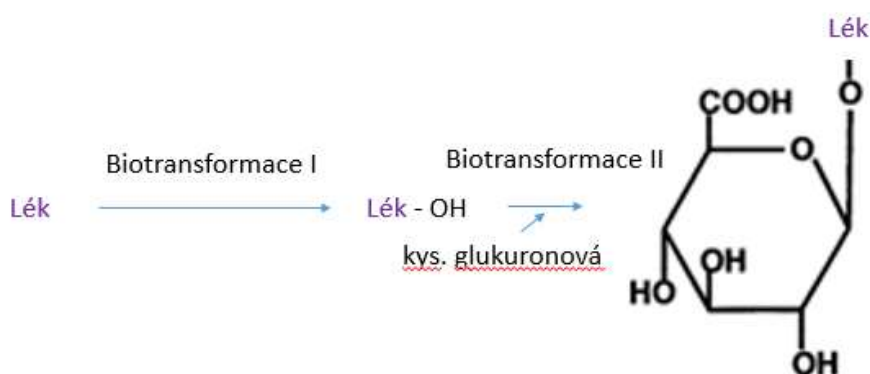
Když lék špatně prochází do CNS, nejčastěji pomůže zvýšit lipofilitu látky. K molekule se přidá nepolární skupina. Dalším způsobem může být přidání mastné kyseliny k molekule. Speciální technikou je využití přirozených transportéru do CNS, pomocí molekulárního mimikry. Lék se zmodifikuje tak, aby připomínal přirozený substrát pro transportér. Naopak když chceme, aby léčivo neprocházelo do CNS často postačí ho více polarizovat.

- **Biologické účinky**

Nejčastějším místem působení léku bývají receptory nebo enzymy, kde látky agonizují/aktivují nebo inhibují jejich aktivitu. Vazba, kterou se lék váže na receptor nebo enzym je buď kovalentní nebo se jedná o mezimolekulové interakce. Ideální je vazba pomocí několika mezimolekulových interakcí, protože je reversibilní a lék se po čase uvolní z vazby a může být vyloučen z těla. Naproti tomu kovalentně se vážící inhibitory působí až dokud nedojde k jejich degradaci a tvorbě nových receptorů, což může trvat i 48 hodin nebo i dní.

- **Biotransformace**

Většina cizorodých látek včetně léků, podléhá v organismu biotransformaci, při níž vznikají metabolity. Intenzivně jsou metabolizovány především lipofilní látky, jejichž přeměna zvyšuje jejich polaritu. To umožňuje vylučování vzniklých metabolitů močí.



Nejčastější je přeměna, kde v prvním kroku vznikne hydroxylová skupina na léku umožňující konjugační reakci. V druhé konjugační reakci se na ni naváže jedna z endogenních polárních sloučenin (např. kys. glukuronová, glycin, kyselina sulfonová). Výsledné metabolity mají obvykle polárnější charakter, což usnadňuje vyloučení močí.

Jak analyticky zjistit, kterým lékem se pacient otrávil se můžete dozvědět v odkazu:

<https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/5196/toxikologietexty12132212425.pdf>



Návody k úlohám

Po celý čas mějte nasazené ochranné **brýle** a používejte **rukavice**, když pracujete s toxickými a dráždivými látkami.

Úloha 1. Izolace antidepressiv z třezalky tečkované a izolace barevných pigmentů z ibišku

Úloha 2. Rozpustnost kyseliny salicylové

Úloha 3. Vliv náboje na rozpustnost

Úloha 4. Rozpustnost lipofilních látek ve vodě

Úloha 1 Izolace antidepressiv z třezalky tečkované a izolace barevných pigmentů z ibišku

Reagencie:

- | | |
|--|--|
| 1) List ibišku | 8) Ethylacetát  |
| 2) Třezalka tečkovaná | 9) Kyselina mravenčí  |
| 3) Aceton  | 10) Destilovaná voda |
| 4) Metanol  | 11) Obyčejná tužka |
| 5) Skelný prach nebo písek | 12) Silufolová deska |
| 6) Miska s tloučkem | 13) Lepicí páska |
| 7) Hexan  | 14) 5% polyethylenglykol (PEG) v metanolu  |

Pracovní postup:

Příprava extraktu z ibišku (provede jedna skupina na celý kruh)

Do třecí misky nastříhejte list ibišku. Zasypte malým množstvím skelného prachu nebo písku a směs pomocí tloučku utřete. Přidejte cca 1-2 ml acetonu a pokračujte ve tření. Vzniklý extrakt přepipetujte do několika mikrozkušavek (snažte se nabrat pouze extrakt, nikoli pevné částičky listu a skla) a krátce zcentrifugujte (lze nechat několik minut ustát). Čirý, intenzivně zbarvený supernatant použijte k separaci.

Příprava extraktu z třezalky tečkované (provede jedna skupina na celý kruh)

Do třecí misky nastříhejte nať Třezalky tečkované (cca 1g) Zasypte malým množstvím skelného prachu a směs pomocí tloučku utřete na kaši. Přidejte cca 5 ml metanolu a pokračujte ve tření v digestoři. Vzniklý extrakt přepipetujte do několika mikrozkušavek (snažte se nabrat pouze extrakt, nikoli pevné částičky byliny a skla) a krátce zcentrifugujte (lze nechat několik minut ustát). Čirý, intenzivně zbarvený supernatant použijte k separaci. Kdyby se všechn metanol vsákl, přidejte 5mL znova. Případně dál jenom 2ml.

Příprava mobilní fáze

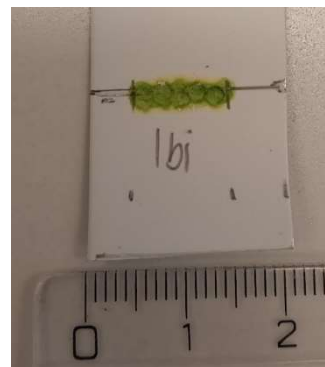
V první vaně (2x) bude připraveno 60ml hexanu a 40 ml acetonu.

V druhé vaně (2x) bude připravený: ethylacetát, kyselina mravenčí, a destilovaná voda v poměru 90: 6: 9, který již je nasycen parami.

Ve třetí vaně bude hexan.

Separace

- Nasaďte si rukavice, nedotýkejte se silufolu bez rukavic, abyste tam nezanechali otisky. Držte silufol nejlépe za hrany. Na silikagelové fólii vyznačte obyčejnou tužkou start (asi 1,5 cm od dolního okraje fólie). Na jeden chromatogram naneste extrakt z třezalky, na druhý z ibišku. Použijte 10 μ L pipetu a nasajte 8 μ L vzorku (extraktu ibišku nebo třezalky). Konce chromatogramu vynechejte (asi 0,5-1 cm) a na linii aplikujte **co nejmenší** kapičky vedle sebe, vznikne linie asi 1 cm. Nechte zaschnout, opakujte 4-5 krát. Nanášku je třeba provádět velmi pomalu a opatrně, aby výsledná skvrna byla co nejmenší. Ideálně vzorek nanášejte opakovaně po malých množstvích – mezi nanáškami nechte skvrnu zaschnout. Dejte pozor, aby nedošlo k poškrábání silikagelové vrstvy. Do levého horního rohu dejte své iniciály. Doplňte popisek úplně nahoru na chromatogram : (Tře) a (Ibi)
- Fólie vložte do dvou různých chromatografických van s různými mobilními fázemi:
 - Pro extrakt z ibišku je vana s hexanem a acetonem, 3:2 (v/v),
 - Pro extrakt z třezalky tečkované je vana s ethylacetátem, kyselinou mravenčí a destilovanou vodou v poměru: 90: 6: 9 (v/v/v).
 - 2 chromatogramy s ibiškem na celý kruh vložte do vany s hexanem.
- Jakmile čelo doputuje cca 1 cm pod horní okraj fólie, vyndejte chromatogram z vany a nechte uschnout. (U třezalky je možné stopnout 15 minut-, ibišek 5 min, dávejte pozor, aby vzorek neutekl ven). Tužkou obtáhněte jednotlivé zóny a **vyznačte čelo** chromatogramu.



Vizualizace a fluorescence pod UV

Chromatogram s třezalkou postříkejte v digestoři 5% roztokem PEG v metanolu. Bez postřiku je často fluorescence příliš slabá. Po uschnutí pozorujte v UV při 366 nm. Na stole vedle počítače jsou UV lampy. Antidepresivní hypericin a pseudohypericin jsou červeno-fialovo-růžové pigmenty s červeno-růžovou fluorescencí. Pokuste se je identifikovat. Chlorofyly jsou zelená barviva s červenou fluorescencí.

