SEPARACE LIPIDŮ ZE SÉRA

Poznámka: organická rozpouštědla NEPIPETOVAT pístovými mikropipetami!!!!

Úloha 1: Rozdělení sérových lipidů pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie a stanovení koncentrace jednotlivých složek

Princip:
Chromatografie je jedna z nejrozšířenějších analytických metod umožňující účinnou separaci látek nutnou pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – **stacionární** (zakotvené) a **mobilní** (pohyblivé). Různé látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze vše využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO_2, Al_2O_3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina či plyn. Z hlediska provedení uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fázi pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a další.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Vlastní chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Vzorek se ve velmi malém množství (µl) nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatografie. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou a komora se uzavře. Vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vzlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky. Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku.
Stacionární fáze: oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměniče, polyamid a silikagel s -C18, -NH_2 nebo -CN skupinami (tenké vrstvy mohou obsahovat fluorescenční indikátor UV_{254} k usnadnění detekce analyzovaných látek)
Mobilní fáze: cyclohexan, toluen, chloroform, dichlormethan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi

Detekční metody
a) ponoření nebo postřik chromatogramu vhodným činidlem
b) fluorescence luminoforů v UV záření
c) zhášení fluorescence tenkovrstvé desky nadopované fluorescenčním indikátorem

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
Univerzita Pardubice
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Roztoky a pomůcky:
sérum
chloroform
methanol
hexan
diethylether
kys. octová
detekční činidlo
zkumavky
stojánek na zkumavky
pipety, pístové mikropipety, pasteurovy pipety
centrifuga
chromatografická deska
chromatografická vana
rozprašovač
sušárna
špachtle
souprava pro stanovení celkových lipidů (Lachema)
H_2SO_4

Postup:
1) Extrakce lipidů ze séra a odpaření pod dusíkem:
Do centrifugační zkumavky odměřte 4 ml směsi chloroform - methanol (1:1) a přidejte 0,2 ml séra. Protřepejte, uzavřete a nechte centrifugovat na stolní centrifúze při 3000 ot/min po dobu 5 min. Horní vrstvu (3,5 ml) opatrně odsajte pomocí pipety do jiné zkumavky. Zapněte odsávání v digestoři a při 60°C nechte odpařit během cca 15 min pod dusíkem do sucha.

2) Chromatografie a identifikace kyselinou fosfomolybdenovou:
Příprava mobilní fáze:
160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru, 6 ml kyseliny octové (cca 98%)
Tuto směs nalijte do chromatografické vany a řádně promíchejte. Vanu uzavřete a nechte 30 - 45 min nasytit.
Příprava chromatografické desky:
Měkkou tužkou označte rámeček: dolní okraj 2,5 cm, horní okraj a strany 1 cm. Vnitřní plochu rozdělte na 5 polí po 3,6 cm a nahoře jednotlivé dráhy označte.
Postup chromatografie:
Odpařený extrakt (z **1)**) rozpusťte v 75 µl směsi chloroform - methanol (2:1). Tento celý objem naneste postupně ve 3 dávkách Pasteurovou pipetou na chromatografickou desku a po každém nanesení nechte odpařit rozpouštědlo. Potom vložte desku do nasycené chromatografické vany, rychle uzavřete a nechte cca 60 min vyvíjet (až čelo mobilní fáze dosáhne 1 cm od horního okraje desky). Desku vyjměte z vany a nechte v digestoři vysušit.
Příprava detekčního činidla:
kyselina fosfomolybdenová 0,05 mol/l
Ze zásobního roztoku odměřte 5 ml a přidejte 5 ml ethanolu. Detekční činidlo nalijte do rozprašovače a rovnoměrně jím postříkejte pole se standardem na chromatografiké desce. Desku vložte na 5 - 10 min do sušárny vyhřáté na 60°C.

3) Izolace jednotlivých složek lipidů:

Sérové lipidy byly rozděleny na 5 složek seřazených podle vzrůstajícího R_F: fosfolipidy, diacylglyceroly, mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu.

Podle standardu označte jednotlivé složky měkkou tužkou tak, aby horní okraj místa obsahujícího označovanou složku byl 0,5 cm nad skvrnou standardu a dolní okraj také 0,5 cm pod skvrnou standardu. Označené složky vyškrabejte z chromatografické desky pomocí špachtle a přeneste do předem připravených a označených zkumavek s uzávěrem.

4) Extrakce lipidů z jednotlivých vrstev a stanovení jejich koncentrace:

Ke každé složce celkových lipidů přidejte do zkumavky 4 ml směsi chloroform - methanol (1:1). Uzavřené zkumavky 2 min intenzivně protřepejte, nechte 2 min stát a centrifugujte 5 min při 3000 ot/min. Z každé zkumavky odpipetujte 2 ml supernatantu do čistých zkumavek a při pokojové teplotě nechte asi 20 min odpařovat pod dusíkem (v uzavřené digestoři) do sucha.

5) Stanovení koncentrace jednotlivých složek sérových lipidů:

Pro toto stanovení použijte soupravu pro stanovení Celkových lipidů od firmy Lachema.

a) Stanovení se standardem:

Do zkumavek pipetujte podle tabulky:

	odparek	Činidlo 1	konc. H_2SO_4
vzorek	odparek	----	1,5 ml
standard	---	0,02 ml	1,5 ml
blank	---	---	1,5 ml

Všechny zkumavky (vzorek, blank, standard) promíchejte a nechte 15 min vařit na vodní lázni. Po ochlazení zkumavek v proudu studené vody odměřte z každé do nových zkumavek 0,1 ml hydrolyzátu a přidejte 1,5 ml Činidla 2 (fosfovanilinové činidlo). Inkubujte 50 min při laboratorní teplotě. Poté do 10 min změřte absorbanci vzorků (A) a standardu (A_{st}) proti blanku při vlnové délce 530 nm.

Výpočet:

celkové lipidy (g/l) = $8 * (A / A_{st})$

b) Stanovení s kalibrační křivkou:

Ze zásobního roztoku činidla 1 o koncentraci 8 g/l se připravte ředěním s ethanolem řadu roztoků o koncentraci: 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 g/l. Podle postupu a) stanovte absorbance jednotlivých roztoků a vynese do grafu proti koncentraci.

Závěr: