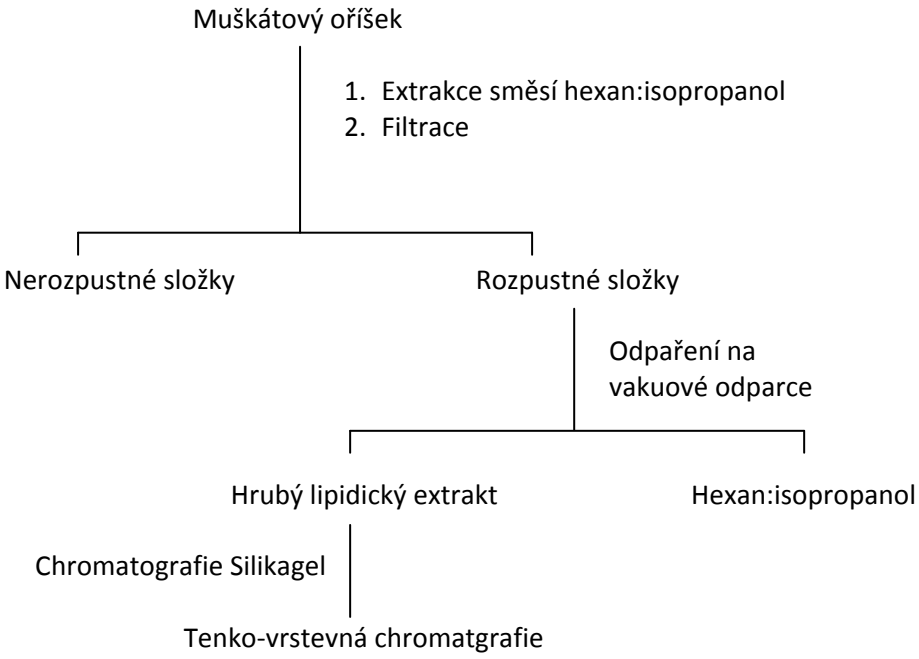
Jméno:	
Obor:	**Datum provedení:**

TEORETICKÝ ÚVOD

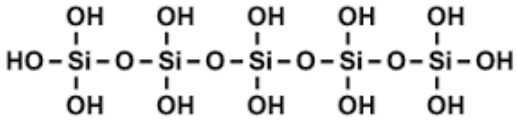
V této úloze bude izolována směs lipidů pomocí extrakce do organického rozpouštědla. Jako výchozí materiál bude použito semeno *Myristica fragrans* (muškátový oříšek). Toto semeno obsahuje mimořádně vysoký podíl jednotlivých druhů lipidů. Nejprve bude provedena hrubá izolace lipidů, které budou dále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



Obrázek 1. Schéma purifikace lipidických složek muškátového oříšku

Chromatografie se obecně používá k separaci směsi látek na jednotlivé komponenty, kdy všechny typy chromatografií fungují na podobném principu. Obsahují stacionární fázi (pevnou nebo kapalnou navázanou na nosiči) a mobilní fázi (kapalinu nebo plyn). Mobilní fáze teče skrze stacionární fázi a nese jednotlivé komponenty komplexní směsi, které pak putují rozdílnou rychlostí. V případě tenkovrstevné chromatografie je použito tenké vrstvy silika gelu nebo oxidu hlinitého přichycené na plátku z kovu, skla nebo plastu tvořící stacionární fázi. Mobilní fáze je poté vhodné rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel.

Silika gel je forma oxidu křemičitého, kdy atomy křemíku jsou spojeny pomocí atomů kyslíku do velké kovalentní struktury a na povrchu silika gelu jsou přítomny – OH skupiny. Z tohoto důvodu je povrch silika gelu velmi polární a mezi separovanou komponentou a matricí může docházet k tvorbě vodíkových vazeb, interakcí pomocí van der Waalsových sil a dipól-dipól interakcí.



Obrázek 2. Struktura silika gelu

Jakmile začne rozpouštědlo vzlínat po chromatografické desce, nejprve dojde k rozpuštění nanesených látek. Poté jsou jednotlivé komponenty neseny po chromatografické desce vzlínající mobilní fází. Rychlost pohybu jednotlivých komponent záleží na míře jejich adsorpce na stacionární fázi a jejich rozpustnosti v použité mobilní fázi. Například komponenta tvořící vodíkové vazby se silika matricí bude daleko více zachytávána než komponenta interagující jen pomocí van der Waalsových sil. Nicméně adsorpce není trvalá a dochází k neustálému přechodu látek mezi stavem adsorpce na silika gel a rozpuštěním v mobilní fázi. Pokud však látka není v mobilní fázi rozpustná, je na silika gelu trvale adsorbovaná a nedochází k jejímu pohybu. Z toho vyplývá, že čím je látka silněji adsorbována, tím kratší vzdálenost na chromatografické desce urazí.

Prakticky se většinou vyhodnocuje vzdálenost, kterou daná komponenta urazila v poměru ke vzdálenosti, kterou urazila mobilní fáze. Z tohoto důvodu se ihned po vyjmutí chromatografické desky z komory označí pozice rozpouštědla a po detekci separovaných komponent se vypočte pro každou komponentu příslušný retenční faktor R_f:

$$\mathrm{Rf} = \frac{\text{vzdálenost komponenty od startu}}{\text{vzdálenost rozpouštědla od startu}}$$

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Izolace Lipidů

Postup práce:

1. Do 250 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 zahřívejte 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 zahřívat 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 našedlý pevný zbytek.

B. Chromatografie na Silika matrici

Postup práce:

1. Odvažte 50 mg hrubého extraktu z předchozího kroku do skleněné zkumavky a rozpusťte je v 1 ml hexanu.
2. Odvažte 250 mg Silikagelu a nasypte ho do skleněné separační kolony.
3. Opatrně nalijte do uzavřené skleněné kolony 10 m 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.
5. Poté na kolonu naneste 1 ml hexanu s rozpuštěným extraktem, otevřete kohout u skleněné kolony a nechejte 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 aplikacemi nechte vždy rozpouštědlo odpařit (celkem od každého vzorku naneste cca. 0.25 ml).
3. Po nanesení vzorků vložte TLC desku do chromatografické komory a vyvíjejte v systému hexan:ether:k. octová (80:20:1).
4. 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.
5. Poté ji umístěte na 10 minut do iodové komory a nahnědlé spoty obtáhněte tužkou.
6. Spočítejte relativní mobility standardů a jednotlivých složek a výsledek popište.

Výsledky:

Standard	***Rf***
METHYL LINOLENÁT	
CHOLESTERYL LINOLEÁT	
K. OLEOVÁ	
L-α-FOSFATIDYL CHOLIN	
1-MONO OLEOYL-RAC-GLYCEROL	
Hrubý extrakt	
1. Frakce	
2. Frakce	
3. Frakce	

Popište výsledek purifikace lipidů a určete přibližné složení lipidů v jednotlivých frakcích.