Uskladnění:

Chromatogram z třezalky a ibišku přelepte průhlednou lepicí páskou – zpomalíte tak vyblednutí pigmentu.

Úloha 2 Rozpustnost kyseliny salicylové

Reagencie:

- Krystalická kyselina salicylová 
- Kyselina chlorovodíková 2 mol·l⁻¹  (Ze sady nad pracovním stolem)
- Hydroxid sodný 2 mol·l⁻¹  (Ze sady nad pracovním stolem)

Pracovní postup:

1. Do tří zkumavek nasype cca 0,5-1cm kyseliny salicylové. Pokuste se o stejné množství ve všech zkumavkách.
2. Do první zkumavky přidejte asi 2 ml čištěné vody. (asi 2cm)
3. Do druhé přidejte asi 2 ml kyseliny chlorovodíkové . (asi 2cm)
4. Do třetí přidejte asi 2 ml roztoku hydroxidu sodného . (asi 2cm)
5. Zkumavky promíchejte, pozorujte rychlost rozpouštění kys. salicylové.
6. Poté, co se ve zkumavce s hydroxidem kyselina zcela rozpustí, přidejte k tomuto roztoku asi 3 ml (asi 3cm) kyseliny chlorovodíkové  a opatrně promíchejte. Pozorujte změnu směsi. Pozor: Při neutralizaci se směs může prudce zahřát, může začít vřít a může vystříknout. Pracujte tak, aby ústí zkumavky bylo odvrácené od vás i osob stojících v okolí!

Úloha 3 Vliv náboje na rozpustnost

Reagencie:

- 1) Roztok thymolové modři
(0,1g thymolové modři, 4,3 ml NaOH a 50 ml 95 % etylalkoholu doplněno do 250 ml vodou)
- 2) NaOH 1mol/L 
- 3) HCl 1mol/L 
- 4) Destilovaná voda
- 5) Chloroform  

Pracovní postup:

- (1) Do třech zábrusových zkumavek (zkumavky se zábrusem a skleněným uzavíráním) nalijte po 1mL -2ml chloroformu. Automatický dávkovač je v digestoři.
- (2) Do první zkumavky nalijte asi 2 cm HCl.
- (3) Do druhé zkumavky nalijte 2cm destilované vody
- (4) Do třetí zkumavky nalijte 2cm NaOH.
- (5) Do všech zkumavek postupně nakapejte 2-3 kapky roztoku thymolové modři.
- (6) Pozorujte zbarvení.
- (7) Zkumavky uzavřete a zakryjte parafilmem.
- (8) Vortexujte postupně jednotlivé zkumavky 2x po 30 - 40 s při maximálních otáčkách. Vír by měl být patrný v celém objemu.

Extra úloha:

Do zábrusové zkumavky nalijte asi 1cm chloroformu.

Přidejte 1ml HCl. (asi 1cm)

Přidejte 2-3 kapek thymolové modři.

Uzavřete, zaparafilmuje a vortexujte intenzivně 30-40 sekund 2x.

Pozorujte barvu jednotlivých fází.

Přidejte 2mL NaOH. (asi 2cm)

Uzavřete, zaparafilmuje a vortexujte intenzivně 30-40 sekund 2x.

Přidejte 2 ml HCl.

Uzavřete, zaparafilmuje a vortexujte intenzivně 30 sekund.

Pozorujte barvu jednotlivých fází.

Vysvětlete pozorované změny. 😊

Úloha 4 Rozpustnost lipofilních látek ve vodě-**Reagencie:**

- a) Olej zabarvený Sudanem red III (4g/L v lihobenzínu)
- b) Destilovaná voda
- c) Deoxycholát sodný 50g/L

Pracovní postup:

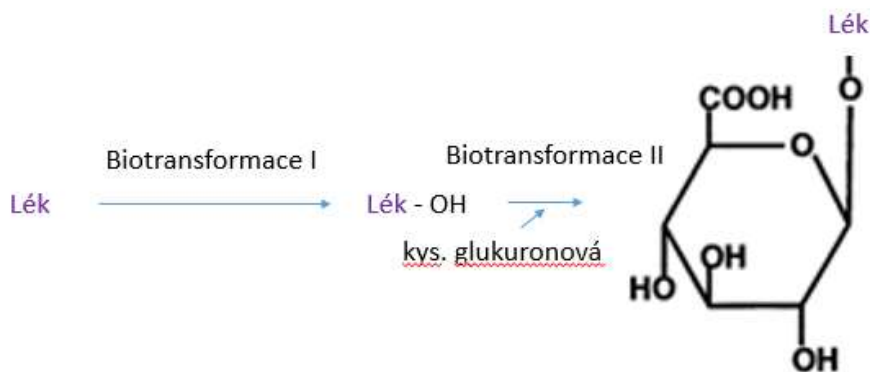
1. Do dvou vysokých zkumavek dejte do každé 6 ml destilované vody. (asi 6cm)
2. Poté do každé přikápněte 20 kapek obarveného oleje.
3. Do druhé zkumavky přidejte 2ml (asi 2cm) deoxycholátu.
4. Obě zkumavky uzavřete parafilmem a postupně vortexujte pro pomíchání cholátu.
5. Zatřepte v ruce oběma zkumavkami a porovnejte velikost olejových kapek u obou zkumavek.



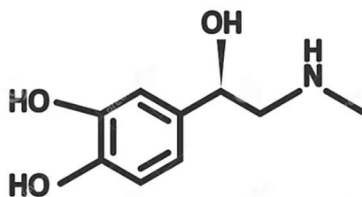
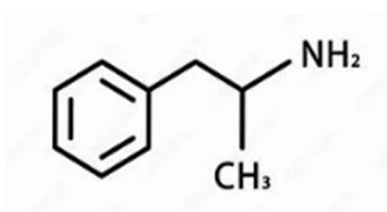
Úlohy k přemýšlení a na prezentaci

Úlohy na prezentaci pro studenty na konci praktik. Odborný asistent vybere a rozdělí úlohy, které se budou studenti ve dvojicích nebo trojicích nebo ve čtveřicích na praktiku prezentovat. Rozdělí jim je na začátku praktika.

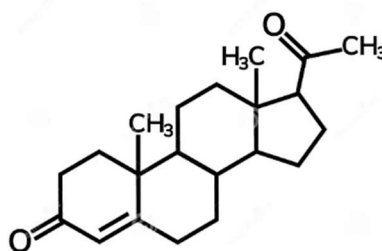
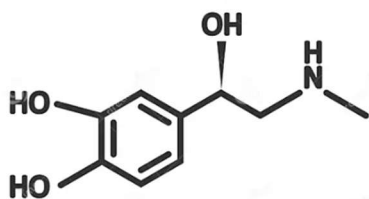
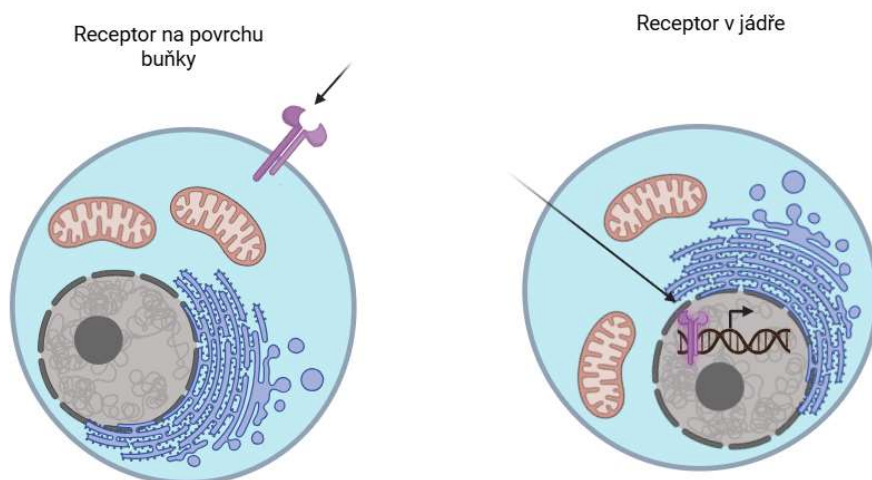
1. **Kyselina salicylová** je lék, který se nachází ve vrbové kůře. Představte si, že se chystáte připravit extrakt z pomleté kůry. Máte připravené nepolární rozpouštědlo, které dobře interaguje s aromatickým kruhem kyseliny. Jaké pH bude nejvhodnější na přípravu extraktu. Neutrální, kyselé nebo zásadité?
2. **Kyselina salicylová** nabývá různě protonované formy, při přechodu trávicím traktem. Membránou nejlépe pronikají hydrofobní látky. Při jakém pH se bude nejlépe vstřebávat? Kyselém, zásaditém nebo neutrálním?
3. Při vysokých hladinách **kyseliny močové** (slabá kyselina) mohou vznikat krystaly, které často nacházíme v kloubu na noze nebo v ledvinách. Jaké pH usnadní rozpuštění krystalu? Kyselé, zásadité nebo neutrální? Doporučili byste pacientovi alkalizaci, acidifikaci nebo neutralizaci moči?
4. Léky a cizorodé látky se v játrech mění. Nejčastější změnou je připojení kyseliny glukuronové na molekulu léku. Ta zvýší rozpustnost léku a ulehčí vyloučení močí, zabrání se tím akumulaci léčiva. Jakým způsobem ulehčí kyselina glukuronová rozpuštění ve vodě? Jaké interakce předpokládáte mezi molekulami vody a touto kyselinou. Vyznačte, které části se jí zúčastní!



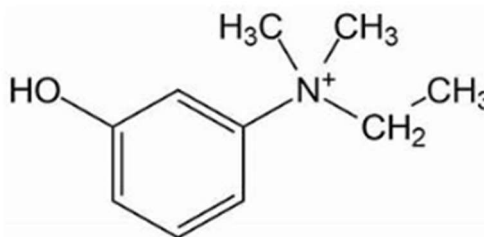
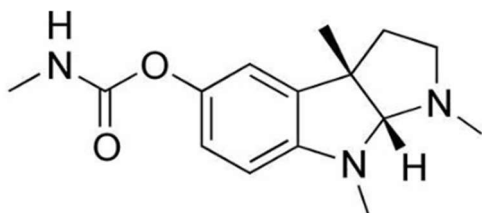
4. Na obrázku jsou dvě **sloučeniny**. Obě působí na srdce, kde zvyšují srdeční frekvenci. Ale jenom jedna z nich má však výrazné účinky na CNS, vyvolávající zpočátku pocit čilosti, zvýšených duševních schopností, euforie, které však ve větších dávkách vedou k paranoidním schizofrenním stavům. Současně je tato látka výrazně návyková. Pokuste se ze struktury odhadnout, která ze sloučenin to je.



5. **Hormony** jsou efektivní, protože se mohou vázat na receptory, které následně vedou ke změnám v buňce a charakteristickým efektům. Některé receptory jsou na povrchu buněk, jiné jsou v jádře. Který z hormonů může volně projít membránou a má receptor v jádře? Druhý hormon, membránou nemůže projít a má naopak receptory na povrchu buněk.



6. **Myastenie gravis** je nemoc, při které se produkují protilátky proti acetylcholinovému receptoru, umožňujícímu komunikaci mezi nervy a příčně pruhovanými svaly. Prvními příznaky mohou být diplopie (dvojité vidění), ptóza víčka, svalová slabost. Onemocnění může vygradovat do respirační insuficience. Jako lék se používá látka zvyšující koncentraci acetylcholinu, inhibicí jeho přirozeného rozkladu. Podává se při vážných příznacích intravenózně. **Glaukom** je onemocnění oka, projevující se zvýšeným nitroočním tlakem, kde je nerovnováha mezi tvorbou a vstřebáváním komorové vody. Jako lék se používá látka kontrahující řasnaté těleso usnadňující otok komorové vody. Bývá přímo aplikovaná do konjunktiválního vaku, kde se vstřebává a vyvolá svůj efekt. Pokuste se na základě struktury určit, která látka se používá intravenózně u myastenie gravis a která se aplikuje se do konjunktiválního vaku u glaukomu.



Použitá literatura

1. Kodíček M, Karpenko V. Biofyzikální chemie. Academia, editor2013.
2. Choma IM, Nikolaichuk H. TLC bioprofiling—A tool for quality evaluation of medicinal plants. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Elsevier; 2022. p. 407-22.
3. G.Katzung B. Základní a klinická farmakologie. H&H, editor2006.