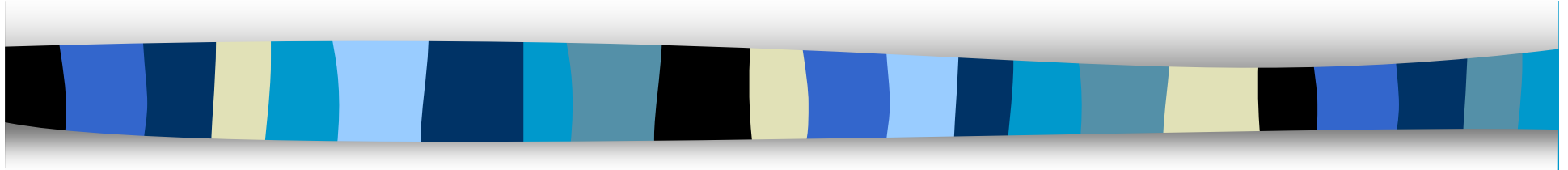
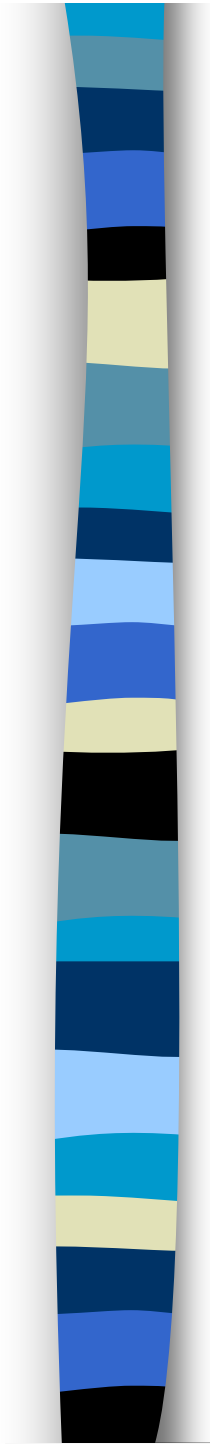


Φροντιστήριο Βιοχημείας Ι



Ε.Φραγκοπούλου
Επίκουρη καθηγήτρια



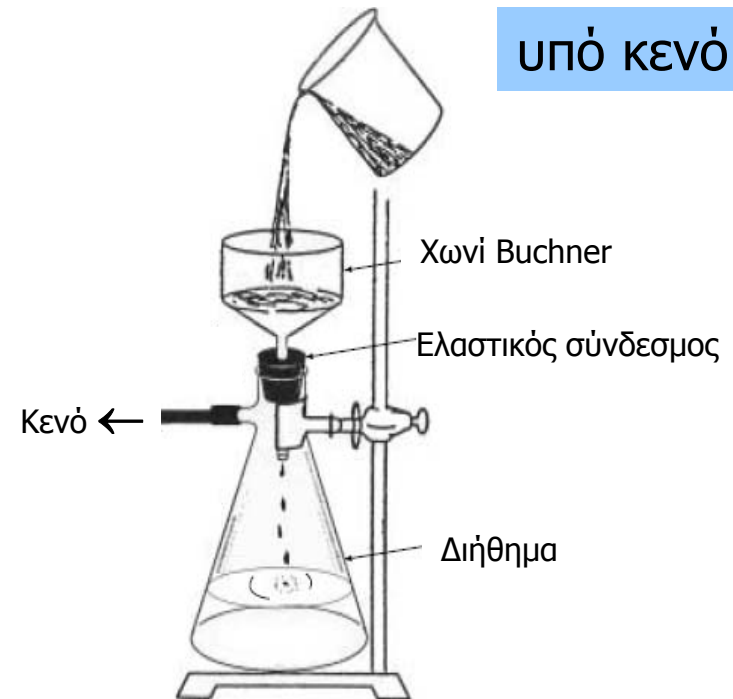
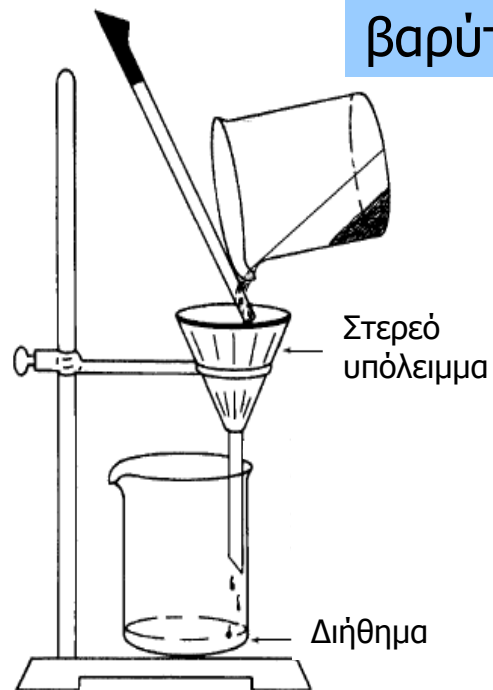
Μέθοδοι διαχωρισμού

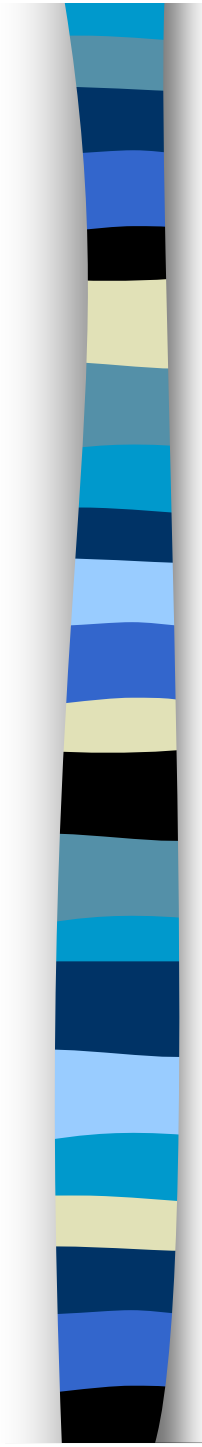
- Διήθηση
- Απόσταξη
- Φυγοκέντρωση
- Εκχύλιση
- Χρωματογραφία
- Ηλεκτροφόρηση

Διήθηση

Διαχωρισμός στερεού από υγρό με τη χρήση πορώδους υλικού ως φίλτρου

- φίλτρο => χαρτί, βαμβάκι, υαλοβάμβακας, άμμος, κ.τ.λ
- διήθηση => βαρύτητα, υπό κενό, φυγοκέντρησης (υπερδιήθηση)





Εκχύλιση

Διαχωρισμός ενός στερεού ή υγρού από ένα μίγμα (στερεό ή υγρό) με τη χρήση υγρού διαλύτη

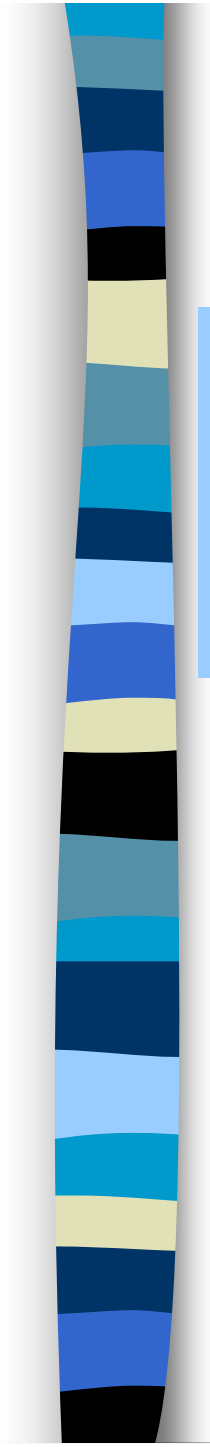
- εκχύλιση στερεού-υγρού (*solid-liquid extraction*)

το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε στερεό μίγμα και η παραλαβή του γίνεται με υγρό διαλύτη

- εκχύλιση υγρού-υγρού (*liquid-liquid extraction*)

το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε υγρό μίγμα και η παραλαβή του γίνεται με υγρό διαλύτη

η διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου συστατικού στον υγρό διαλύτη πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή στο εκχυλιζόμενο μίγμα



Φυγοκέντρηση

Η φυγοκέντρηση έχει πολλές εφαρμογές οι πιο διαδεδομένες είναι:

- ο διαχωρισμός στερεού από υγρό,
- η προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων
- ο διαχωρισμός και η μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα κ.τ.λ) των μακρομορίων και των κυτταρικών οργανιδίων.

- Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή στο δείγμα ισχυρής δύναμης μέσω περιστροφής του σε υψηλή ταχύτητα
- Οι πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται οδηγούν στην καταβύθιση των σωματιδίων με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα το σχήμα, μέγεθος και την πυκνότητα τους.

Φυγοκέντρωση

η περιστροφή δημιουργεί φυγόκεντρο δύναμη

$$F = m\omega^2 r$$

F : φυγόκεντρος δύναμη

m : μάζα του σωματιδίου (g)

ω : γωνιακή ταχύτητα (rad/sec)

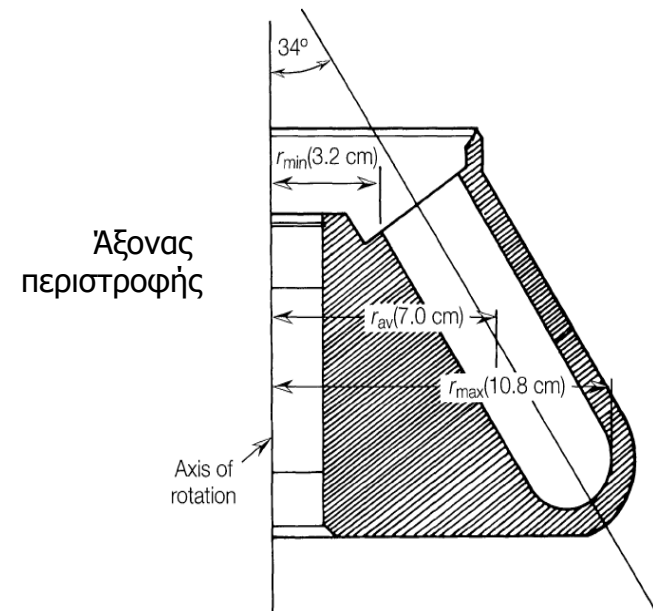
r : ακτίνα περιστροφής (cm)

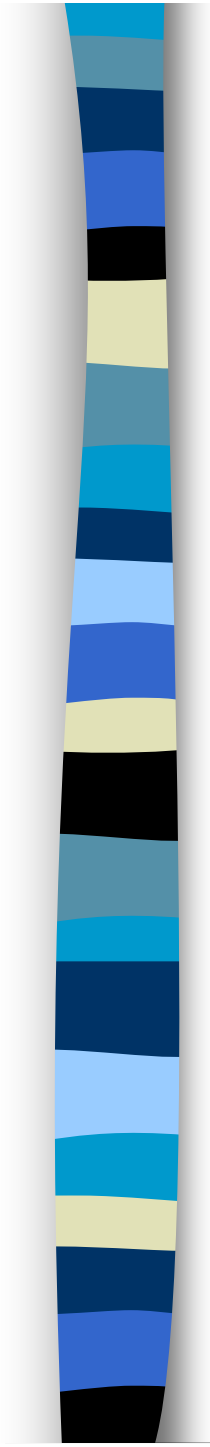
Επειδή κάθε φυγόκεντρος, λόγω κατασκευής, έχει διαφορετική ακτίνα περιστροφής (r) οι βιοχημικοί έχουν καθιερώσει τον όρο της **σχετικής φυγοκέντρου δύναμης (rcf, relative centrifugal force)**, η οποία προκύπτει από τη διαίρεση της Fφυγ με τη βαρυτική δύναμη (F=mg).

rpm (revolution per minute)

«επί τόσες φορές τη δύναμη της βαρύτητας» => 10000 x g

$$rcf = 1,119 \cdot 10^{-5} (\text{rpm})^2 r$$





Φυγοκέντρωση

Επειδή συνήθως τα βιοχημικά πειράματα γίνονται σε διαλύματα, δυο κυρίως δυνάμεις αντιδρούν στην φυγόκεντρο δύναμη.

- η δύναμη της άνωσης, που εκφράζει το υγρό διάλυμα που εκτοπίζουν τα σωματίδια καθώς καθιζάνουν
- η δύναμη της τριβής που δημιουργείται καθώς τα σωματίδια μετατοπίζονται μέσα στο διάλυμα.

$$F_{\text{άνωσης}} = m\omega^2 r V\rho$$

$$F_{\text{τριβής}} = f U$$

m : μάζα του σωματιδίου (g)

ω : γωνιακή ταχύτητα (rad/sec)

r : ακτίνα περιστροφής (cm)

V : μερικός ειδικός όγκος σωματιδίου (cm^3/g)

ρ : πυκνότητα του διαλύματος (g/cm^3)

f : συντελεστής τριβής

$U = dr/dt$: ταχύτητα καταβύθισης (cm/sec)

Η ταχύτητα καταβύθισης εκφράζεται ως η απόσταση που διανύει ένα σωματίδιο κατά μήκος του άξονα περιστροφής στη μονάδα του χρόνου.

Φυγοκέντρωση

Ένα σωματίδιο που καταβυθίζεται κινείται όλο και πιο γρήγορα στο πεδίο της φυγοκέντρωσης έως ότου η δύναμη της φυγοκέντρωσης εξισωθεί με την δύναμη της άνωσης και τη δύναμη της τριβής

$$F = F_{\text{άνωσης}} + F_{\text{τριβής}}$$

$$m\omega^2 r = m\omega^2 r V\rho + f U$$

$$U = dr / dt = m\omega^2 r (1 - V\rho) / f$$

$$U = m\omega^2 r s$$

$$s = (1 - V\rho) / f, \text{ συντελεστής καθίζησης, } 1-10.000 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$$

$$1 \text{ μονάδα Svedberg (S)} = 10^{-13} \text{ sec}$$

Ο συντελεστής καταβύθισης χρησιμοποιείται για να ταξινομήσει τα μακρο-μόρια και τα υπο-κυτταρικά οργανίδια ανάλογα το μέγεθος τους :

Πρωτεΐνες: 1-20 S

Νουκλεϊκά οξέα : 4 –100 S

Υποκυτταρικοί σχηματισμοί: 30-500 S

Φυγοκέντρηση

Η φυγόκεντρος αποτελείται από:

- τη συσκευή που περιέχει το ηλεκτρικό μοτέρ και τον άξονα περιστροφής

α)



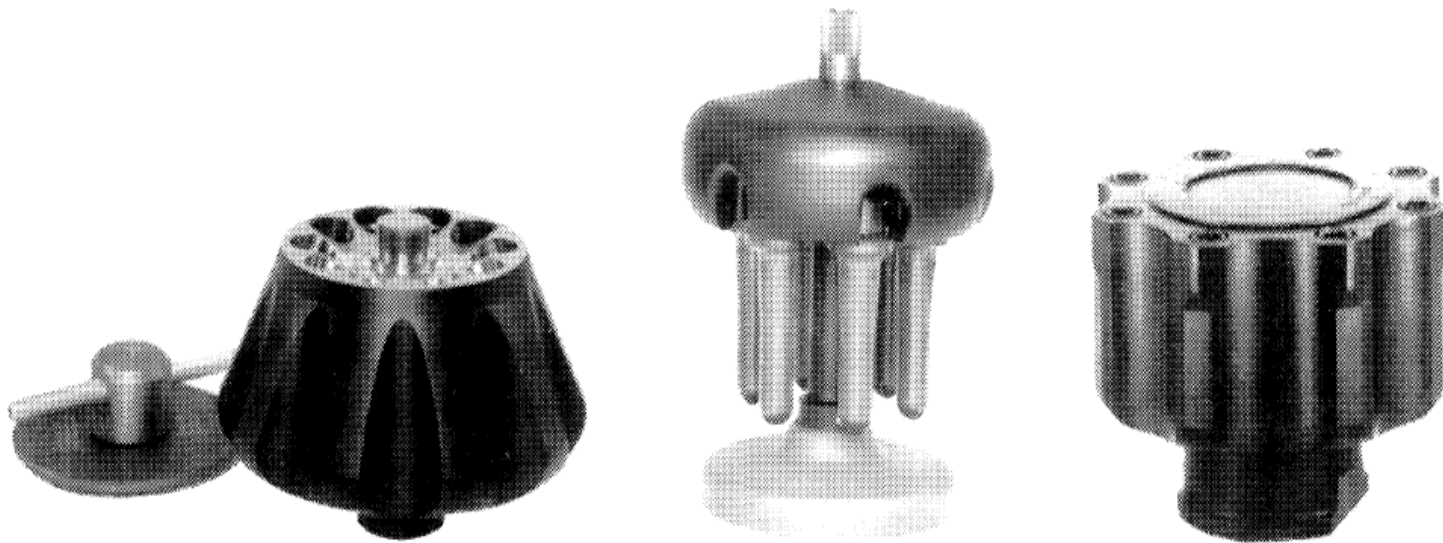
β)



Φυγοκέντρωση

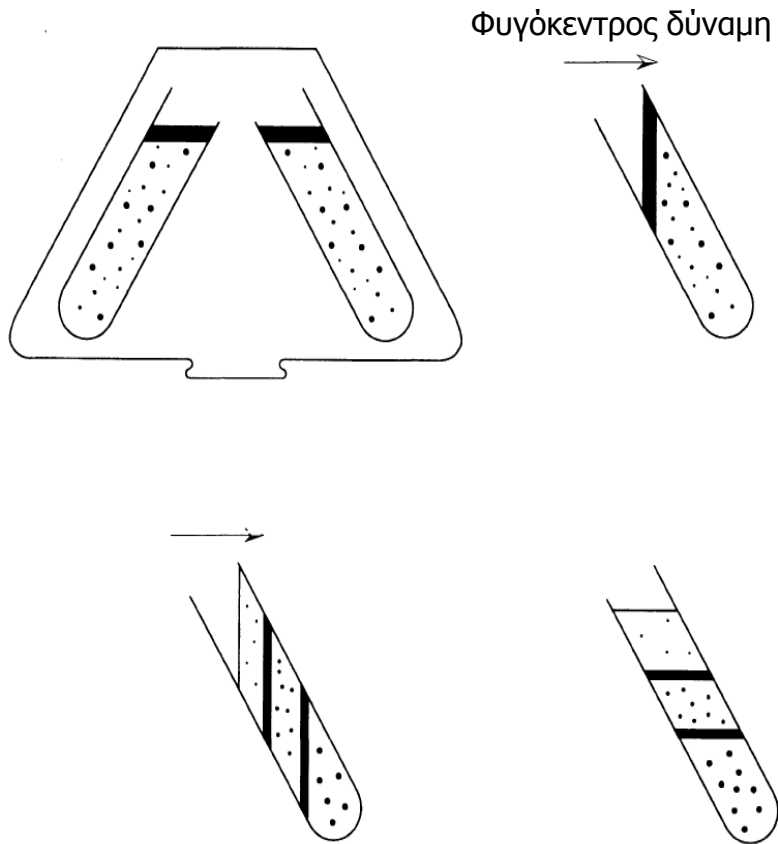
Η φυγόκεντρος αποτελείται από:

- το ρότορα
σταθερής γωνίας (fixed angle)
αιωρούμενων υποδοχέων (swinging-bucket)

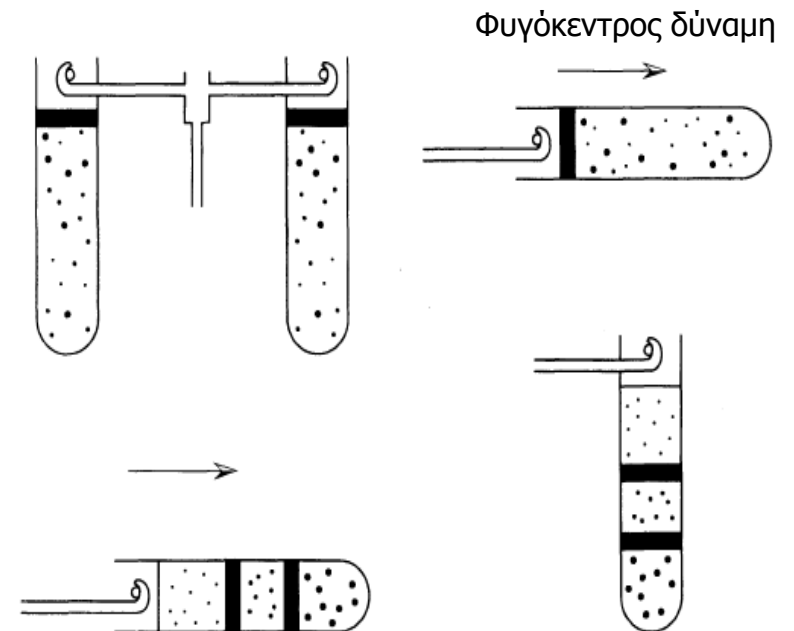


Φυγοκέντρωση

Σταθερής γωνίας (fixed angle)

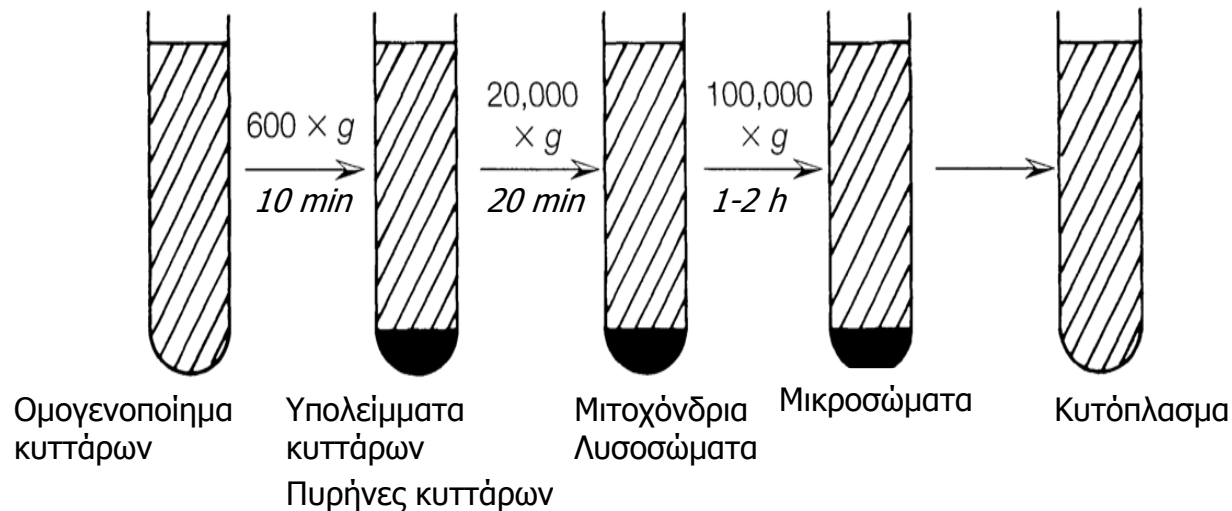


Αιωρούμενων υποδοχέων (swinging-bucket)



Φυγοκέντρωση-Εφαρμογές

- Μέθοδο διαχωρισμού στερεού από υγρό
- Παρασκευαστική κλίμακα (διαφορική φυγοκέντρωση)
- Αναλυτική φυγοκέντρωση (υπολογισμός MB , και S)



Φυγοκέντρωση-Εφαρμογές

- Διαφορική φυγοκέντρωση
- Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας (Φυγοκέντρωση ζώνης, Φυγοκέντρωση εξισορρόπησης)

