

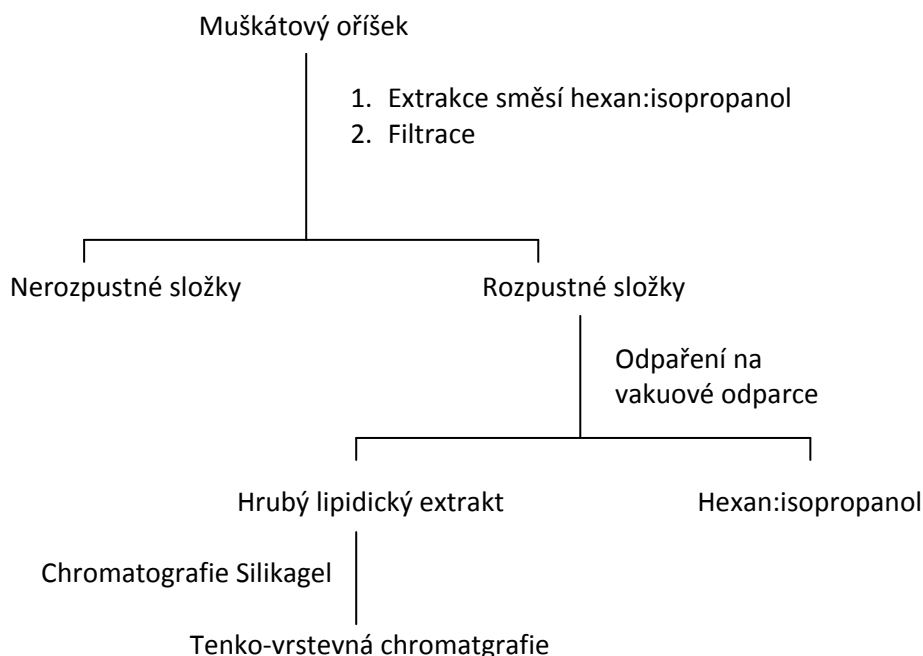
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.6
Izolace lipidů z muškátového oříšku

Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

TEORETICKÝ ÚVOD

V této úloze bude izolována směs lipidů pomocí extrakce do organického rozpouštědla. Jako výchozí materiál bude použito semeno *Myristica fragrans* (muškátový oříšek). Toto semeno obsahuje mimořádně vysoký podíl jednotlivých druhů lipidů. Nejprve bude provedena hrubá izolace lipidů, které budou dále děleny pomocí chromatografie na koloně obsahující silikagel. Jednotlivé lipidy budou poté identifikovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC). Schéma purifikace je uvedeno na obrázku 1.



Obrázek 1. Schéma purifikace lipidických složek muškátového oříšku

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Izolace Lipidů

Postup práce:

1. Do 125 ml Erlenmayerovi baňky dejte 2.5g nastrouhaného muškátového oříšku, míchadlo a přidejte 50 ml směsi hexan-izopropanol (3:2).
2. Na Erlenmayerovu baňku připevněte zpětný chladič a stálého míchání zahřívajte v digestoři po dobu 15 minut (zahřívání poloha 4, míchání poloha 2). Během této doby si připravte filtrační nálevku s vloženým filtračním papírem a 100 ml kádinku, do které budete filtrát jímat.
3. Následně přestaňte směs zahřívát a rychle ji přefiltrujte přes připravený filtr. Následně filtr propláchněte dalšími 20 ml horké směsi hexan-izopropanol (3:2).
4. Filtrát přelijte do odpařovací baňky a na rotační vakuové odparce odpařte rozpouštědlo (180 otáček, teplota vodní lázně 40°C). Měly byste dostat nažloutlý olejový zbytek nebo naředlý pevný zbytek.

B. Chromatografie na Silika matrici

Postup práce:

1. Odvažte 50 mg hrubého extraktu z předchozího kroku do skleněné zkumavky a rozpustíte je v 1 ml hexanu.
2. Odvažte 250 mg Silikagelu a nasypete ho do skleněné separační kolony.
3. Opatrně nalijte do uzavřené skleněné kolony 10 ml hexanu a nechejte silikagel cca. 2 min zbobtnat.
4. Poté otevřete kohout u skleněné kolony a nechejte hexan odkapat, až hladina v koloně dosáhne matrice.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.6
Izolace lipidů z muškátového oříšku

5. Poté na kolonu naneste 1 ml hexanu s rozpuštěným extraktem, otevřete kohout u skleněné kolony a nechte hexan odkapat, až hladina v koloně dosáhne matrice.
6. Jakmile roztok v koloně dosáhne matrice, zastavte průtok a naplňte opatrně kolonu 10 ml hexanu.
7. Poté otevřete kohout a nastavte průtok na 1-2 kapky/sekundu. Proteklý roztok jímejte do první Erlenmayerovi baňky.
8. Jakmile roztok v koloně dosáhne silika matrice, zastavte průtok a naplňte opatrně kolonu 10 ml směsi hexan:ether (90:10).
9. Otevřete kohout a nastavte průtok na 1-2 kapky/sekundu. Proteklý roztok jímejte do druhé Erlenmayerovi baňky.
10. Jakmile roztok v koloně dosáhne silika matrice, zastavte průtok a naplňte opatrně kolonu 10 ml směsi hexan:ether (80:20).
11. Otevřete kohout a nastavte průtok na 1-2 kapky/sekundu. Proteklý roztok jímejte do třetí Erlenmayerovi baňky.
12. Poté přelijte tři nasbírané frakce do 50ml odpařovacích baněk a postupně odpařte na vakuové odparce.

C. Tenkovrstevná Chromatografie na Silika desce

Postup práce:

1. Rozpusťte 10 mg hrubého extraktu lipidů v 1 ml chloroformu a odpařené frakce v 0.5 ml chloroformu.
2. Na chromatografickou desku si 2 cm od okraje udělejte tužkou čáru. Potom pomocí kapilárek naneste tři nasbírané frakce, hrubý extrakt a standardy lipidů. Aplikaci pomocí kapilárek opakujte přibližně 10 krát pro každý vzorek, kdy mezi jednotlivými

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.6
Izolace lipidů z muškátového oříšku

- aplikacemi nechte vždy rozpouštědlo odpařit (celkem od každého vzorku naneste cca. 0.25 ml).
- Po nanesení vzorků vložte TLC desku do chromatografické komory a vyvíjejte v systému hexan:ether:k. octová (80:20:1).
 - Ponechte desku v komoře, dokud rozpouštědlo není přibližně 1 cm pod okrajem desky. Poté desku vyjměte s komory, označte tužkou polohu rozpouštědla a nechte desku vyschnout.
 - Poté ji umístěte na 10 minut do iodové komory a nahnědlé spoty obtáhněte tužkou.
 - Spočítejte relativní mobility standardů a jednotlivých složek a výsledek popište.

Výsledky:

<u>Standard</u>	<u>R_f</u>
METHYL LINOLENÁT	
CHOLESTERYL LINOLEÁT	
K. OLEOVÁ	
L- α -FOSFATIDYL CHOLIN	
1-MONO OLEOYL-RAC-GLYCEROL	
Hrubý extrakt	
1. Frakce	
2. Frakce	
3. Frakce	



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.6
Izolace lipidů z muškátového oříšku

Popište výsledek purifikace lipidů a složení jednotlivých frakcí.