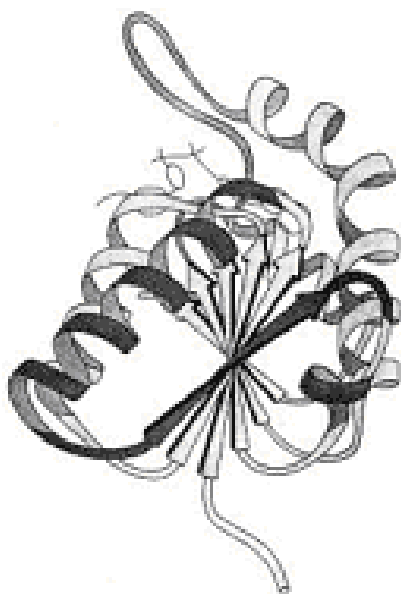


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΟΣ Ι – ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ



Τζώρτζης Νομικός
Λέκτορας

Ελισάβετ Φραγκοπούλου
Λέκτορας

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα, 2008

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

Τζώρτζης Νομικός
Λέκτορας

Ελισάβετ Φραγκοπούλου
Λέκτορας

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα, 2008



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Το παρόν σύγγραμμα συγχρηματοδοτήθηκε από την Ε.Ε. μέσω του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ «Αναμόρφωση Προπτυχιακών Προγραμμάτων Σπουδών Χαροκοπείου Πανεπιστημίου».

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημείας (Ανάλυση Βιομορίων) έχουν ως σκοπό να αποτελέσουν το απαραίτητο διδακτικό βοήθημα για τους φοιτητές του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου στο πλαίσιο, κυρίως, των Εργαστηρίων Βιοχημείας Ι αλλά και Βιοχημείας ΙΙ. Ωστόσο, οι σημειώσεις αυτές είναι γραμμένες με τέτοιο τρόπο ώστε να απευθύνονται και σε ένα ευρύτερο κοινό (φοιτητικό και εκπαιδευτικό) που σχετίζεται με τις Βιοεπιστήμες.

Η συγγραφή αυτών των σημειώσεων είναι επακόλουθο μίας γενικότερης αναδιαμόρφωσης των εργαστηριακών ασκήσεων της Βιοχημείας Ι και της ανάγκης ύπαρξης ενός ενιαίου συγγράματος που θα υποστηρίξει αυτές τις ασκήσεις. Δεδομένου ότι το μάθημα της Βιοχημείας Ι εστιάζεται στη δομή των τριών κύριων τάξεων βιομορίων (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιποειδή), οι ασκήσεις που περιέχονται στο συγκεκριμένο σύγγραμμα σχεδιάστηκαν ώστε να συμβαδίζουν με το θεωρητικό υπόβαθρο του μαθήματος.

Το σύγγραμμα αποτελείται από τρία μέρη. Το πρώτο μέρος περιγράφει τις βασικές εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε ένα βιοχημικό εργαστήριο με σκοπό τη γνώση του θεωρητικού υποβάθρου των τεχνικών αυτών από το φοιτητή. Στο δεύτερο μέρος περιγράφονται οι βασικές αρχές ανάλυσης των πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιποειδών με σκοπό να αποκτήσει ο φοιτητής μία σφαιρική εικόνα του τρόπου με τον οποίο μελετώνται αυτά τα βιομόρια σε πειραματικό επίπεδο. Το τρίτο μέρος περιλαμβάνει την αναλυτική περιγραφή (πρωτόκολλα) των εργαστηριακών ασκήσεων στις οποίες θα ασκηθεί ο φοιτητής. Στο τέλος κάθε άσκησης περιλαμβάνονται κατευθύνσεις για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και ερωτήσεις που έχουν ως σκοπό να αναπτύξουν το κριτικό πνεύμα του φοιτητή.

Ολοκληρώνοντας το πρόλογο αυτό, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Σμαραγδή Αντωνοπούλου για την ηθική της συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την συγγραφή αυτών των σημειώσεων, τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο για τις καίριες υποδείξεις του και τη συνεχή υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μας σταδιοδρομίας και τον επιστημονικό συνεργάτη του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής κ. Χαράλαμπο Καραντώνη για την βοήθεια του στη διαμόρφωση του συγκεκριμένου συγγράματος.

Οι συγγραφείς,

Τζώρτζης Νομικός

Ελισάβετ Φραγκοπούλου

*Αθήνα
Ιούλιος 2008*

Περιεχόμενα

Μέρος Α. Βασικές εργαστηριακές τεχνικές

Κεφάλαιο 1. Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους	2
1.1. Εισαγωγή	2
1.2. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία	2
1.3. Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας-ύλης	3
1.4. Τα χρώματα των χημικών ενώσεων	5
1.5. Βασικές αρχές φασματοφωτομετρίας	6
1.5.1. Απορρόφηση-Διαπερατότητα	6
1.5.2. Νόμος Lambert-Beer	6
1.6. Το φασματοφωτόμετρο	7
1.6.1. Περιγραφή φασματοφωτομέτρου	7
1.6.2. Τύποι φασματοφωτομέτρων	9
1.7. Εφαρμογές φασματοφωτομετρίας	10
1.7.1. Φάσμα απορρόφησης – Φασματοφωτομετρική ταυτοποίηση ουσιών	10
1.7.2. Φάσματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος	11
Κεφάλαιο 2. Φυγοκέντρωση	13
2.1. Εισαγωγή	13
2.2. Βασικές αρχές φυγοκέντρωσης	13
2.3. Η φυγόκεντρος	15
2.3.1 Περιγραφή φυγοκέντρου	15
2.3.2. Τύποι φυγοκέντρου	16
2.4. Τεχνικές της φυγοκέντρωσης	16
2.4.1 Διαφορική φυγοκέντρωση	17
2.4.2 Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας	18
2.5 Βασικοί κανόνες χρήσης φυγοκέντρου	19
Κεφάλαιο 3. Εκχύλιση	21
3.1. Εισαγωγή	21
3.2. Θεωρία εκχύλισης	21
3.3. Προϋποθέσεις εκχυλιστικού μέσου	24
3.4. Τεχνικές εκχύλισης	24
3.5. Διαδικασία εκχύλισης	25
Κεφάλαιο 4. Χρωματογραφία	26
4.1. Εισαγωγή	26
4.2. Κατάταξη των χρωματογραφικών τεχνικών	27
4.2.1. Με βάση το είδος της κινητής και της στατικής φάσης	27
4.2.2. Με βάση τη μορφή της στατικής φάσης	27
4.2.3. Με βάση το είδος αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα	28
4.3. Επίπεδη χρωματογραφία	29
4.3.1. Στατική φάση	30

4.3.2. Κινητή φάση	31
4.3.3. Διαδικασία ανάπτυξης	31
4.3.4. Θεωρία διαχωρισμού	32
4.3.5. Ανίχνευση	32
4.3.6. Ποιοτική ανάλυση των κηλίδων	33
4.3.7. Ποσοτική ανάλυση των κηλίδων	34
4.3.8. Παραλαβή συστατικών	34
4.4. Χρωματογραφία στήλης	34
4.4.1. Χρωματογραφία κατανομής / προσρόφησης	34
4.4.2. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής	35
4.4.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	37
4.4.4. Χρωματογραφία χημικής συγγένειας	39
4.4.5. Χρωματογραφία ανοικτής στήλης	40
4.4.6. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	42
4.4.7. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κορυφών στη χρωματογραφία στήλης	44
4.5. Αέρια χρωματογραφία	45
Κεφάλαιο 5. Ηλεκτροφόρηση	46
5.1. Εισαγωγή	46
5.2. Ηλεκτροφορητική ικανότητα φορτισμένου σωματιδίου	46
5.3. Τεχνικές ηλεκτροφόρησης	47
5.3.1 Ηλεκτροφόρηση επί χάρτου	47
5.3.2 Ηλεκτροφόρηση πηκτής	47
5.3.2.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	48
5.3.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	50
5.3.3 Ισοηλεκτρική εστίαση	50
5.3.4 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων	51
5.4. Ανίχνευση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους	52
5.4.1. Ανίχνευση με χρωστικές	52
5.4.2. Τεχνικές αποτύπωσης	53

Μέρος Β. Ανάλυση Βιομορίων

Κεφάλαιο 6. Ανάλυση πρωτεϊνών	55
6.1. Εισαγωγή	55
6.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από τα βιολογικά δείγματα	55
6.3. Μέθοδοι προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης	56
6.3.1 Προσδιορισμός αζώτου ολικής πρωτεΐνης	56
6.3.2 Μέθοδος διουρίας	56
6.3.3 Αντίδραση αρωματικών αμινοξέων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	57
6.3.4 Απορρόφηση πρωτεϊνών στο υπεριώδες	57
6.3.5 Σύνδεση πρωτεϊνών με χρωστικές	57
6.4. Μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών	58
6.4.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών	59
6.4.2 Διαπίδυση	59

6.4.3 Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας	60
6.4.4 Χρωματογραφία	60
6.4.5 Ηλεκτροφόρηση	61
6.5. Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών	61
6.5.1 Εύρεση MB πρωτεΐνης	61
6.5.2 Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεΐνης	63
6.5.3 Εύρεση πρωτοταγούς δομής μίας πρωτεΐνης	63
6.5.4 Εύρεση τριτοταγούς δομής πρωτεΐνης	65
6.5.5 Εύρεση τεταρτοταγούς δομής πρωτεΐνης	65
6.6. Οι ανοσοχημικές τεχνικές στην υπηρεσία της ανάλυσης πρωτεϊνών	66
 Κεφάλαιο 7. Ανάλυση λιποειδών	69
7.1. Εισαγωγή	69
7.2. Μέθοδοι παραλαβής λιποειδών	69
7.3. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού λιποειδών	70
7.3.1. Προσδιορισμός φωσφολιποειδών	71
7.3.2. Προσδιορισμός γλυκολιποειδών	71
7.3.3. Προσδιορισμός ακυλογλυκερολών	71
7.3.4. Προσδιορισμός χοληστερόλης	72
7.3.5. Προσδιορισμός εστερικών δεσμών	73
7.3.6. Ολικά λιπαρά οξέα	73
7.4. Μέθοδοι διαχωρισμού λιποειδών	73
7.4.1. Μέθοδοι καταβύθισης	74
7.4.2. Μέθοδοι εκχύλισης	74
7.4.3. Χρωματογραφία ανοικτής στήλης	75
7.4.4. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)	75
7.4.5. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, (HPLC)	76
7.4.6. Αέριος χρωματογραφία (GC)	77
7.5. Χαρακτηρισμός λιποειδών	78
7.5.1. Χρωματογραφική συμπεριφορά	78
7.5.2. Χημικοί προσδιορισμοί	78
7.5.3. Υδρόλυση λιποειδών	79
7.5.4. Φασματοσκοπικές τεχνικές	79
7.5.4.1. Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV-Vis)	79
7.5.4.2. Φασματοσκοπία μάζας (MS)	79
7.5.4.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	80
 Κεφάλαιο 8. Ανάλυση υδατανθράκων	81
8.1. Εισαγωγή	81
8.2. Μέθοδοι παραλαβής υδατανθράκων	81
8.3. Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού υδατανθράκων	82
8.3.1. Χημικές μέθοδοι	82
8.3.1.1. Αναγωγικές αντιδράσεις	82
8.3.1.2. Αντιδράσεις με οξύ και φαινόλη	82
8.3.1.3. Αντιδράσεις με αμίνες	83
8.3.2. Ενζυμικές μέθοδοι	83

8.4. Μέθοδοι διαχωρισμού υδατανθράκων	84
8.4.1. Διαχωρισμός βάσει της διαλυτότητας	84
8.4.2. Χρωματογραφία	84
8.4.2.1 Χρωματογραφία χάρτου και TLC	84
8.4.2.2. Χρωματογραφία στήλης	85
8.4.2.3. Αέρια χρωματογραφία	85
8.4.2.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	85
8.5. Χαρακτηρισμός υδατανθράκων	86
8.5.1. Πολωσιμετρία	86
8.5.2. Προσδιορισμός του τελικού σακχάρου	86
8.5.3. Προσδιορισμός της θέσης του γλυκοζιτικού δεσμού	87
8.5.4. Οξείδωση με υπερϊώδικό οξύ	87
8.5.5. Αντίδραση με ιώδιο	87
8.5.6. Προσδιορισμός του είδους του γλυκοζιτικού δεσμού και της αλληλουχίας των σακχάρων	87
8.5.7. Φασματοσκοπικές μέθοδοι	88

Μέρος Γ. Εργαστηριακές ασκήσεις

Εργαστηριακές ασκήσεις φασματοφωτομετρίας

Εργαστηριακή άσκηση 1: Ποιοτική ανάλυση της π-νιτροφαινόλης	91
Εργαστηριακή άσκηση 2: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος της π- νιτροφαινόλης	95

Εργαστηριακές ασκήσεις πρωτεϊνών

Εργαστηριακή άσκηση 3: Απομόνωση μυοσίνης από μυς μοσχαριού	99
Εργαστηριακή άσκηση 4: Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry	101
Εργαστηριακή άσκηση 5: Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές αντιδράσεις	104
Εργαστηριακή άσκηση 6: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	109

Εργαστηριακές ασκήσεις λιποειδών

Εργαστηριακή άσκηση 7: Εκχύλιση λιποειδών με τη μέθοδο Bligh-Dyer	114
Εργαστηριακή άσκηση 8: Διαχωρισμός ουδέτερων-πολικών λιποειδών με κατανομή κατά αντίρροη	116
Εργαστηριακή άσκηση 9: Προσδιορισμός λιποειδικού φωσφόρου	118
Εργαστηριακή άσκηση 10: Διαχωρισμός λιποειδών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	121

Εργαστηριακές ασκήσεις υδατανθράκων

Εργαστηριακή άσκηση 11: Ενζυμική και χημική υδρόλυση υδατανθράκων	125
Εργαστηριακή άσκηση 12: Διαχωρισμός υδατανθράκων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	127

Παράρτημα 1	130
Παράρτημα 2	131
Παράρτημα 3	132
Παράρτημα 4	133
Παράρτημα 5	132

ΜΕΡΟΣ Α

ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Η φασματοφωτομετρία ανήκει στις οπτικές μεθόδους ανάλυσης. Οι οπτικές μέθοδοι ανάλυσης περιλαμβάνουν τις μεθόδους, στις οποίες μετριέται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία πηγάζει από την ύλη ή αλληλεπιδρά με αυτή και υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: α) τις *φασματοσκοπικές μεθόδους*, οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να απορροφούν ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων και στη μέτρηση της απορρόφησης αυτής ή στη καταγραφή φασμάτων (μήκους κύματος και ισχύος της ακτινοβολίας), β) στις *μη φασματοσκοπικές μεθόδους*, οι οποίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης, η οποία συνεπάγεται αλλαγή στη διεύθυνση ή στις φυσικές ιδιότητες της ακτινοβολίας. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στην ποσοτική ανάλυση και το φασματοφωτόμετρο αποτελεί, μαζί με τον αναλυτικό ζυγό, το πιο διαδεδομένο όργανο, σε ένα οποιοδήποτε αναλυτικό εργαστήριο, συμπεριλαμβανομένου του εργαστηρίου βιοχημείας.

1.2 Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες προσπαθούσαν να εξηγήσουν τη φύση του φωτός και γενικότερα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Αρχικά, ο James Clerk Maxwell, το 1873, πρότεινε ότι το φως είναι ένα διαδιδόμενο ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το οποίο αποτελείται από ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο και ένα ταλαντούμενο μαγνητικό πεδίο, τα οποία ταλαντώνονται κάθετα μεταξύ τους και κάθετα στη διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (λ) είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κορυφών του κύματος, ενώ η συχνότητα (ν) είναι ο αριθμός των κυμάτων που διέρχονται από συγκεκριμένο σημείο στη μονάδα του χρόνου (Σχήμα 1.1). Οι δύο αυτές σταθερές είναι αντιστρόφως ανάλογες και το γινόμενο τους ισούται με την ταχύτητα του φωτός (Εξίσωση 1.1).

Εξίσωση 1.1. Ταχύτητα διάδοσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

$$c = \lambda \nu$$

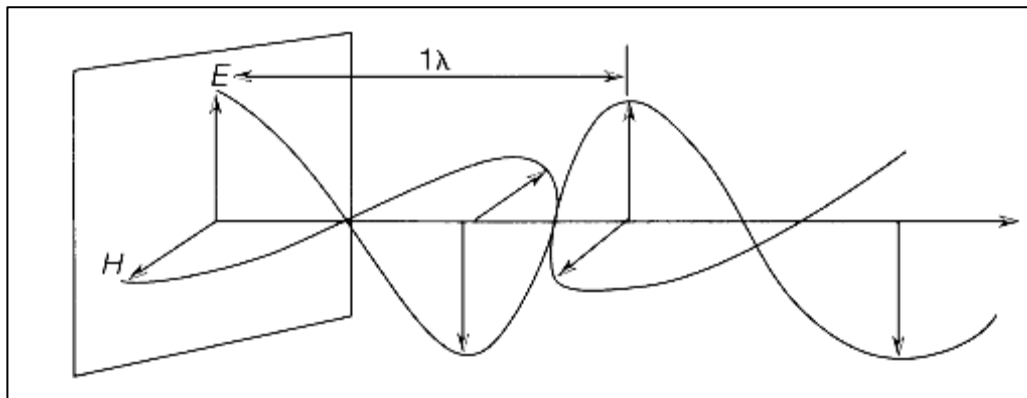
c : ταχύτητα φωτός (299.792 m/s)

λ : μήκος κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (μονάδες: m ή υποπολλαπλάσια αυτού)

ν : συχνότητα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (μονάδες: s^{-1})

Για πολλά χρόνια η θεωρία του Maxwell ήταν ικανοποιητική, αποδείχτηκε όμως ότι δε μπορούσε να εξηγήσει φαινόμενα που σχετίζονταν με την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης. Τα πρόβληματα λύθηκαν με την πρωτοποριακή θεωρία που πρότεινε αρχικά ο Max Planck το 1900, η οποία αναπτύχθηκε στη συνέχεια από τον Albert Einstein και άλλους φυσικούς. Η θεωρία αυτή υποστήριζε ότι το φως έχει και σωματιδιακή φύση και ότι η εκπομπή ή απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, από κάποια πηγή, δε γίνεται συνεχόμενα, αλλά κβαντισμένα, υπό τη μορφή διακριτών μονάδων ενέργειας, που λέγονται φωτόνια. Τα φωτόνια έχουν και κυματική και σωματιδιακή φύση και

η ενέργεια τους δίνεται από την εξίσωση 1.2. Είναι προφανές ότι όσο μικρότερο είναι το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ή όσο μεγαλύτερη η συχνότητα της, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ενέργεια της. Από μία πηγή φωτός εκπέμπονται εκατομμύρια φωτόνια ανά δευτερόλεπτο γι'αυτό και αντιλαμβανόμαστε το φως ως συνεχή ακτινοβολία.



Σχήμα 1.1. Το ηλεκτρομαγνητικό κύμα

Εξίσωση 1.2. Ενέργεια φωτονίων

$$E = h \nu = h c / \lambda$$

E: ενέργεια φωτονίου (J)

h: σταθερά Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J s)

Το πλήρες εύρος των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων λέγεται ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Οι ακτινοβολίες με το μικρότερο μήκος κύματος (το λ είναι της τάξης των pm) είναι οι ακτίνες γ, ενώ αυτές με τα μεγαλύτερα μήκη κύματος (το λ είναι της τάξης των m έως και km) είναι τα ραδιοκύματα. Η ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, δηλαδή η περιοχή που αντιλαμβάνεται ο ανθρώπινος οφθαλμός, αποτελεί μία πολύ μικρή περιοχή του φάσματος στα 400-800 nm (Σχήμα 1.2). Πολλές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος είναι χρήσιμες στη βιοχημική ανάλυση συμπεριλαμβανομένων των ακτίνων X (μέχρι 7 nm, κρυσταλλογραφία ακτίνων X), του ορατού-υπεριώδους (180-800 nm, φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους), του υπέρυθρου (1.000-100.000 nm, φασματοσκοπία υπέρυθρου) και των ραδιοκυμάτων (10^6 - 10^{10} nm, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR). Ωστόσο, το κεφάλαιο αυτό ασχολείται αποκλειστικά με την αλληλεπίδραση της ύλης με την ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού.

1.3 Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας-ύλης

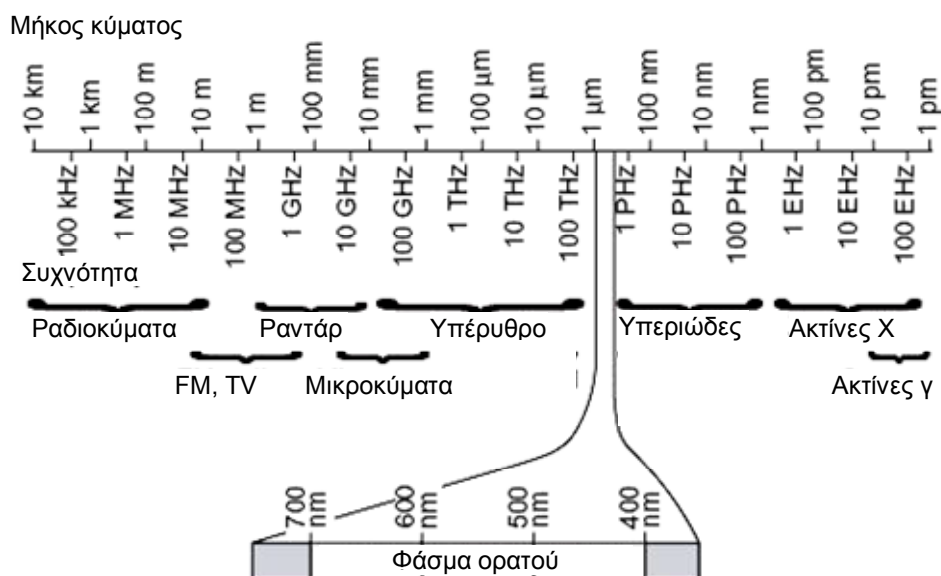
Η συνολική ενέργεια ενός μορίου είναι το άθροισμα της κινητικής του ενέργειας (της ενέργειας που περικλείει λόγω της κίνησης του) και της εσωτερικής του ενέργειας. Η εσωτερική ενέργεια ενός μορίου είναι το άθροισμα τριών κβαντισμένων ενεργειών, της ηλεκτρονιακής του ενέργειας (το άθροισμα της ενέργειας των ηλεκτρονίων του στα διάφορα τροχιακά), της δονητικής του ενέργειας (της ενέργειας που οφείλεται στη ταλάντωση των ατόμων μέσα στο ίδιο το μόριο) και της περιστροφικής του ενέργειας (της ενέργειας που

οφείλεται στη δυναμική ενέργεια των ηλεκτρονίων και τη περιστροφή των μορίων). Η κινητική ενέργεια των μορίων δεν ενδιαφέρει τη φασματοφωτομετρία.

Εξίσωση 1.3. Ενέργεια μορίων

$$1.3.1 \quad E_{\text{μορίου}} = E_{\text{κινητική}} + E_{\text{εσωτερική}}$$

$$1.3.2 \quad E_{\text{εσωτερική}} = E_{\text{ηλεκτρονική}} + E_{\text{δονητική}} + E_{\text{περιστροφική}}$$



Σχήμα 1.2. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέλθει διαμέσου ενός μορίου δύο τουλάχιστον διακριτές διεργασίες μπορούν να προκύψουν. Η μία είναι η σκέδαση της ακτινοβολίας, σύμφωνα με την οποία η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαθλάται ή σκεδάζεται από τα μόρια χωρίς να αλλάξει η συχνότητά της. Η σκέδαση του φωτός αποτελεί τη βάση πολλών μεθόδων χαρακτηρισμού μακρομορίων, όπως η σκέδαση ακτίνων Χ και η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η άλλη διεργασία που μπορεί να προκύψει από την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας-ύλης είναι η απορρόφηση. Στο φαινόμενο της απορρόφησης βασίζεται και η φασματοφωτομετρία.

Όταν πολυχρωματική ακτινοβολία διέλθει διαμέσου ενός μορίου τότε γίνεται εκλεκτική απορρόφηση μέρους αυτής, απορροφούνται δηλαδή μόνο οι ακτινοβολίες, των οποίων τα φωτόνια έχουν ενέργεια ($E=h\nu$) που αντιστοιχεί στις ενεργειακές απαιτήσεις του μορίου προκειμένου τούτο να διεγερθεί από μία κατάσταση χαμηλής εσωτερικής ενέργειας (θεμελιώδη) σε μία κατάσταση υψηλότερης εσωτερικής ενέργειας (διεγερμένη). Ουσιαστικά, με το φαινόμενο της απορρόφησης μεταφέρεται μέρος της ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο μόριο, η οποία οδηγεί στη μεταβατική μετάπτωση του μορίου σε μία υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση.

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας διεγείρει τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στιβάδων (ηλεκτρονίων σθένους), τα οποία μεταπίπτουν σε μοριακά τροχιακά

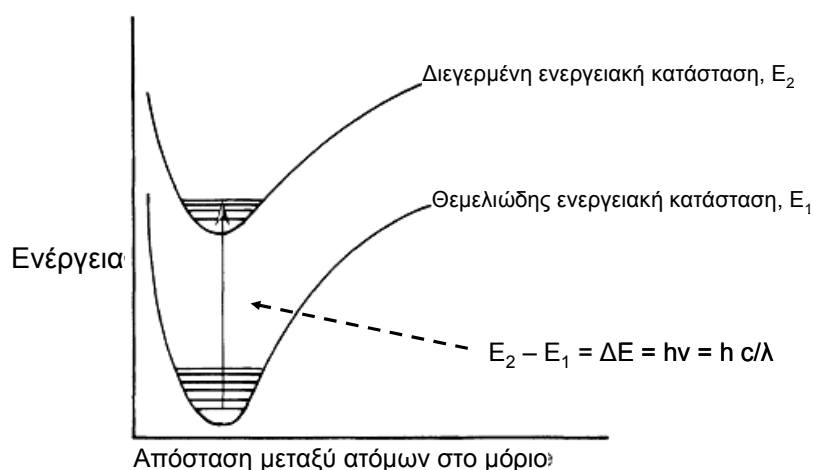
υψηλότερων ενεργειών, οδηγώντας τελικά σε αύξηση της ηλεκτρονιακής ενέργειας ενός μορίου. Για να μπορέσει ένα φωτόνιο να απορροφηθεί από ένα μόριο θα πρέπει η ενέργεια του να αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας ($E_2 - E_1$) μεταξύ δύο ηλεκτρονιακών σταθμών του μορίου (Εξίσωση 1.4, Σχήμα 1.3)

Εξίσωση 1.4. Ενεργειακή συνθήκη απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από μόριο

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

Η απορρόφηση αυτή αποτελεί τη βάση της φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Η απορρόφηση ακτινοβολίας στο εγγύς υπέρυθρο και το υπέρυθρο προκαλεί διεγέρσεις δόνησης και παραμορφώσεως (και συνεπώς αύξηση της δονητικής ενέργειας των μορίων), ενώ απορρόφηση της άπω υπέρυθρου ακτινοβολίας προκαλεί διεγέρσεις περιστροφής των μορίων (και συνεπώς αύξηση της περιστροφικής τους ενέργειας). Τα φάσματα υπέρυθρου χρησιμοποιούνται κυρίως για το προσδιορισμό της δομής οργανικών ενώσεων.

Η διέγερση ενός μορίου με την απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι μεταβατική. Κατά την αποδιέγερση των μορίων, η απορροφηθείσα ενέργεια εκλύεται συνήθως ως θερμότητα αλλά και υπό τη μορφή ακτινοβολίας φθορισμού ή φωσφορισμού.



Σχήμα 1.3. Διέγερση ενός μορίου από την θεμελιώδη σε διεγερμένη κατάσταση με την απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

1.4 Τα χρώματα των χημικών ενώσεων

Για να εμφανίσει μία ένωση χρώμα αρκεί ένα μέρος του φάσματος απορρόφησης της να εισέρχεται στην περιοχή του ορατού. Αυτό σημαίνει ότι απορροφά μία συγκεκριμένη περιοχή του ορατού φάσματος και επιτρέπει τη διόδο από αυτή του υπόλοιπου φάσματος, το οποίο και διακρίνει το ανθρώπινο μάτι. Το χρώμα που εμφανίζεται είναι συμπληρωματικό του απορροφούμενου. Οι χημικές ομάδες που απορροφούν πάνω σε ένα μόριο λέγονται χρωμοφόρες και είναι συνήθως ακόρεστα συζυγιακά συστήματα αλλά και οι αρωματικοί δακτύλιοι. Λευκό εμφανίζεται ένα σώμα, όταν πάνω σε αυτό ανακλάται πλήρως το λευκό φως. Αντίθετα, μαύρο εμφανίζεται ένα σώμα αν το λευκό φως απορροφηθεί πλήρως από αυτό.

Πίνακας 1.1. Περιοχές των απορροφήσεων και της εμφάνισης των χρωμάτων

ν (s^{-1})	λ_{max} (nm)	Απορροφούμενο χρώμα	Συμπληρωματικό χρώμα εμφάνισης
$> \sim 8 \times 10^{14}$	200 - 400	Υπεριώδες	Άχρωμο
$\sim 6,2 \times 10^{14}$	400 - 510	Ιώδες – Κυανούν	Κίτρινο
$\sim 5,6 \times 10^{14}$	510 - 560	Πράσινο	Ερυθρό
$\sim 5,2 \times 10^{14}$	560 - 590	Κίτρινο	Ιώδες
$\sim 4,6 \times 10^{14}$	590 - 750	Ερυθρό	Πράσινο
$< \sim 4,0 \times 10^{14}$	750 - 900	Εγγύς υπέρυθρο	Άχρωμο

1.5 Βασικές αρχές φασματοφωτομετρίας

1.5.1 Απορρόφηση - Διαπερατότητα

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία (ακτινοβολία που αποτελείται από ένα μήκος κύματος) διέλθει διαμέσου διαλύματος, που περιέχει μία απορροφούσα ουσία, η ισχύς της ακτινοβολίας θα ελαττωθεί προοδευτικά, κατά το μήκος της διαδρομής, λόγω απορρόφησης αυτής από την ουσία. Αν I_0 είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τότε η διερχόμενη ακτινοβολία θα έχει ισχύ I , η οποία θα είναι μικρότερη από την I_0 . Ως διαπερατότητα T ενός διαλύματος μίας απορροφούσας ουσίας ορίζεται ο λόγος της ισχύος της διερχόμενης προς την ισχύ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και προφανώς $T \leq 1$. Η διαπερατότητα μπορεί να εκφραστεί και ως επί τοις εκατό (%T) (Εξίσωση 1.5).

Εξίσωση 1.5. Διαπερατότητα

$$T = I/I_0, \%T = (I/I_0) \times 100$$

T : διαπερατότητα

I_0 : ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I : ισχύς διερχόμενης ακτινοβολίας

Ως απορρόφηση A ενός διαλύματος μίας απορροφούσας ουσίας ορίζεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της διαπερατότητας (Εξίσωση 1.6).

Εξίσωση 1.6. Απορρόφηση

$$A = -\log T, A = 2 - \log (\%T)$$

A : απορρόφηση

1.5.2 Νόμος Lambert-Beer

Η μείωση της ισχύος της διερχόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας και από τη διανυθείσα, από τη μονοχρωματική δέσμη, απόσταση εντός του διαλύματος. Η σχέση αυτή εκφράζεται από το νόμο Lambert-Beer, ο οποίος μπορεί να διατυπωθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους (Εξισώσεις 1.7). Χαρακτηριστική σταθερά για κάθε απορροφούσα ένωση είναι η μοριακή απορροφητικότητα της (ϵ). Το ϵ εκφράζει την απορρόφηση διαλύματος συγκέντρωσης 1 M όταν αυτό βρίσκεται σε κυψελίδα πάχους 1 cm. Η μοριακή απορροφητικότητα ϵ εξαρτάται από το μήκος κύματος, το διαλύτη, τη μοριακή δομή της απορροφούσας ουσίας και σε μικρότερο βαθμό από τη θερμοκρασία. Είναι μέτρο της

ικανότητα μίας ένωσης να απορροφά σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της.

Ο νόμος των Lambert-Beer προϋποθέτει ότι: α) ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της διαλυμένης ουσίας είναι η απορρόφηση, β) η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική, γ) η απορρόφηση λαμβάνει χώρα σε όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής και δ) τα απορροφούντα σωματίδια δρουν ανεξάρτητα το ένα με το άλλο και το ένα δεν επηρεάζει την απορρόφηση του άλλου.

Εξίσωση 1.7. Νόμος Lambert-Beer

1.7.1 $I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon C d}$

1.7.2 $T = I/I_0 = 10^{-\epsilon C d} \Rightarrow \log T = -\epsilon C d \Rightarrow -\log T = \epsilon C d$

1.7.3 $A = \epsilon C d$

C : συγκέντρωση απορροφούσας ουσίας (M)

D : μήκος διανυθείσας διαδρομής εντός του διαλύματος ή διαφορετικά το πάχος της κυψελίδας που περιέχει το διάλυμα (cm)

ϵ : μοριακή απορροφητικότητα ($M^{-1} cm^{-1}$).

1.6 Το φασματοφωτόμετρο

1.6.1. Περιγραφή φασματοφωτομέτρου

Τα φασματοφωτόμετρα είναι τα όργανα με τα οποία μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από μία ουσία σε διάλυμα. Η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στην ικανότητα τους να παράγουν μονοχρωματική ακτινοβολία, την οποία και κατευθύνουν πάνω στο δείγμα (το οποίο είναι διάλυμα της απορροφούσας ουσίας και βρίσκεται σε ειδική κυψελίδα) και στη μέτρηση, στη συνέχεια, της έντασης της προσπίπτουσας και εξερχόμενης έντασης της ακτινοβολίας, από τις τιμές των οποίων υπολογίζεται η απορρόφηση ή η διαπερατότητα. Τα φασματοφωτόμετρα ορατού μετρούν απορροφήσεις στην περιοχή ορατού (360-800 nm) και στη περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (800-900 nm). Τα φασματοφωτόμετρα υπεριώδους μετρούν απορροφήσεις στην περιοχή 190-400 nm, αν και πλέον τα σύγχρονα φασματοφωτόμετρα μπορούν να καλύψουν όλη την περιοχή του ορατού και υπεριώδους φάσματος.

Τα βασικά μέρη ενός οποιουδήποτε φασματοφωτομέτρου είναι τα εξής (Σχήμα 1.4) :

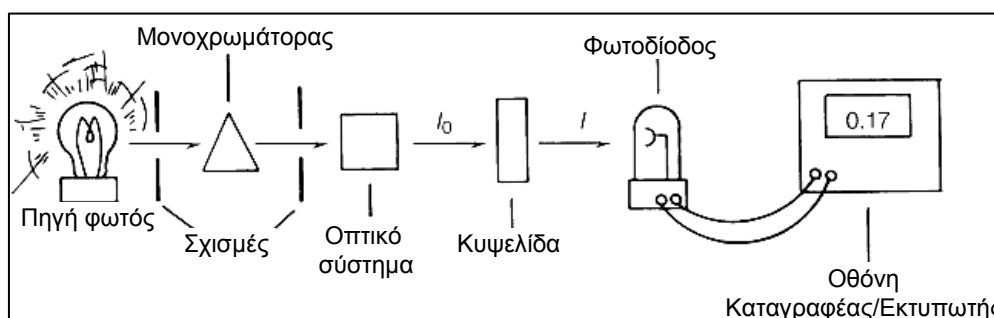
Πηγή ακτινοβολίας: Το είδος της πηγής ακτινοβολίας του φασματοφωτομέτρου εξαρτάται από την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που θα χρησιμοποιηθεί. Η πηγή πρέπει να εκπέμπει ακτινοβολία επαρκούς ισχύος στην επιθυμητή περιοχή του φάσματος και η παραγωγή της ακτινοβολίας να γίνεται με τρόπο αναπαραγώγιμο και ελεγχόμενο. Για την υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιείται η λυχνία εκκενώσεως υδρογόνου (ή δευτερίου) ή η λυχνία ξένου υψηλής πίεσης, οι οποίες εκπέμπουν συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή 160-365 nm. Για την ορατή περιοχή χρησιμοποιείται η λυχνία πυρακτώσεως βολφραμίου, όπου το σώμα που φωτοβολεί είναι σπείραμα από σύρμα βολφραμίου, το οποίο βρίσκεται σε γυάλινο δοχείο και πυρακτώνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία καλύπτει την περιοχή 340-3000 nm. Για την υπέρυθρη περιοχή χρησιμοποιείται ο πυρακτωτής Nernst, ο

οποίος είναι λυχνία πυρακτώσεως με σπείραμα από οξείδια σπάνιων γαιών και καλύπτει τη περιοχή από 0,4-20 μm .

Επιλογέας μήκους κύματος: Ο επιλογέας μήκους κύματος έχει ως σκοπό την απομόνωση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από το σύνολο του φάσματος που εκπέμπει η πηγή ακτινοβολίας. Αυτό επιτυγχάνεται, είτε με τη βοήθεια οπτικών φίλτρων, καθένα από τα οποία επιτρέπει τη διέλευση στενής περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, είτε με ειδικές διατάξεις που λέγονται μονοχρωμάτορες, οι οποίοι επιτρέπουν τη διέλευση στενότερης περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος σε σχέση με τα φίλτρα. Πρέπει να τονιστεί ότι απόλυτα μονοχρωματικό φως είναι αδύνατο να ληφθεί. Τα βασικά μέρη ενός μονοχρωμάτορα είναι: α) σχισμή εισόδου, η οποία δέχεται τη πολυχρωματική ακτινοβολία και καθορίζει την ισχύ της εισερχόμενης στο μονοχρωμάτορα ακτινοβολίας, β) κατευθυντήρας (φακός ή κάτοπτρο) δια του οποίου η δέσμη καθίσταται παράλληλη, γ) διασπείρον στοιχείο (πρίσμα ή φράγμα περίθλασης), με την περιστροφή του οποίου επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος, δ) συγκεντρωτικός φακός, ε) σχισμή εξόδου, η οποία επιτρέπει την έξοδο από το μονοχρωμάτορα στενής ταινίας της αναλυθείσας δέσμης. Η σχισμή αυτή ρυθμίζει ουσιαστικά την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I_0 , στο διάλυμα.

Κυψελίδες: Στην κυψελίδα τοποθετείται το προς μέτρηση διάλυμα και αυτή τοποθετείται με τη σειρά της σε ειδική υποδοχή του οργάνου. Οι κυψελίδες είναι, είτε κυλινδρικής, είτε τετράγωνης διατομής. Το υλικό κατασκευής των κυψελίδων ποικίλλει ανάλογα τη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, διότι πρέπει να επιτρέπει τη διόδο της αντίστοιχης ακτινοβολίας. Για τις μετρήσεις στην περιοχή του ορατού χρησιμοποιούνται κυψελίδες από κοινό γυαλί ή διαφανές πλαστικό, ενώ για τις μετρήσεις στο υπεριώδες χρησιμοποιούνται κυψελίδες χαλάζι ή από ειδικό πλαστικό, αφού το κοινό γυαλί απορροφά σε μερικές περιοχές του υπεριώδους.

Ανιχνευτές: Οι ανιχνευτές μετατρέπουν, το εξερχόμενο από τη κυψελίδα, μονοχρωματικό φως σε ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε απορρόφηση ή διαπερατότητα από τα ολοκληρωμένα κυκλώματα του οργάνου. Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι είτε φωτοβολταϊκά κύτταρα, είτε σωλήνες κενού, είτε φωτοπολλαπλασιαστές (επικρατέστεροι). Οι φωτοπολλαπλασιαστές ανιχνεύουν μία μικρή ποσότητα φωτεινής ενέργειας ή οποία προσπίπτει σε φωτοευαίσθητη επιφάνεια από την οποία εξέρχονται ηλεκτρόνια, τα οποία κινούνται προς μία άνοδο με τη βοήθεια εξωτερικά εφαρμοζόμενης τάσης. Το αρχικά μικρό ρεύμα που προκύπτει ενισχύεται μέχρι και 100.000 φορές από την παρουσία βοηθητικών ηλεκτροδίων που λέγονται δύνοδοι.



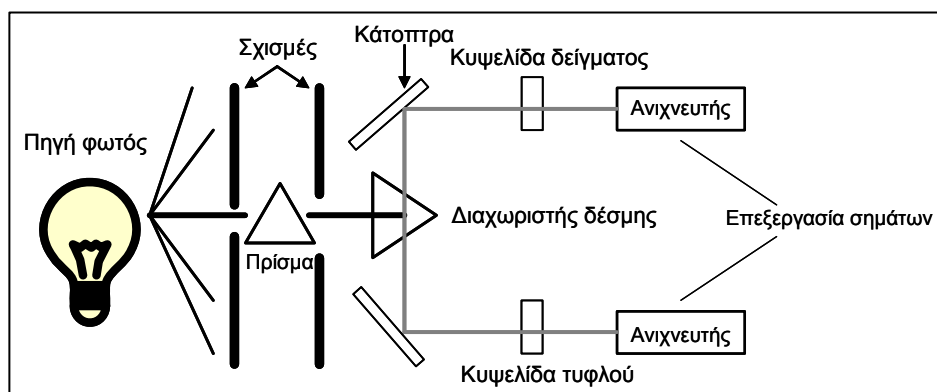
Σχήμα 1.4. Το φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης

Όργανο ανάγνωσης και καταγραφής των μετρήσεων: Όλα τα φασματοφωτόμετρα έχουν οθόνη, αναλογική ή ψηφιακή, η οποία εμφανίζει τις μετρήσεις της απορρόφησης ή διαπερατότητας. Τα σύγχρονα φασματοφωτόμετρα είναι πλέον συνδεδεμένα ή έχουν ενσωματωμένους ηλεκτρονικούς υπολογιστές, μέσω των οποίων μπορεί να επιλεγούν οι παράμετροι της μέτρησης και να γίνει η επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

1.6.2. Τύποι φασματοφωτομέτρων

Η μέτρηση της απορρόφησης ενός διαλύματος είναι πάντα σχετική, απαιτείται δηλαδή η σύγκριση της απορρόφησης του διαλύματος μίας απορροφούσας ουσίας με την απορρόφηση τυφλού διαλύματος, που περιέχει ό,τι και το διάλυμα της απορροφούσας ουσίας εκτός από την απορροφούσα ουσία. Με αυτό τον τρόπο αφαιρείται από την απορρόφηση του διαλύματος η απορρόφηση που οφείλεται στα μόρια του διαλύτη και έτσι προκύπτει μία τιμή απορρόφησης, η οποία οφείλεται αποκλειστικά στα μόρια της απορροφούσας διαλυμένης ουσίας. Ανάλογα τον τρόπο με τον οποίο μετρείται και αφαιρείται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος από την απορρόφηση του δείγματος τα φασματοφωτόμετρα διακρίνονται στα φασματοφωτόμετρα απλής ή διπλής δέσμης.

Στα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης υπάρχει μόνο μία οπτική διαδρομή και μία θέση εισαγωγής της κυψελίδας, συνεπώς για να γίνει η μέτρηση της απορρόφησης πρέπει πρώτα να εισαχθεί η κυψελίδα του τυφλού διαλύματος και στη συνέχεια η κυψελίδα του δείγματος. Τα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης είναι κατάλληλα για ποσοτική ανάλυση, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος αλλά θεωρούνται δύσχρηστα για την ποιοτική ανάλυση ενός δείγματος, όπου απαιτείται η μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικά μήκη κύματος.



Σχήμα 1.5. Το φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-άμεσης ανάγνωσης

Τα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης έχουν δύο υποδοχές, μία για την κυψελίδα του τυφλού διαλύματος και μία για την κυψελίδα του δείγματος. Η ακτινοβολία από την πηγή, μετά τη διόδο της από το μονοχρωμάτορα, διχάζεται σε δύο δέσμες, μία για το διάλυμα του δείγματος και μία για το τυφλό διάλυμα. Ο διχασμός της αρχικής δέσμης μπορεί να γίνει είτε στο χώρο, σε δύο ίσες δέσμες, με τη βοήθεια συστήματος κατόπτρων (φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-άμεσης ανάγνωσης, Σχήμα 1.5), είτε στο χρόνο με τη βοήθεια τεμαχιστή της δέσμης (φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης-οπτικού μηδενισμού). Ο ανιχνευτής του οργάνου αφαιρεί αυτόματα την τιμή της απορρόφησης του τυφλού διαλύματος από αυτήν του δείγματος και τελικά στην οθόνη του οργάνου λαμβάνεται μόνο η ένδειξη της απορρόφησης

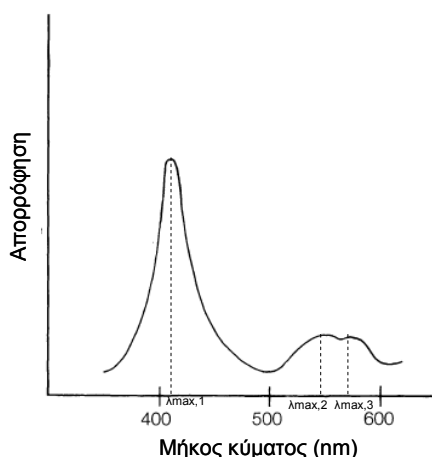
που αναφέρεται στην απορροφούσα ουσία του δείγματος. Με αυτόν το τρόπο αποφεύγονται οι δύο φωτομετρήσεις, μία για το τυφλό διάλυμα και μία για το δείγμα και με ένα μόνο τυφλό διάλυμα στην αντίστοιχη υποδοχή μπορούν να φωτομετρηθούν ταυτόχρονα πολλά δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ή να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης.

1.7 Εφαρμογές φασματοφωτομετρίας

Όλες οι εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας μπορούν να συνοψιστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) μέτρηση της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος (λήψη φασμάτων απορρόφησης), η οποία δίνει πληροφορίες για την ταυτότητα μίας ουσίας σε ένα διάλυμα, β) μέτρηση της απορρόφησης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, η οποία βρίσκει εφαρμογές στο προσδιορισμό της συγκέντωσης μίας ουσίας σε ένα διάλυμα

1.7.1. Φάσμα απορρόφησης – Φασματοφωτομετρική ταυτοποίηση ουσιών

Το φάσμα απορρόφησης ενός διαλύματος μίας απορροφούσας ουσίας είναι το διάγραμμα της απορρόφησης του διαλύματος σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ($A = f(\lambda)$, Σχήμα 1.6). Τέτοια διαγράμματα μπορούν να κατασκευαστούν, τόσο με τα φασματοφωτόμετρα απλής όσο και διπλής δέσμης.



Σχήμα 1.6. *Τυπικό φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης*

Από τη στιγμή που ένα μόριο μπορεί να απορροφήσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συγκεκριμένης μόνο ενέργειας (άρα και μήκους κύματος, Εξίσωση 1.4) θα ανέμενε κανείς ότι το φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης θα αποτελούνταν από στενές φασματικές γραμμές σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Επειδή όμως κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη ενέργειας αποτελείται από πολλές δονητικές στάθμες, αυξάνουν οι ενεργειακά επιτρεπτές μεταπτώσεις με αποτέλεσμα το φάσμα απορρόφησης μίας ένωσης να χαρακτηρίζεται από ευρείες κορυφές. Η κάθε τέτοια κορυφή εμφανίζει ένα $\lambda_{\max}$, το μήκος κύματος δηλαδή στο οποίο εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση. Τα $\lambda_{\max}$ κάθε ένωσης είναι χαρακτηριστικές, για τη δομή της, σταθερές και συγκεκριμένα για τις χρωμοφόρες χημικές ομάδες που περιέχει στο μόριο της (Πίνακας 1.2). Πρέπει να τονιστεί ότι από τα φάσματα απορρόφησης λαμβάνονται πληροφορίες για τις χημικές ομάδες που περιέχει ένα μόριο και σε καμία περίπτωση δε μπορούν να οδηγήσουν στην πλήρη ταυτοποίηση της δομής μίας άγνωστης ένωσης.

Πίνακας 1.2. Χαρακτηριστικές χρωμοφόρες ομάδες και τα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν

Χρωμοφόρο	Ένωση	Μετάπτωση	λ	ϵ
C=O	Aldehyde/Ketone	$n \rightarrow \sigma^*$	166	16000
		$\pi \rightarrow \pi^*$	189	900
		$n \rightarrow \pi^*$	270	10-20
C=O	Carboxylic acid	$n \rightarrow \pi^*$	200	50
C=O	Carboxylate	$n \rightarrow \pi^*$	210	150
C=O	Ester	$n \rightarrow \pi^*$	210	50
C=O	Amide	$n \rightarrow \pi^*$	205	200
C=N	$(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{NH}$	$n \rightarrow \pi^*$	265	15
C $\equiv$ N	$\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$	$\pi \rightarrow \pi^*$	<170	
N=N	Me-N=N-Me	$n \rightarrow \pi^*$	350-370	15
N=O	Me ₃ NO	$n \rightarrow \pi^*$	300	100

1.7.2. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος βασίζεται στο νόμο Lambert-Beer.

Σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer η απορρόφηση μίας ένωσης σε ένα διάλυμα, όταν σε αυτό προσπέσει μονοχρωματική ακτινοβολία, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της. Βάση αυτής της σχέσης η συγκέντρωση μπορεί να προσδιοριστεί με δύο δυνατούς τρόπους. Αν είναι γνωστή η μοριακή απορροφητικότητα της ένωσης τότε η συγκέντρωση της ένωσης μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και επιλύοντας την εξίσωση 7.3 ως προς τη συγκέντρωση, δηλαδή: $C = A/\epsilon d$. Το ϵ πρέπει να έχει προσδιοριστεί στις ίδιες συνθήκες μέτρησης της A.

Αν ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας δεν είναι γνωστός τότε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αγνώστου διαλύματος μπορεί να γίνει συγκρίνοντας την απορρόφηση του με την απορρόφηση προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η συγκριτική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης μπορεί με τη σειρά της να επιτευχθεί με δύο τρόπους :

α) Κατασκευάζεται πρότυπο διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (C_p) και μετρίεται η απορρόφηση του (A_p) σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Μετρίεται και η απορρόφηση (A_x) του διαλύματος άγνωστης συγκέντρωσης (C_x) στο ίδιο μήκος κύματος. Βάσει των παρακάτω σχέσεων μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση (C_x) του προς προσδιορισμού διαλύματος.

Εξίσωση 1.8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αγνώστου διαλύματος με σύγκριση της απορρόφησης του με αυτή διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης

1.8.1 $A_p = \epsilon d C_p$

1.8.2 $A_x = \epsilon d C_x$

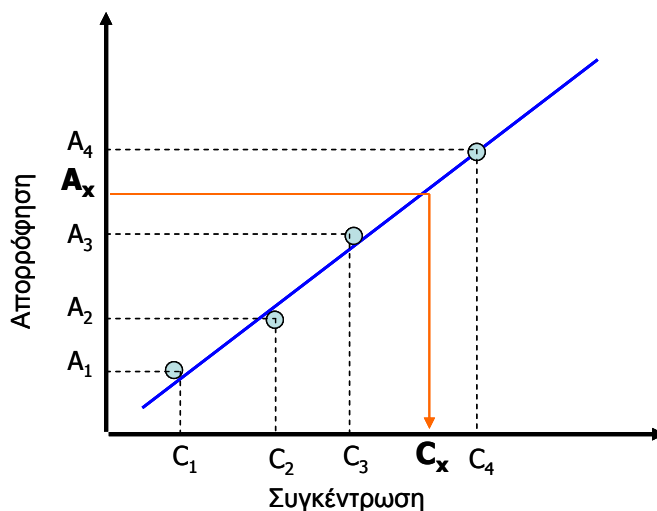
Διαιρώντας τις 1.8.1 και 1.8.2 κατά μέλη προκύπτει:

1.8.3 $C_x = C_p A_x / A_p$

β) Κατασκευή καμπύλης αναφοράς: Με τη μέθοδο αυτή μετρώνται οι απορροφήσεις προτύπων διαλυμάτων, γνωστών συγκεντρώσεων, της προς προσδιορισμό ουσίας και

κατασκευάζεται το διάγραμμα $A = f(C)$, το οποίο είναι της μορφής $y = ax + \beta$. Στη συνέχεια μετρίεται η απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος και υπολογίζεται η συγκέντρωσή του, είτε γραφικά από το διάγραμμα (Σχήμα 1.7), είτε υπολογιστικά αν έχει βρεθεί η εξίσωση $y = ax + \beta$, στην οποία υπακούει η συνάρτηση $A = f(C)$.

Πρέπει να τονιστεί ότι για να εφαρμοστούν οι παραπάνω μέθοδοι είναι απαραίτητο να βρεθεί πρώτα η γραμμικότητα της μεθόδου, δηλαδή η περιοχή συγκεντρώσεων για την οποία η απορρόφηση είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση. Πυκνά διαλύματα και διαλύματα που εμφανίζουν απορροφήσεις πάνω από 1 συνήθως δεν ακολουθούν τον νόμο Lambert-Beer. Οι αποκλίσεις από το νόμο Lambert-Beer μπορεί να οφείλονται σε αιτίες φυσικοχημικής φύσης ή στην οργανολογία και οι πιο συνηθισμένες είναι: α) Τα φασματοφωτόμετρα αποκρίνονται μη γραμμικά σε μεγάλες απορροφήσεις λόγω υψηλής παράσιτης ακτινοβολίας, β) Σε πυκνά διαλύματα οι αποστάσεις μεταξύ των απορροφούντων σωματιδίων είναι τόσο μικρές που επηρεάζουν το ένα την απορρόφηση του άλλου, δηλαδή δεν απορροφούν ανεξάρτητα μεταξύ τους βασική προϋπόθεση του νόμου, γ) Σε πυκνά διαλύματα είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν τα μόρια της απορροφούσας ουσίας με τα μόρια διαλύτη (δεσμοί υδρογόνου, χημικές αντιδράσεις) με αποτέλεσμα να μη βρίσκονται όλα τα μόρια στην ίδια χημική μορφή.



Σχήμα 1.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός άγνωστου διαλύματος με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς

Ανεξάρτητα ποια μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί, η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στο $\lambda_{\max}$ δηλαδή στο μήκος κύματος που εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση ή προς προσδιορισμό ένωσης. Η μέτρηση στο $\lambda_{\max}$ επιτρέπει την αύξηση του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου και τον προσδιορισμό των ελάχιστων δυνατών ποσοτήτων μίας χρωμοφόρας ένωσης σε ένα διάλυμα. Για το λόγο αυτό, είναι σκόπιμο, πριν επιχειρηθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μίας ένωσης να ληφθεί το φάσμα απορρόφησης της, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το/τα $\lambda_{\max}$ της και να επιλεγεί το κατάλληλο μήκος κύματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

2.1 Εισαγωγή

Η τεχνική της φυγοκέντρωσης εφαρμόζεται σε κάθε βιοχημικό εργαστήριο. Η φυγοκέντρωση έχει πολλές εφαρμογές, εκ των οποίων, οι πιο διαδεδομένες είναι ο διαχωρισμός στερεού από υγρό, η προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων καθώς και 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.

2.2 Βασικές αρχές φυγοκέντρωσης

Η περιστροφή ενός σωματιδίου (μακρομόριο, κυτταρικό οργανίδιο, κ.τ.λ) γύρω από ένα άξονα με μεγάλη ταχύτητα δημιουργεί μια φυγόκεντρο δύναμη σε αυτό. Η φυγόκεντρος δύναμη που δημιουργείται είναι ανάλογη της ακτίνας περιστροφής, της μάζας του σωματιδίου και της γωνιακής ταχύτητας που δημιουργείται από την περιστροφή (Εξίσωση 2.1).

Εξίσωση 2.1. Φυγόκεντρος δύναμη

$$F_{\text{φυγ}} = m\omega^2 r$$

$F_{\text{φυγ}}$: φυγόκεντρος δύναμη

m : μάζα του σωματιδίου (μονάδες: g)

ω : γωνιακή ταχύτητα (μονάδες: rad/s)

r : ακτίνα περιστροφής (μονάδες: cm)

Η φυγόκεντρος δύναμη επομένως αυξάνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα περιστροφής (rpm, revolution per minute) και η ακτίνα περιστροφής. 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 $F_{\text{φυγ}}$ με τη βαρυτική δύναμη ($F=mg$). Αυτό οδηγεί στην ορολογία «επί τόσες φορές τη δύναμη της βαρύτητας» κατά την οποία η φυγόκεντρος δύναμη σε ένα σωματίδιο εκφράζεται ως η σχετική φυγόκεντρος δύναμη με πολλαπλάσια της βαρύτητας, όπως για παράδειγμα 10.000 g. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η υιοθέτηση κοινών ταχυτήτων και χρόνου, ώστε να επιτυγχάνεται μια συγκεκριμένη δύναμη φυγοκέντρωσης, ανεξάρτητα από τον τύπο συσκευής που χρησιμοποιείται. Για κάθε τύπο συσκευής υπάρχουν ειδικοί πίνακες που δίνουν την αντιστοιχία των rpm με την rcf και οι οποίοι προκύπτουν με την χρήση της εξίσωσης 2.2.

Εξίσωση 2.2. Σχέση της σχετικής φυγοκέντρου δύναμης με την τις περιστροφές ανά λεπτό

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

rcf : σχετική φυγόκεντρος δύναμη (έκφραση x g, g=9,807 m/s²)

rpm : περιστροφές ανά λεπτό (μονάδες: στροφές / min)

r : ακτίνα περιστροφής (μονάδες: cm)

Επειδή τα βιοχημικά πειράματα γίνονται συνήθως σε διαλύματα, δυο κυρίως δυνάμεις αντιδρούν στην φυγόκεντρο δύναμη. Η πρώτη δύναμη είναι η δύναμη της άνωσης, που εκφράζει το υγρό διάλυμα που εκτοπίζουν τα σωματίδια καθώς καθιζάνουν (Εξίσωση 2.3). Η εξίσωση 2.3 υποδεικνύει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο μερικός ειδικός όγκος του σωματιδίου και όσο μεγαλύτερη η πυκνότητα του διαλύματος τόσο πιο μικρή είναι η ταχύτητα που καθιζάνουν τα σωματίδια.

Εξίσωση 2.3. Η δύναμη της άνωσης

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

V : μερικός ειδικός όγκος σωματιδίου (μονάδες: cm³/g)

ρ : πυκνότητα του διαλύματος (μονάδες: g/cm³)

Η δεύτερη δύναμη είναι η δύναμη της τριβής (Εξίσωση 2.4) που δημιουργείται καθώς τα σωματίδια μετατοπίζονται μέσα στο διάλυμα. Η δύναμη αυτή είναι ανάλογη του συντελεστή τριβής και της ταχύτητας καταβύθισης. Ο συντελεστής τριβής είναι μοναδικός για κάθε σωματίδιο και εξαρτάται από το σχήμα και το μέγεθος του σωματιδίου καθώς και από την πυκνότητα του διαλύματος. Η ταχύτητα καταβύθισης εκφράζεται ως η απόσταση που διανύει ένα σωματίδιο κατά μήκος του άξονα περιστροφής στη μονάδα του χρόνου.

Εξίσωση 2.4. Η δύναμη της τριβής

$$F_{tp} = fU = f(dr/dt)$$

f : συντελεστής τριβής

U : ταχύτητα καταβύθισης (μονάδες: cm/s)

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. Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ η φυγόκεντρος δύναμη και η δύναμη της άνωσης είναι σταθερές για κάθε σωματίδιο για συγκεκριμένη ταχύτητα περιστροφής, η δύναμη της τριβής αυξάνει καθώς αυξάνει η ταχύτητα καταβύθισης του σωματιδίου. Η εξισορρόπηση αυτή συμβαίνει πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα το σωματίδιο να κινείται με σταθερή ταχύτητα (U). Η ταχύτητα, δηλαδή ο ρυθμός καταβύθισης δίνεται από την εξίσωση 2.5.1. επειδή όμως τα μεγέθη V, ρ και f είναι δύσκολο να μετρηθούν εισάγεται ένας νέος όρος ο συντελεστής καταβύθισης (Εξίσωση 2.5.2) με αποτέλεσμα να προκύπτει η εξίσωση 2.5.3.

Ο συντελεστής καταβύθισης είναι φυσικό χαρακτηριστικό και χρησιμοποιείται για να ταξινομήσει τα μακρομόρια και τα κυτταρικά οργανίδια βάση του μεγέθους τους. Οι τιμές του κυμαίνονται από 1-10.000 10⁻¹³ s. Οι βιοχημικοί για να αποφύγουν την χρήση των μονάδων 10⁻¹³ χρησιμοποιούν την μονάδα Svedberg (S), όπου 1 S = 10⁻¹³ S. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι πρωτεΐνες έχουν τιμές 1 - 20 S, τα νουκλεϊκά οξέα 4 - 100 S και τα υποκυτταρικά

οργανίδια 30 – 500 S. Για παράδειγμα η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη έχει συντελεστή καταβύθισης $4,5 \cdot 10^{-13} \text{ s} = 4,5 \text{ S}$.

Εξίσωση 2.5. Η ταχύτητα καταβύθισης σωματιδίου

$$F_{\text{φυγ}} = F_{\text{αν}} + F_{\text{τρ}}$$

$$m\omega^2 r = m\omega^2 r V_p + fU$$

2.5.1

$$U = m\omega^2 r (1 - V_p) / f$$

2.5.2

$$s = U / \omega^2 r = m(1 - V_p) / f$$

2.5.3

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

s: συντελεστής καταβύθισης (μονάδες: s ή Svedberg, $S = 10^{-13} \text{ s}$)

2.3 Η φυγόκεντρος

2.3.1. Περιγραφή φυγοκέντρου

Η φυγόκεντρος αποτελείται κυρίως από δυο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η συσκευή, η οποία περιλαμβάνει το ηλεκτρικό μοτέρ και τον άξονα περιστροφής και το δεύτερο είναι η κεφαλή, που περιλαμβάνει τις ειδικές θέσεις τοποθέτησης των σωλήνων με τα δείγματα.

Συσκευή φυγοκέντρου: Η συσκευή φυγοκέντρου μπορεί να είναι είτε επιτραπέζια είτε επιδαπέδια. Αποτελείται από ένα ηλεκτρικό μοτέρ και τον άξονα περιστροφής και σε κάποιες συσκευές από σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας μέσα στο θάλαμο φυγοκέντρωσης. Επιπλέον, περιλαμβάνει την οθόνη, ψηφιακή ή αναλογική, όπου εμφανίζονται οι συνθήκες τις φυγοκέντρωσης (rpm ή rcf, χρόνος, θερμοκρασία).

α)



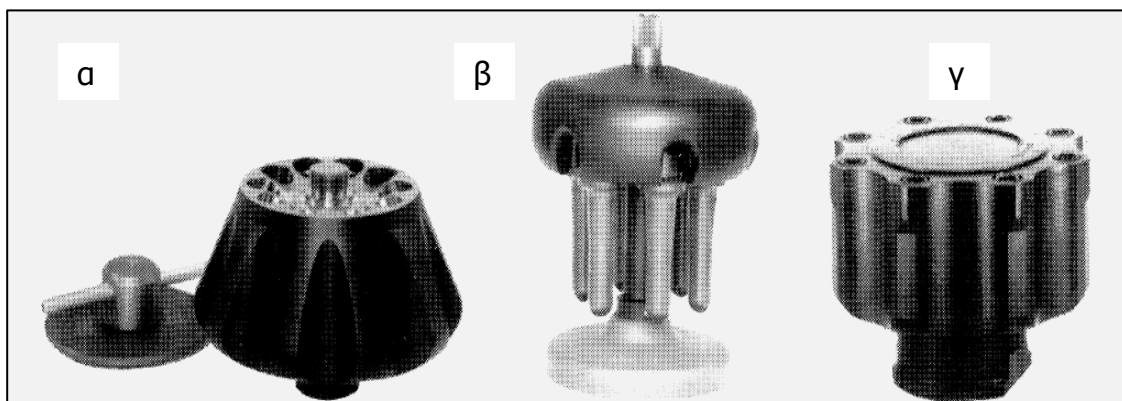
β)



Σχήμα 2.1. Τύποι φυγοκέντρου α) επιτραπέζια φυγόκεντρος β) επιδαπέδια υπερφυγόκεντρος

Κεφαλή: Υπάρχουν διάφοροι τύποι κεφαλών, στις οποίες μπορούν να τοποθετηθούν τα υπό εξέταση δείγματα: οι κεφαλές σταθερής γωνίας (fixed angle rotor), όπου η τοποθέτηση του δείγματος γίνεται σε ειδική υποδοχή στην κεφαλή η οποία έχει συγκεκριμένη γωνία από τον άξονα περιστροφής, οι κάθετες κεφαλές (vertical rotor), όπου η τοποθέτηση του δείγματος γίνεται σε ειδική υποδοχή στην κεφαλή η οποία είναι κατακόρυφη και οι κεφαλές αιωρούμενων υποδοχέων (swinging-bucket rotor) όπου το δείγμα τοποθετείται μέσα ειδικό

υποδοχέα όπου στη συνέχεια «γαντζώνεται» πάνω στη κεφαλή και μπορεί να περιστραφεί ελεύθερα.



Σχήμα 2.2. Τύποι κεφαλών α) σταθερής γωνίας β) αιωρούμενων υποδοχέων γ) κάθετης κεφαλής

2.3.2. Τύποι φυγοκέντρου

Υπάρχουν διαθέσιμοι διάφοροι τύποι φυγοκέντρου, οι οποίοι συνήθως κατατάσσονται βάση της ταχύτητας περιστροφής που μπορούν να αναπτύξουν.

Οι χαμηλής ταχύτητας φυγόκεντροι είναι όργανα που αναπτύσσουν ταχύτητες μέχρι και 6.000 rpm. Μπορούν να έχουν, είτε κεφαλές σταθερής γωνίας, είτε κεφαλές αιωρούμενων υποδοχέων. Οι όγκοι του δείγματος που συνήθως μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι από 3 έως και 50 mL και συνήθως η φυγοκέντρωση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτά τα όργανα χρησιμοποιούνται για καταβύθιση σχετικά μεγάλων σωματιδίων όπως για παράδειγμα στο διαχωρισμό στερεού από υγρό ή στην καταβύθιση των ερυθροκυττάρων του αίματος.

Οι υψηλής ταχύτητας φυγόκεντροι είναι όργανα που αναπτύσσουν ταχύτητες μέχρι και 25.000 rpm. Μπορούν να έχουν, είτε κεφαλές σταθερής γωνίας, είτε κεφαλές αιωρούμενων υποδοχέων. Σε αυτά τα όργανα ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι απαραίτητος καθώς επίσης και ο ακριβής έλεγχος της ταχύτητας περιστροφής ώστε να μπορούν να αναπαράχθούν οι συνθήκες φυγοκέντρωσης, ευαίσθητων στη θερμοκρασία, βιολογικών δειγμάτων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι μικρο-φυγόκεντροι, οι οποίες αναπτύσσουν ταχύτητες στο εύρος 1.000 – 20.000 rpm, έχουν κεφαλές σταθερής γωνίας που μπορούν να δεχθούν όγκους δείγματος από 0,1 έως 1,5 mL.

Οι υπερφυγόκεντροι είναι όργανα που αναπτύσσουν ταχύτητες μέχρι και 600.000 rpm. Μπορούν να έχουν, είτε κεφαλές σταθερής γωνίας, είτε κεφαλές αιωρούμενων υποδοχέων. Σε αυτά τα όργανα δημιουργούνται υψηλές θερμοκρασίες εξαιτίας των μεγάλων ταχυτήτων που αναπτύσσονται για αυτό το λόγο ο θάλαμος φυγοκέντρωσης ψύχεται και βρίσκεται υπό κενό ώστε να μειωθεί η τριβή.

2.4 Τεχνικές της φυγοκέντρωσης

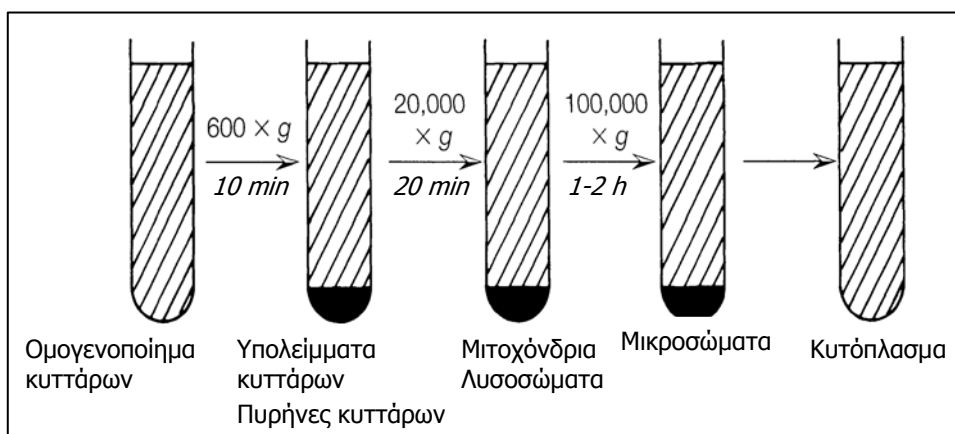
Οι βιοχημικοί χρησιμοποιούν τη φυγόκεντρο, είτε σε παρασκευαστική κλίμακα, είτε σε αναλυτική κλίμακα. Η παρασκευαστικής κλίμακας φυγοκέντρωση είναι άμεση και περιλαμβάνει

την τοποθέτηση του δείγματος σε κάποιο σωλήνα ή παρόμοιο δοχείο, την τοποθέτηση του στις ειδικές θέσεις της κεφαλής και τη φυγοκέντρωση σε συγκεκριμένες συνθήκες ταχύτητας και χρόνου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης διαχωρίζονται προσεκτικά το ίζημα από το υπερκείμενο υγρό (υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φυγοκέντρωση καθίζησης ταχύτητας και είναι αυτή που χρησιμοποιείται κυρίως σε ένα βιοχημικό εργαστήριο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος των σωματιδίων αφού μεγαλύτερα σωματίδια απαιτούν μικρότερη ταχύτητα για να καταβυθιστούν και το αντίθετο. Η φυγοκέντρωση αναλυτικής κλίμακας συνδυάζει επιπλέον τη χρήση οπτικών συστημάτων για την ανάλυση της μετακίνησης των διαλυμένων σωματιδίων κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης. Με αυτές τις τεχνικές, οι οποίες απαιτούν την χρήση υπερφυγοκέντρου, μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος, η πυκνότητα και η καθαρότητα των σωματιδίων.

Τόσο στην παρασκευαστική κλίμακα όσο και στην αναλυτική κλίμακα οι κύριες εφαρμογές της φυγοκέντρωσης είναι η διαφορική φυγοκέντρωση και η φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας.

2.4.1. Διαφορική φυγοκέντρωση

Πολλές από τις γνώσεις μας για την λειτουργία και τη δομή των υποκυτταρικών οργανιδίων βασίζεται στο διαχωρισμό τους με φυγοκεντρήσεις καθίζησης ταχύτητας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαφορική φυγοκέντρωση παρασκευαστικής κλίμακας και περιλαμβάνει την καταβύθιση των σωματιδίων σε όμοιας πυκνότητας διάλυμα, εφαρμόζοντας διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε αυξανόμενες ταχύτητες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται μια αρχική φυγοκέντρωση του δείγματος σε συγκεκριμένη ταχύτητα και χρόνο και στην συνέχεια το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μεταφέρεται σε άλλο σωλήνα και εφαρμόζεται φυγοκέντρωση μεγαλύτερης ταχύτητας.



Σχήμα 2.3 Διαφορική φυγοκέντρωση ομογενοποιημένου κυττάρων

Στο σχήμα 2.3 φαίνεται η διαδοχική φυγοκέντρωση ομογενοποιημένου κυττάρων, δηλαδή δείγματος κυττάρων που έχουν πρώτα υποστεί λύση (σπάσιμο πλασματικής μεμβράνης). Μετά από φυγοκέντρωση στα 600 g για 10 λεπτά παραλαμβάνονται στο ίζημα οι πυρήνες και τα μεγάλα κομμάτια της κυτταρικής μεμβράνης, στα 20.000 g για 20 λεπτά παραλαμβάνονται τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, το ίζημα των 100.000 g περιλαμβάνει τα μικροσώματα (και ένα μέρος από τα λυσοσώματα) ενώ το τελικό υπερκείμενο των 100.000 g αποτελεί το κυτόπλασμα.

Στη διαφορική φυγοκέντρωση αναλυτικής κλίμακας η αρχή μεθόδου είναι ίδια με αυτή της παρασκευαστικής, με τη διαφορά ότι στόχος σε αυτό το είδος είναι ο υπολογισμός του παράγοντα καταβύθισης (s). Στην αναλυτική διαφορική φυγοκέντρωση μπορεί να ανιχνευτεί και να μετρηθεί η κίνηση των σωματιδίων και να υπολογιστεί επομένως η ταχύτητα καταβύθισης (U). Χρησιμοποιώντας επομένως την εξίσωση 2.5.2 μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής καταβύθισης s . Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος ισούται με γινόμενο mN (Εξίσωση 2.6) τελικά προκύπτει ότι ο συντελεστής καταβύθισης συνδέεται με το μοριακό βάρος της ένωσης με την εξίσωση 6.4.

Εξίσωση 2.6. Υπολογισμός μοριακού βάρους ένωσης με διαφορική φυγοκέντρωση αναλυτικής κλίμακας

$$MB = sRT / D (1-V\rho)$$

MB : μοριακό βάρος

R : σταθερά αερίου ($8,3 \cdot 10^7$ g cm²/s/deg/mol)

D : συντελεστής διάχυσης (μονάδες cm²/s)

T : απόλυτη θερμοκρασία

s : παράγοντας καταβύθισης

Η μέθοδος αυτή παρέχει με ακρίβεια το βάρος των βιομορίων, κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων, όμως η χρήση της στη πράξη είναι περιορισμένη λόγω της δυσκολίας στον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης.

Μια εναλλακτική μέθοδος προσδιορισμού του μοριακού βάρους είναι η φυγοκέντρωση εξισορρόπησης. Η διαφορά είναι ότι χρησιμοποιούνται μικρότερες ταχύτητες φυγοκέντρωσης έτσι ώστε να μην καταβυθίζεται το σωματίδιο άλλα να φτάνει στο σημείο όπου η δύναμη της φυγοκέντρωσης εξισώνεται με την δύναμη της άνωσης και τη δύναμη της τριβής. Σε αυτό το είδος φυγοκέντρωσης απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι φυγοκέντρωσης μέχρι και 1-2 ημέρες. Το μοριακό βάρος υπολογίζεται σε αυτή την περίπτωση από την εξίσωση 2.7.

Εξίσωση 2.7. Υπολογισμός μοριακού βάρους ένωσης με φυγοκέντρωση εξισορρόπησης

$$MB = RT / \omega^2 (1-V\rho) 1/rC \, dC/dr$$

C : συγκέντρωση ένωσης

dC/dr = η μεταβολή της συγκέντρωσης της ένωσης συναρτήσει της ακτίνας περιστροφής

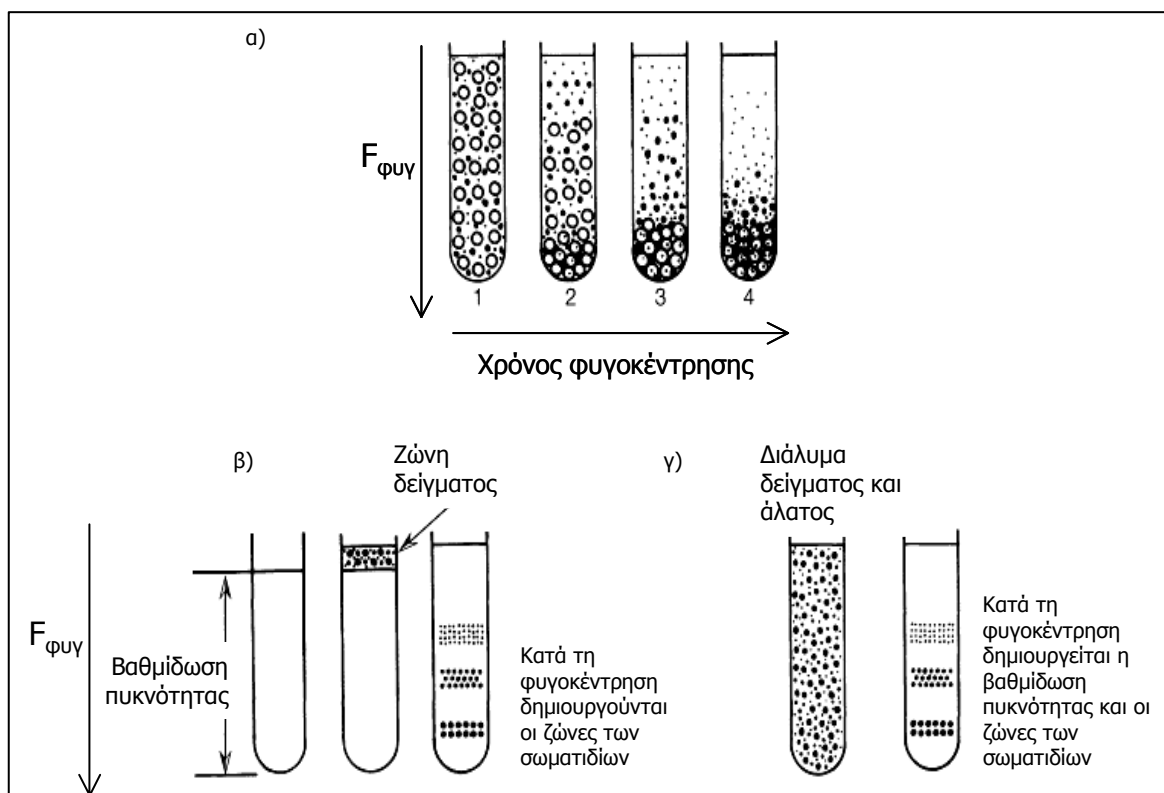
2.4.2. Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας

Η φυγοκέντρωση βαθμίδωσης απαιτεί τη χρήση κεφαλής αιωρούμενων υποδοχέων και χωρίζεται στη φυγοκέντρωση ζώνης και στη φυγοκέντρωση εξισορρόπησης.

Φυγοκέντρωση ζώνης: Στην φυγοκέντρωση ζώνης δημιουργείται σε ένα σωλήνα βαθμίδωση πυκνότητας από ένα οργανικό συστατικό (σακχαρόζη ή γλυκερίνη). Η βαθμίδωση δημιουργείται από την ανάμιξη διαφορετικών ποσοτήτων ενός διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης (σακχαρόζη 5% w/v) και ενός διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (σακχαρόζη 20% w/v). Το δείγμα τοποθετείται πάνω από τη βαθμίδωση αυξανόμενης πυκνότητας. Η καταβύθιση των σωματιδίων γίνεται με ρυθμό ανάλογο του συντελεστή s με μορφή διακριτών ζωνών. Η φυγοκέντρωση σταματά πριν τα ταχύτερα σωματίδια φτάσουν στο βάθος του σωλήνα. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης τα διαφορετικά σωματίδια βρίσκονται κατά ζώνες

κατά μήκος του σωλήνα και μπορούν να συλλεχθούν από τον πυθμένα του ανοίγοντας μια τρύπα και παραλαμβάνοντας τις ζώνες σε διαφορετικούς σωλήνες. Η παραλαβή των διαφορετικών ζωνών οδηγεί σε κλάσματα με σωματίδια διαφορετικού μεγέθους. Η φυγοκέντρωση ζώνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε παρασκευαστική κλίμακα (διαχωρισμός υποκυτταρικών σωματιδίων ή μακρομορίων) είτε σε αναλυτική (υπολογισμός MB).

Φυγοκέντρωση εξισορρόπησης: Στην φυγοκέντρωση εξισορρόπησης χρησιμοποιείται διάλυμα άλατος συνήθως χλωριούχου καϊσίου. Το δείγμα διαλύεται στο διάλυμα άλατος και η βαθμίδωση πυκνότητας δημιουργείται κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης. Με την εφαρμογή της φυγοκέντρωσης τα σωματίδια μετακινούνται στο σημείο του σωλήνα όπου η πυκνότητα του διαλύματος είναι όμοια με την πυκνότητα των σωματιδίων. Η φυγοκέντρωση εξισορρόπησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε παρασκευαστική κλίμακα (διαχωρισμός υποκυτταρικών σωματιδίων ή μακρομορίων) είτε σε αναλυτική (υπολογισμός MB). Αυτή η τεχνική συνήθως χρησιμοποιείται για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων.



Σχήμα 2.4. Σύγκριση μεταξύ α) διαφορικής φυγοκέντρωσης, β) φυγοκέντρωσης ζώνης και γ) φυγοκέντρωσης εξισορρόπησης

2.5 Βασικοί κανόνες χρήσης φυγοκέντρου

Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης αναπτύσσονται μεγάλες ταχύτητες, για αυτό το λόγο απαιτείται μεγάλη προσοχή κατά τη χρήσης της ώστε να μην υπάρξουν ατυχήματα. Δεδομένης της ύπαρξης μεγάλης ποικιλίας συσκευών φυγοκέντρωσης, παρακάτω αναφέρονται κάποιοι γενικοί κανόνες χρήσης αυτών.

- Ρύθμιση της θερμοκρασίας και αναμονή μέχρι να αποκτηθεί η επιθυμητή θερμοκρασία στο θάλαμο της φυγοκέντρου.
- Ρύθμιση της ταχύτητας (rpm ή rcf) και του χρόνου φυγοκέντρωσης.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε κατάλληλα δοχεία φυγοκέντρωσης έτσι ώστε ανά δύο να έχουν τον ίδιο όγκο.
- Σε περιπτώσεις μεγάλων ταχυτήτων τοποθετούνται σωλήνες στους ειδικούς υποδοχείς της κεφαλής και ζυγίζονται ανά δύο ώστε η μάζα τους να μη διαφέρει πάνω από δυο δεκαδικά ψηφία, για τις φυγοκέντρους μέτριας ταχύτητας και πάνω από τέσσερα δεκαδικά ψηφία, για τις υπερφυγοκέντρους.
- Η τοποθέτηση στην κεφαλή των υποδοχέων με το ίδιο βάρος γίνεται πάντα αντιδιαμέτρικα σε σχέση με τον άξονα περιστροφής.

3.1 Εισαγωγή

Η εκχύλιση αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού. Είναι τεχνική απλή, ταχεία και ευέλικτη αφού μπορεί να εφαρμοστεί για την απομονώση και το διαχωρισμό ουσιών που βρίσκονται τόσο σε ίχνη, όσο και σε μεγάλες ποσότητες, σε ένα βιολογικό δείγμα.

Κατά την εκχύλιση ένα στερεό ή υγρό συστατικό ενός στερεού ή υγρού μίγματος παραλαμβάνεται εκλεκτικά από ένα άλλο υγρό διαλύτη (υδατικό ή οργανικό). Η εκλεκτική παραλαβή του συστατικού οφείλεται στη μεγαλύτερη διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου συστατικού στο διαλύτη εκχύλισης σε σχέση με αυτή στο εκχυλιζόμενο μίγμα.

Όταν το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε στερεό μίγμα και η παραλαβή του γίνεται με υγρό διαλύτη τότε η εκχύλιση καλείται εκχύλιση στερεού-υγρού, ενώ όταν το εκχυλιζόμενο συστατικό περιέχεται σε υγρό μίγμα και εκχυλίζεται με υγρό διαλύτη, τότε η εκχύλιση καλείται εκχύλιση υγρού-υγρού.

3.2 Θεωρία εκχύλισης

Έστω μία ουσία A, διαλυτή σε δύο μη μιγνυόμενους διαλύτες 1 και 2, η οποία προστίθεται σε δοχείο που περιέχει του διαλύτες σε δύο στιβάδες. Η ουσία θα κατανεμηθεί μεταξύ των δύο φάσεων σε ορισμένη αναλογία που εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητα της A στους δύο διαλύτες. Ο λόγος κατανομής, D, της ουσίας A μεταξύ των δύο διαλυτών δίνεται από την εξίσωση 3.1.

Εξίσωση 3.1. Λόγος κατανομής μίας ουσίας μεταξύ δύο μη μιγνυομένων διαλυτών

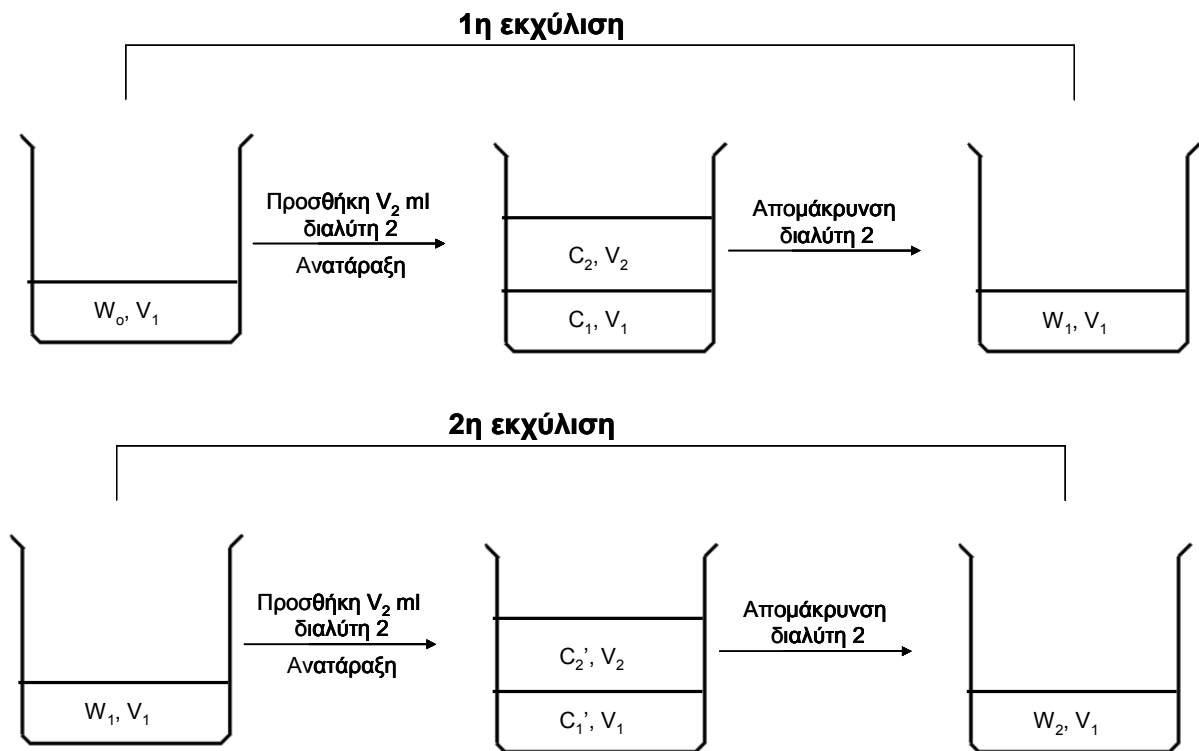
$$D = C_2/C_1$$

C₁: συγκέντρωση της ουσίας στο διαλύτη 1

C₂: συγκέντρωση της ουσίας στο διαλύτη 2

Κατά συνθήκη, όταν ένας εκ των δύο διαλυτών είναι το νερό, η εξίσωση 3.1 γράφεται με το νερό στο παρανομαστή και τον οργανικό διαλύτη στον αριθμητή. Πρέπει να τονιστεί ότι οι C₁, C₂ αναφέρονται στην αναλυτική συγκέντρωση της ουσίας στον κάθε διαλύτη, δηλαδή στο άθροισμα των συγκεντρώσεων όλων των χημικών μορφών με τις οποίες μπορεί να βρεθεί η ουσία στον κάθε διαλύτη.

Έστω ότι θέλουμε να εκχυλίσουμε την ουσία A από ένα διάλυμα της στο διαλύτη 1, το οποίο έχει όγκο V₁ mL και σε αυτό περιέχονται W₀ g της ουσίας A. Η εκχύλιση θα γίνει με όγκο V₂ mL από το διαλύτη 2. Μετά την προσθήκη του διαλύτη 2 και την αποκατάσταση ισορροπίας, η διαλυμένη ουσία A κατανέμεται μεταξύ των δύο διαλυτών έχοντας συγκεντρώσεις C₁ και C₂ στους διαλύτες 1 και 2, αντίστοιχα (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1. Εκχύλιση ουσίας, η οποία βρίσκεται διαλυμένη σε V_1 mL διαλύτη 1, με V_2 mL διαλύτη 2

Ισχύει τότε ότι:

$$W_0 = C_1 V_1 + C_2 V_2 \quad (\text{Εξίσωση 3.2})$$

και από τις εξισώσεις 3.1 και 3.2 προκύπτει:

$$W_0 = (DV_2 + V_1)C_1 \quad (\text{Εξίσωση 3.3})$$

Μετά την απομάκρυνση της στιβάδας 2, στη στιβάδα 1 παραμένουν W_1 g της ουσίας A και ισχύει ότι:

$$W_1 = C_1 V_1 \quad (\text{Εξίσωση 3.4})$$

Με συνδυασμό των εξισώσεων 3.3 και 3.4 προκύπτει ότι η ποσότητα της ουσίας A που παρέμεινε στο διαλύτη 1 μετά την εκχύλιση με το διαλύτη 2 δίνεται από τη σχέση:

$$W_1 = W_0 (V_1 / (DV_2 + V_1)) \quad (\text{Εξίσωση 3.5})$$

Αν η εκχύλιση επαναληφθεί ξανά με V_2 mL διαλύτη 2, τότε, μετά την αποκατάσταση ισορροπίας στη δεύτερη εκχύλιση, η συγκέντρωση της A στους δύο διαλύτες θα είναι C_1' και C_2' και η κατανομή των W_1 g της ουσίας A, μεταξύ των δύο φάσεων θα δίνεται από τη σχέση:

$$W_1 = C_1' V_1 + C_2' V_2 = (DV_2 + V_1)C_1' \quad (\text{Εξίσωση 3.6})$$

Μετά και τη δεύτερη εκχύλιση και την απομάκρυνση της στιβάδας 2, στη στιβάδα 1 παραμένουν W_2 g της A και ισχύει:

$$W_2 = C_1 V_1 \quad (\text{Εξίσωση 3.7})$$

Με συνδυασμό των εξισώσεων 3.6 και 3.7 προκύπτει ότι η ποσότητα της ουσίας A που παρέμεινε στο διαλύτη 1 μετά τη δεύτερη εκχύλιση με το διαλύτη 2 δίνεται από τη σχέση:

$$W_2 = W_1 [V_1 / (DV_2 + V_1)] \quad (\text{Εξίσωση 3.8})$$

και με συνδυασμό των εξισώσεων 3.8 και 3.5 προκύπτει ότι:

$$W_2 = W_0 [V_1 / (DV_2 + V_1)]^2 \quad (\text{Εξίσωση 3.9})$$

Με παρόμοιο τρόπο αποδεικνύεται ότι μετά από n εκχυλίσεις της ουσίας A με V_2 mL του διαλύτη 2, η ποσότητα W_n της ουσίας A που παραμένει στο διαλύτη 1 δίνεται από την εξίσωση 3.10:

Εξίσωση 3.10. Η ποσότητα μίας ουσίας που παραμένει στην αρχική φάση μετά από n εκχυλίσεις με το διαλύτη 2

$$W_n = W_0 [V_1 / (DV_2 + V_1)]^n$$

W_0 : αρχική ποσότητα ουσίας στο διαλύτη 1

W_n : ποσότητα της ουσίας που παρέμεινε στο διαλύτη 1 μετά από n εκχυλίσεις

D : συντελεστής κατανομής

n : αριθμός εκχυλίσεων

V_1 : όγκος διαλύτη 1

V_2 : όγκος διαλύτη 2

Από την εξίσωση 3.10 είναι προφανές ότι το W_n είναι τόσο μικρότερο, άρα και η εκχύλιση τόσο αποτελεσματικότερη, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος κατανομής, ο όγκος του εκχυλιστικού μέσου και ο αριθμός των εκχυλίσεων. Για δοθέντα όγκο εκχυλιστικού μέσου, η εκχύλιση είναι αποτελεσματικότερη όταν αυτός ο όγκος μοιραστεί σε n εκχυλίσεις. Για παράδειγμα αν εκχυλιστεί μία ουσία από ένα διάλυμα 1 με 500 mL διαλύτη 2, τότε θα παραληφθεί περισσότερη ουσία A αν γίνουν δύο εκχυλίσεις με 250 mL παρά μία με 500 mL.

Η επί τοις εκατό εκχυλισθείσα ποσότητα σε μία εκχύλιση $E\%$ δίνεται από τη σχέση:

$$E\% = (W_0 - W_1) / W_0 \cdot 100 \quad (\text{Εξίσωση 11})$$

και συνδυάζοντας τις σχέσεις 3.5 και 3.11 προκύπτει:

Εξίσωση 3.12. Η εκχυλισθείσα ποσότητα % μίας ουσίας μετά από μία εκχύλιση

$$\%E = 100D / [D + (V_1/V_2)]$$

ενώ η εκχυλισθείσα ποσότητα της ουσίας Α μετά από n εκχυλίσεις δίνεται από την εξίσωση 3.13.

Εξίσωση 3.13. Η εκχυλισθείσα ποσότητα % μίας ουσίας μετά από n εκχυλίσεις

$$\%E_n = 100 - 100 [V_1 / (DV_2 + V_1)]^n$$

3.3. Προϋποθέσεις εκχυλιστικού μέσου

Για να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης ως εκχυλιστικό μέσο πρέπει να πληρεί κάποιες προϋποθέσεις όπως:

1. Να μην αναμιγνύεται με το διαλύτη του προς εκχύλιση μίγματος ή διαφορετικά η αμοιβαία διαλυτότητα των δύο υγρών να είναι αμελητέα.
2. Να μην αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία.
3. Η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στο εκχυλιστικό μέσο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, ενώ η διαλυτότητα των συνυπαρχουσών ανεπιθύμητων ουσιών πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.
4. Μετά την εκχύλιση πρέπει η στοιβάδα του διαλύτη να διαχωρίζεται ταχέως από τη στοιβάδα του προς εκχύλιση μίγματος. Για να συμβεί αυτό πρέπει η πυκνότητα των δύο διαλυτών να είναι σημαντικά διαφορετική. Για παράδειγμα, οργανικές ενώσεις μπορούν να παραληφθούν από υδατικά διαλύματα ($d \sim 1 \text{ g/cm}^3$) με οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο ($d=1,50 \text{ g/cm}^3$) ή ο διαιθυλαιθέρας ($d=0,71 \text{ g/cm}^3$).
5. Η εκχυλισθείσα ουσία πρέπει να ανακτάται εύκολα από το εκχυλιστικό μέσο. Για το λόγο αυτό καλό είναι, το εκχυλιστικό μέσο να έχει κατά το δυνατόν χαμηλότερο σημείο ζέσεως ώστε να μπορεί εύκολα να ανακτηθεί το εκχυλιζόμενο συστατικό ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη.
6. Να μην έχει τάση σχηματισμού γαλακτώματος με το διαλύτη του προς εκχύλιση μίγματος.
7. Να μην είναι τοξικός, ούτε και εύφλεκτος.

Στην πραγματικότητα, σπάνια ένας διαλύτης μπορεί να πληρεί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις και ένας αναλυτής πρέπει να κάνει πάντοτε συμβιβασμούς σταθμίζοντας τι τον ενδιαφέρει περισσότερο. Οι συνήθεις διαλύτες εκχύλισης στο εργαστήριο είναι το χλωροφόρμιο, ο δοαιθυλαιθέρας, ο πετρελαιοικός αιθέρας, η αιθανόλη και η μεθανόλη και το νερό.

3.4 Τεχνικές εκχύλισης

Η απλούστερη τεχνική εκχύλισης είναι η τεχνική του λουτρού. Στην τεχνική αυτή, συγκεκριμένος όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος φέρεται σε επαφή με συγκεκριμένο όγκο εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη. Μετά από έντονη ανατάραξη και αποκατάσταση ισορροπίας, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται, συνήθως με εκροή της κάτω στιβάδας από την κάτω μέρος της διαχωριστικής χοάνης.

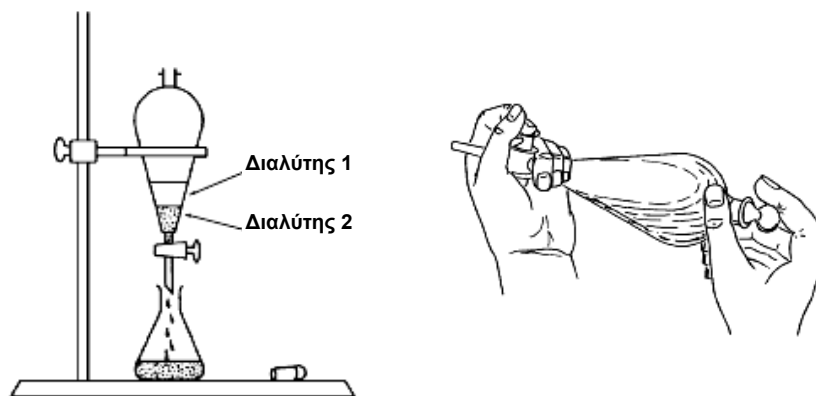
Αν οι συντελεστές κατανομής των προς διαχωρισμό ουσιών δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, χρησιμοποιείται η τεχνική της συνεχούς εκχύλισης και της κατανομής κατ'αντιροή. Στη τεχνική της συνεχούς εκχύλισης γίνεται συνεχής ανακύκλωση του εκχυλιστικού μέσου και δίοδος αυτού δια μέσου του εκχυλιζόμενου διαλύματος εντός ειδικών

συσκευών. Η τεχνική της κατανομής κατ'αντιρροή, επιτυγχάνεται σε σειρά διαχωριστικών δοχείων, συνδεδεμένων κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το εξερχόμενο υγρό από ένα δοχείο να εισέρχεται στο επόμενο δοχείο. Η τεχνική της κατανομής κατ'αντιρροή επιτρέπει το διαχωρισμό ουσιών, των οποίων οι συντελεστές κατανομής διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους.

3.5 Διαδικασία εκχύλισης

Η εκχύλιση στο εργαστήριο γίνεται με χρήση ειδικών γυάλινων οργάνων, τις διαχωριστικές χοάνες, με τις οποίες επιτυγχάνεται η ανάμιξη και η ανατάραξη του μίγματος και του διαλύτη εκχύλισης και στη συνέχεια ο διαχωρισμός τους. Μία απλή εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Ελέγχεται η διαχωριστική χοάνη, στην οποία θα γίνει η εκχύλιση. έτσι ώστε να μην έχει διαρροές, ιδιαίτερα από το σημείο της στρόφιγγας.
2. Στη διαχωριστική χοάνη προστίθεται το προς εκχύλιση μίγμα σε όγκο ίσο περίπου με το 1/3 του όγκου της χοάνης
3. Προστίθεται ο εκχυλιστικός διαλύτης συνήθως σε όγκο ίσο με τον όγκο του υγρού μίγματος.
4. Με το χέρι, σταθεροποιείται το πώμα της χοάνης και με κλειστή τη στρόφιγγα αναταράσσεται ισχυρά το περιεχόμενο της χοάνης έτσι ώστε να αναμιχθούν οι δύο διαλύτες.
5. Μετά από μερικές αναταράξεις, η χοάνη αναστρέφεται και με το άνοιγμα της στρόφιγγας εκτονώνονται οι ατμοί των διαλυτών που δημιουργούνται από τις αναταράξεις.
6. Η διαδικασία των σταδίων 4 και 5 επαναλαμβάνεται 3-4 φορές και μετά η χοάνη τοποθετείται σε σιδερένιο δακτύλιο σε στήριγμα και παραμένει σε ηρεμία μέχρις ότου διαχωριστούν οι δύο στιβάδες των μη μιγνυόμενων υγρών (πολλές φορές ο διαχωρισμός απαιτεί την παραμονή του διφασικού συστήματος σε ψύξη για κάποιο χρονικό διάστημα.
7. Τα δύο υγρά διαχωρίζονται με άνοιγμα της στρόφιγγας (μετά από αφαίρεση του πώματος της χοάνης) και συλλογής του υποκειμένου υγρού. Εάν το υποκείμενο υγρό είναι ο διαλύτης εκχύλισης τότε συλλέγεται σε ξεχωριστή κωνική φιάλη ενώ αν το εκχυλιστικό μέσο είναι η πάνω στιβάδα τότε συλλέγεται σε κωνική φιάλη αφού πρώτα απομακρυνθεί το μίγμα εκχύλισης.
8. Εάν το εκχυλιζόμενο συστατικό έχει μεγάλη διαφορά σ.ζ. σε σχέση με το διαλύτη εκχύλισης, τότε αυτός απομακρύνεται συνήθως με εξάτμιση και το εκχυλιζόμενο συστατικό αναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα διαλύτη.

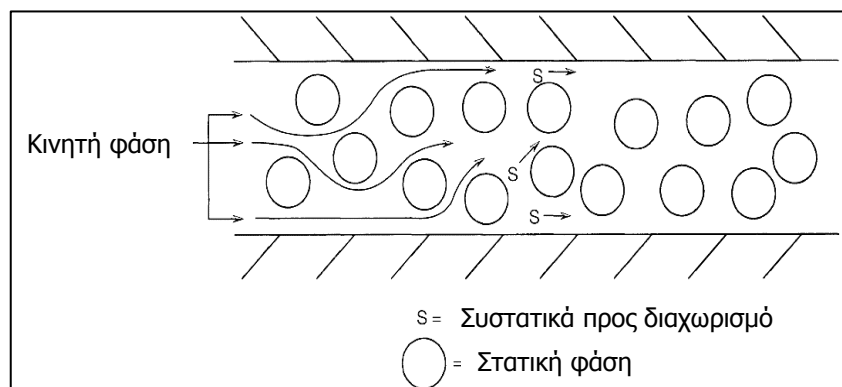


Σχήμα 3.2. Η διαχωριστική χοάνη και ο τρόπος χρήσης της

4.1 Εισαγωγή

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποσαφήνιση της μοριακής βάσης των βιοχημικών διαδικασιών μέσα σε έναν οργανισμό είναι η απομόνωση και η ταυτοποίηση των μορίων που συμμετέχουν σε αυτές. Δεν είναι λοιπόν τυχαίο ότι αυτό η αποσαφήνιση των βιοχημικών διαδικασιών εξελίχθηκε παράλληλα με την ανάπτυξη τεχνικών για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των βιομορίων. Με τον όρο χρωματογραφία περιγράφεται μια πληθώρα τεχνικών που στόχο έχουν να διαχωρίσουν τα μίγματα στα επιμέρους συστατικά τους. Η χρωματογραφία είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές στο χώρο της βιοχημείας και χρησιμοποιείται τόσο για το διαχωρισμό των βιομορίων όσο και για τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό τους.

Όλα τα είδη χρωματογραφίας βασίζονται στην ίδια βασική αρχή. Τα μόρια του προς διαχωρισμού μίγματος αλληλεπιδρούν με δυο διαφορετικές φάσεις, τη στατική φάση και την κινητή φάση. Η στατική φάση είναι ακινητοποιημένη, συνήθως στην επιφάνεια μικρών σωματιδίων και προσφέρει μια μεγάλη επιφάνεια στην κινητή φάση η οποία διέρχεται μέσω αυτής. Ο διαχωρισμός των ενώσεων του δείγματος επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς διαδοχικών καταστάσεων ισορροπίας. Οι ισορροπίες αυτές εξαρτώνται από τη διαφορετική κατανομή της κάθε ένωσης μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.



Σχήμα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής διαχωρισμού των τεχνικών χρωματογραφίας

Οι ενώσεις του μίγματος εισέρχονται στην κινητή φάση, σε μορφή διαλύματος, και υφίστανται μια σειρά διαδοχικών αλληλεπιδράσεων (προσρόφηση ή κατανομή ή ιονανταλλαγή ή χημική συγγένεια) με τις δυο φάσεις κατά τη διάρκεια της κίνησης τους μέσα στο χρωματογραφικό σύστημα (Σχήμα 4.1). Οι διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες της κάθε ένωσης καθορίζουν τη σχετική συγγένεια του για την κινητή και τη στατική φάση. Επομένως, το κάθε συστατικό θα μετακινείται με διαφορετική ταχύτητα, η οποία θα εξαρτάται από τη συγγένεια του για τη στατική φάση και την καθυστέρηση στην κίνηση του εξαιτίας αυτής. Η ένωση που αλληλεπιδρά σε μικρότερο βαθμό με τη στατική φάση, θα εμφανίσει και τη μικρότερη καθυστέρηση αφού η ισορροπία αλληλεπίδρασης είναι μετατοπισμένη προς όφελος της κινητής φάσης και επομένως θα μετακινηθεί πιο γρήγορα. Αντίθετα, η ένωση που

αλληλεπιδρά σε μεγαλύτερο βαθμό με τη στατική φάση θα μετακινηθεί πιο αργά. Η μεγάλη ποικιλία κινητών και στατικών φάσεων έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό ενώσεων με μικρές διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Η χρωματογραφία, όπως και οι άλλες τεχνικές διαχωρισμού, μπορεί να εφαρμοστεί σε παρασκευαστική και σε αναλυτική κλίμακα. Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί παρασκευαστικής κλίμακας εφαρμόζονται σε μεγάλες ποσότητες δείγματος και σκοπό έχει την παραλαβή ενός κλάσματος για περαιτέρω διαχωρισμό και μελέτη. Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί αναλυτικής κλίμακας χρησιμοποιούνται για να απομονωθεί σε καθαρή κατάσταση ένα βιομόριο, να πιστοποιηθεί η καθαρότητα του, να υπολογιστούν τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του (φορτίο, μοριακό βάρος, κ.τ.λ) καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του.

4.2 Κατάταξη των χρωματογραφικών μεθόδων

Τα διάφορα είδη χρωματογραφίας διαφέρουν μεταξύ τους, είτε ως προς τη φύση της κινητής φάσης (αέρια ή υγρή), είτε ως προς τη φύση (στερεή ή υγρή επί στερεού υποστρώματος) και τη μορφή (στήλη ή λεπτή στιβάδα επί υάλινης πλάκας ή χαρτί) της στατικής φάσης, είτε ως προς το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενώσεων του δείγματος και της στατικής φάσης (προσρόφηση ή κατανομή ή ιονανταλλαγή ή χημική συγγένεια). Η κατάταξη των χρωματογραφικών τεχνικών φαίνεται στο σχήμα 4.2.

4.2.1. Με βάση το είδος της κινητής και της στατικής φάσης

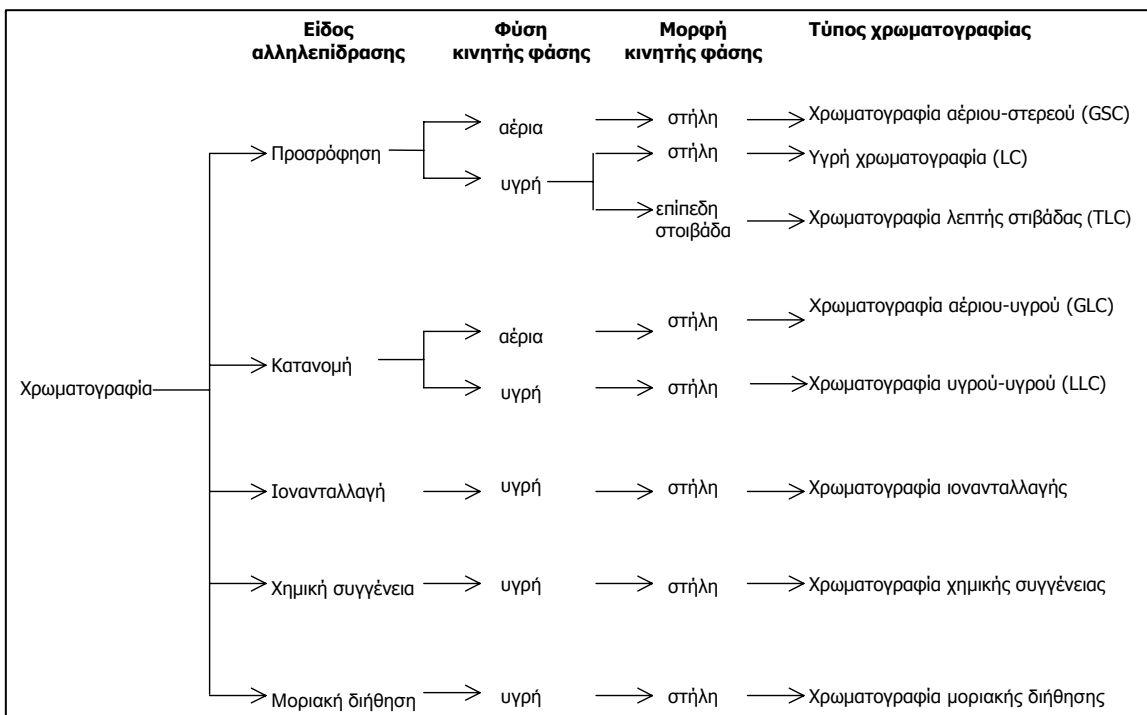
Η κινητή φάση μπορεί να είναι, είτε υγρή, είτε αέρια και η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή επί στερεού υποστρώματος. Ο διαχωρισμός του μίγματος μεταξύ δυο μη μιγνυόμενων υγρών φάσεων αναφέρεται ως χρωματογραφία κατανομής ή χρωματογραφία υγρού-υγρού (liquid-liquid chromatography, LLC) ή απλή εκχύλιση (βλέπε κεφάλαιο 3). Όταν η στατική φάση είναι στερεή και η κινητή φάση υγρή, ο διαχωρισμός αναφέρεται ως χρωματογραφία προσρόφησης ή χρωματογραφία υγρού-στερεού (liquid-solid chromatography, LSC), ενώ, εάν η κινητή φάση είναι αέρια αναφέρεται ως χρωματογραφία αέριου-στερεού (gas-solid chromatography, GSC). Αντίστοιχα, όταν η στατική φάση είναι υγρή και η κινητή φάση είναι αέρια αναφέρεται ως χρωματογραφία αέριου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC).

4.2.2. Με βάση τη μορφή της στατικής φάσης

Η μορφή της στατικής φάσης κατηγοριοποιεί τις τεχνικές της χρωματογραφίας σε δυο βασικά είδη. Το πρώτο είναι η χρωματογραφία επίπεδης επιφάνειας που περιλαμβάνει την ακινητοποίηση της στατικής φάσης, είτε σε επίπεδη επιφάνεια χαρτιού (χρωματογραφία χάρτου, paper chromatography), είτε σε γυάλινη πλάκα/πλάκα αλουμινίου (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, Thin Layer Chromatography, TLC). Στη χρωματογραφία σε επίπεδη επιφάνεια λεπτής στιβάδας η τοποθέτηση του δείγματος γίνεται συνήθως στο κάτω μέρος και η κάθε ένωση ανεβαίνει με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος αυτής, εμφανιζόμενη ως διαφορετική κηλίδα.

Το δεύτερο είδος είναι η χρωματογραφία στήλης που περιλαμβάνει την τοποθέτηση της στατικής φάσης σε στήλη γυάλινη ή πλαστική. Στη χρωματογραφία ανοικτής στήλης η

τοποθέτηση του δείγματος γίνεται στην κορυφή της στήλης πάνω στη στατική φάση και η κάθε ένωση κατεβαίνει με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης εμφανιζόμενο ως διαφορετική ζώνη. Η εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας ανοικτής στήλης, είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) στην οποία η γυάλινη ανοικτή στήλη έχει αντικατασταθεί από κλειστό σύστημα σε ανοξείδωτη στήλη. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την εφαρμογή μεγάλων πιέσεων με αποτέλεσμα τον πιο γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος.



Σχήμα 4.2. Κατάταξη χρωματογραφικών τεχνικών

4.2.3. Με βάση το είδος αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα

Η τεχνική της χρωματογραφίας αποτελεί ένα τριπλό σύστημα που συμπεριλαμβάνει τα συστατικά του μίγματος, την κινητή φάση και τη στατική φάση. Το είδος της αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ τους μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την κατάταξη των χρωματογραφικών τεχνικών. Τα κύρια είδη αλληλεπίδρασης είναι η προσρόφηση, η κατανομή και η χημική συγγένεια. Πρέπει όμως να τονισθεί ότι στην πραγματικότητα κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού μπορούν να λάβουν χώρα δυο ή περισσότερα φαινόμενα.

Κατανομή: Στη χρωματογραφία κατανομής οι ενώσεις του μίγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής (υγρής ή αέριας) και της στατικής (υγρής, στερεής) φάσης. Αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας, είτε δύο μη μιγνυόμενους διαλύτες (διαδικασία εκχύλισης), είτε υγρό ακινητοποιημένο σε στερεή επιφάνεια (TLC, χρωματογραφία χάρτου, GLC, HPLC). Αυτό επιτυγχάνεται με κατασκευή σφαιριδίων από αδρανές υλικό επικαλυμμένων με υγρή προσροφητική ουσία. Η διαφορετική κατανομή των συστατικών μεταξύ των δυο φάσεων

εξαρτάται κυρίως από τη διαφορετική τους διαλυτότητα σε αυτές. Η κατανομή αυτή μπορεί να εκφραστεί ποσοτικά με το συντελεστή κατανομής K , ο οποίος δίνεται από την εξίσωση 4.1.

Εξίσωση 4.1. Συντελεστής κατανομής

$$K = C_{\sigma.φ.} / C_{κ.φ.}$$

$C_{\sigma.φ.}$: συγκέντρωση ένωσης στη στατική φάση

$C_{κ.φ.}$: συγκέντρωση ένωσης στη κινητή φάση

Προσρόφηση: Στη χρωματογραφία προσρόφησης η στατική φάση περιέχει πεπερασμένο αριθμό θέσεων δέσμευσης για τα συστατικά του μίγματος. Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα προσρόφησης των ενώσεων του μίγματος στη στατική φάση. Η προσρόφηση εξαρτάται από τις ειδικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ενώσεων του μίγματος και των θέσεων δέσμευσης στη στατική φάση. Ενώσεις που έχουν μεγάλη συγγένεια με τη στατική φάση μετακινούνται πιο αργά και αντίστροφα. Η σχετική συγγένεια των συστατικών του μίγματος για τη στατική φάση είναι συνάρτηση της χημικής δομής της ένωσης, της φύσης της κινητής φάσης και της φύσης του προσροφητικού υλικού. Η συγγένεια των συστατικών για τη στατική φάση μπορεί να οφείλεται είτε σε δεσμούς υδρογόνου, είτε σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, είτε σε ιοντικές δυνάμεις. Όταν λαμβάνουν χώρα ιοντικές αλληλεπιδράσεις η τεχνική ονομάζεται χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Όταν λαμβάνουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις η τεχνική ονομάζεται χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Πρέπει να τονισθεί ότι δεν υπάρχει σαφής διάκριση μεταξύ προσρόφησης και κατανομής. Το φαινόμενο της προσρόφησης συμμετέχει σε μικρό βαθμό και στα άλλα είδη χρωματογραφίας, δεδομένου ότι οι περισσότερες ενώσεις έχουν έστω και μικρή προσροφητική ικανότητα ακόμη και για τα πιο αδρανή προσροφητικά υλικά.

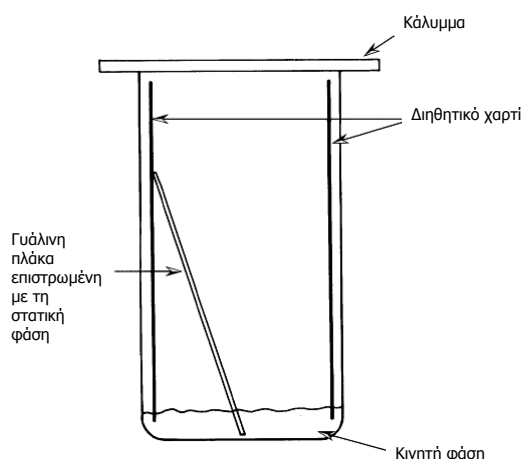
Χημική συγγένεια: Η χρωματογραφία χημικής συγγένειας είναι η εξέλιξη των μεθόδων χρωματογραφίας. Οι αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν πριν βασίζονται σε μη ειδικές φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων του μίγματος και της στατικής φάσης. Η ανάγκη για πιο εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις οδήγησε στην ανάπτυξη της χρωματογραφίας συγγένειας. Η τεχνική αυτή μιμείται τις βιολογικές λειτουργίες όπου η βιολογική δράση ενός μακρομορίου εκδηλώνεται συνήθως ύστερα από τη δέσμευση του σε ένα προσδέτη (ligand). Η χρωματογραφία χημικής συγγένειας περιλαμβάνει την ομοιοπολική δέσμευση ενός ειδικού προσδέτη στη στατική φάση. Ο προσδέτης αυτός συνδέεται εκλεκτικά με συγκεκριμένη χημική ομάδα στο μόριο συγκεκριμένης ένωσης ή ομάδας ενώσεων. Ο διαχωρισμός οφείλεται στην αυξημένη και εκλεκτική συγγένεια που δείχνει ο προσδέτης για συγκεκριμένη ένωση.

4.3. Επίπεδη χρωματογραφία

Ο όρος επίπεδη χρωματογραφία αναφέρεται στη χρωματογραφία χάρτου και στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Και τα δύο είδη αποτελούν παραδείγματα χρωματογραφίας κατανομής. Στη χρωματογραφία χάρτου η στατική φάση ενυδατώνεται και η κατανομή των συστατικών γίνεται μεταξύ του ακινητοποιημένου στη στατική φάση νερού και στο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών της κινητής φάσης. Η στατική φάση στην TLC είναι συνήθως ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της λεπτής στιβάδας του προσροφητικού

υλικού. Καθώς όμως μετακινείται η κινητή φάση κατά μήκος της στατικής μπορεί πολικά μόρια του διαλύτη να δεσμευτούν στη στατική φάση και να αποτελέσουν μέρος αυτής. Στην TLC, όταν η στατική φάση είναι silica gel, το φαινόμενο που επικρατεί είναι η προσρόφηση.

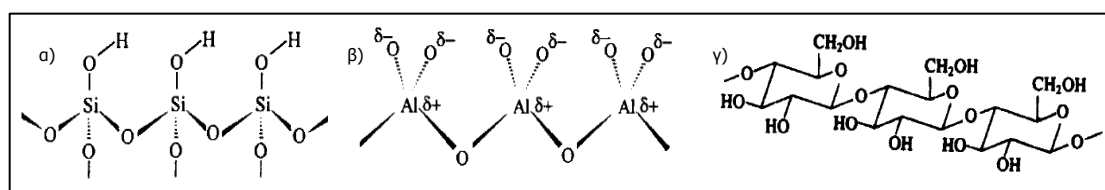
Στην επίπεδη χρωματογραφία η όλη διαδικασία του διαχωρισμού ονομάζεται «ανάπτυξη», η κινητή φάση ονομάζεται «σύστημα ανάπτυξης» και το ειδικό δοχείο που λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός «θάλαμος ανάπτυξης» (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3. Σχηματική αναπαράσταση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

4.3.1. Στατική φάση

Το υλικό στήριξης της στατικής φάσης μπορεί να είναι, είτε φύλλο χάρτου, είτε γυάλινη ή πλαστική πλάκα επικαλυμμένη με λεπτή στρώση προσροφητικού υλικού. Προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι το οξείδιο του αργιλίου, το οξείδιο του πυριτίου (silica), το πυριτικό μαγνήσιο, το υδροξείδιο του ασβεστίου, ο άνθρακας, η σακχαρόζη, η γη των διατόμων (kieselguhr, celite), η κυτταρίνη (cellulose) και το άμυλο (Σχήμα 4.4).



Σχήμα 4.4. Προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην επίπεδη χρωματογραφία α) silica gel β) οξείδιο του αργιλίου γ) κυτταρίνη

Το πιο διαδεδομένο προσροφητικό υλικό για την TLC είναι το οξείδιο του πυριτίου που ονομάζεται επίσης silica ή silicic acid. Όλοι οι παραπάνω όροι αναφέρονται στο υλικό που προκύπτει από την υδρόλυση του πυριτικού νατρίου σε πυριτικό οξύ παρουσία οξέος. Η περαιτέρω συμπύκνωση και πολυμερισμός οδηγεί στη δημιουργία του υλικού silica gel. Η παραπάνω διαδικασία παρασκευής μπορεί να ελεγχθεί ώστε να προκύψει προσροφητικό υλικό υψηλής καθαρότητας, με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (όγκος πόρων, μέγεθος πόρων, ειδική επιφάνεια). Η ικανότητα διαχωρισμού της ανάλυσης εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού και τη διασπορά του μεγέθους τους. Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος των σωματιδίων και πιο ομοιόμορφο (μικρή διασπορά) τόσο αυξάνει η ικανότητα

διαχωρισμού. Σε αρκετές περιπτώσεις προστίθεται στο υλικό της silica gel και κάποια άλλη ένωση με σκοπό να αυξηθεί η ικανότητα δέσμευσης των συστατικών. Για παράδειγμα η κατάληξη G (silica gel-G) δηλώνει ότι στο υλικό έχει προστεθεί θειικό ασβέστιο. Η ικανότητα δέσμευσης των συστατικών στο προσροφητικό υλικό καθορίζει την ενεργότητα του. Στην silica gel οι ενεργές ομάδες, το σημείο σύνδεσης των ενώσεων, είναι κυρίως τα ελεύθερα -OH τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις ενώσεις.

Για την κατασκευή της λεπτής στιβάδας πάνω στην πλάκα της χρωματογραφίας, αναμιγνύεται αρχικά το υλικό σε νερό και ανακατεύεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιόμορφη πηκτή η οποία επιστρώνεται πάνω σε γυάλινες πλάκες και αφήνεται να στεγνώσει. Πριν το διαχωρισμό απαιτείται η «ενεργοποίηση» των πλακών δηλαδή η θέρμανση τους ώστε να φύγει το νερό που έχει δεσμευτεί, με δεσμούς υδρογόνου, στις ενεργές ομάδες.

4.3.2. Κινητή φάση

Η κινητή φάση (σύστημα ανάπτυξης) αποτελείται από συνδυασμό διαλυτών διαφορετικής πολικότητας. Διάφορα συστήματα ανάπτυξης έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των βιομορίων. Ένας γενικός κανόνας είναι ότι για το διαχωρισμό των σχετικά πολικών μορίων χρησιμοποιούνται σχετικά πολικά συστήματα ανάπτυξης και αντιστρόφως. Η πολικότητα του συστήματος ανάπτυξης εξαρτάται από τη σχετική αναλογία των διαλυτών που περιέχει. Οι πολικότητες των συνήθως χρησιμοποιούμενων διαλυτών φαίνονται στο παράρτημα 5.

Το σύστημα ανάπτυξης τοποθετείται μέσα σε ειδικό θάλαμο (θάλαμος ανάπτυξης) και αφήνεται ώστε να κορεστεί ο θάλαμος με τους ατμούς των διαλυτών του συστήματος ανάπτυξης (εξισορρόπηση). Για πιο γρήγορη εξισορρόπηση τοποθετείται στο πίσω τοίχωμα του θαλάμου διηθητικό χαρτί. Η προ-εξισορρόπηση του θαλάμου οδηγεί σε καλύτερο και επαναλήψιμο διαχωρισμό των συστατικών. Στη χρωματογραφία χάρτου η κινητή φάση μπορεί να έχει κατεύθυνση, είτε προς τα πάνω (ανιούσα χρωματογραφία χάρτου), είτε προς τα κάτω (κατιούσα χρωματογραφία χάρτου), σε αντίθεση με αυτή της λεπτής στιβάδας που η κατεύθυνση της είναι πάντα προς τα πάνω.

4.3.3. Διαδικασία ανάπτυξης

Το δείγμα του προς διαχωρισμό μίγματος εξατμίζεται και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο πτητικού διαλύτη. Η πολικότητα του διαλύτη πρέπει να είναι η μικρότερη δυνατή ώστε να μην δεσμεύεται ισχυρά στη στατική φάση.

Μια μικρή σταγόνα από το δείγμα τοποθετείται πάνω στη στατική φάση και αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης του δείγματος. Επαναλαμβάνεται αυτό μέχρι να τοποθετηθεί ικανοποιητική ποσότητα δείγματος. Η ποσότητα του δείγματος που τοποθετείται είναι κρίσιμη για να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός. Πρέπει να είναι αρκετή ώστε να ανιχνευτούν οι κηλίδες των συστατικών μετά το διαχωρισμό αλλά όχι πολύ μεγάλη γιατί θα δημιουργηθούν "ουρές" στις κηλίδες ή θα αλληλεπικαλυφθούν και δε θα γίνει σωστός διαχωρισμός. Στη συνέχεια τοποθετείται η πλάκα ή το φύλλο χαρτιού μέσα σε κλειστό προ-εξισορροπημένο θάλαμο που περιέχει το σύστημα ανάπτυξης. Η κινητή φάση αρχίζει να κινείται κατά μήκος της στατικής φάσης λόγω τριχοειδικών φαινομένων. Η ανάπτυξη μπορεί να διαρκέσει από λίγα λεπτά έως και μερικές ώρες. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τα συστατικά μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα και διαχωρίζονται. Όταν η κινητή φάση φτάσει στο πάνω μέρος της

πλάκας (ή του χάρτου), απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και αφήνεται να εξατμιστούν οι διαλύτες της κινητής φάσης.

4.3.4. Θεωρία διαχωρισμού

Όταν το δείγμα τοποθετείται σε μια πολική στατική φάση (χρωματογραφία κανονικής φάσης, normal phase) οι ενώσεις θα δημιουργήσουν δεσμούς με τις πολικές ομάδες αυτής. Όσο πιο πολική είναι μια ένωση τόσο πιο ισχυροί δεσμοί θα δημιουργηθούν με τη στατική φάση και αντίστροφα. Κατά τη διέλευση της κινητής φάσης τα μόρια του διαλύτη θα ανταγωνίζονται με τα συστατικά του μίγματος για τις θέσεις πρόσδεσης πάνω στη στατική φάση. Οι ενώσεις που έχουν προσροφηθεί ασθενώς στη στατική φάση θα εκτοπισθούν από τα μόρια του διαλύτη (κινητή φάση) πιο εύκολα και θα προχωρήσουν πιο γρήγορα κατά μήκος της στατικής φάσης για να βρουν νέες θέσεις πρόσδεσης. Το πόσο εύκολα θα εκτοπισθούν οι ενώσεις από την κινητή φάση εξαρτάται από την πολικότητα τους και την πολικότητα της κινητής φάσης. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των μορίων της κινητής φάσης και των προς διαχωρισμό ενώσεων επαναλαμβάνεται πολλές φορές (θεωρητικά άπειρες) κατά μήκος της πλάκας μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ανάπτυξης. Μετά το τέλος της ανάπτυξης οι άπολες ενώσεις που ανταγωνίζονται λιγότερο τη κινητή φάση θα έχουν προχωρήσει περισσότερο ενώ οι πολικές ενώσεις θα έχουν προχωρήσει λιγότερο πάνω στη στατική φάση. Η σειρά αυτή δε θα αλλάξει ποτέ σε μια πολική στατική φάση και είναι ανεξάρτητη από την πολικότητα της κινητής φάσης. Η πολικότητα της κινητής φάσης μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα μετακίνησης των μορίων όχι όμως τη σχετική τους θέση.

Στην περίπτωση που το δείγμα τοποθετείται σε μια άπολη στατική φάση θα συμβεί η αντίστροφη διαδικασία δηλαδή θα μετακινηθούν πιο γρήγορα τα πολικά συστατικά του μίγματος και πιο αργά τα άπολα. Για αυτό το λόγο αυτό το είδος χρωματογραφίας λέγεται χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (reversed phase chromatography).

4.3.5. Ανίχνευση

Μετά το τέλος της ανάπτυξης οι ενώσεις του μίγματος έχουν διαχωριστεί κατά μήκος της πλάκας (ή του χαρτιού) δημιουργώντας διαφορετικές κηλίδες. Οι κηλίδες τους όμως δεν είναι εμφανείς παρά μόνο εάν είναι έγχρωμες ενώσεις. Για τις έγχρωμες ενώσεις, η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ενώσεις οι οποίες περιέχουν πολλούς συζυγιακούς διπλούς δεσμούς μπορούν να ανιχνευτούν από το φθορισμό που εκπέμπουν με χρήση λάμπας UV. Ο πιο απλός τρόπος ανίχνευσης είναι με τη χρήση μη ειδικών αντιδραστηρίων εμφάνισης όπως είναι οι ατμοί ιωδίου ή το θειικό οξύ. Η τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς ιωδίου έχει ως αποτέλεσμα το ιώδιο να προσφροφάται σχεδόν σε όλες τις οργανικές ενώσεις (περισσότερο στις ακόρεστες) και να δίνει χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα στις κηλίδες. Ο ψεκασμός με θειικό οξύ και στη συνέχεια θέρμανση της πλάκας πάνω από 150 °C οδηγεί σε απανθράκωση των μορίων και εμφάνιση μαύρων κηλίδων πάνω στη πλάκα όπου υπάρχει οργανική ένωση. Εναλλακτικά, μπορεί η πλάκα να ψεκαστεί με χημικές ενώσεις που δίνουν έγχρωμα προϊόντα όταν αντιδράσουν με συγκεκριμένες χημικές ομάδες στα μόρια των ενώσεων του μίγματος. Τέτοια αντιδραστήρια εμφάνισης είναι το μολυβδαινικό οξύ για την ανίχνευση των φωσφορικών ομάδων, η νινυδρίνη για την ανίχνευση των ελεύθερων αμινομάδων, η ναφθόλη για τα σάκχαρα κ.α.

Εάν κατά το διαχωρισμό έχουν χρησιμοποιηθεί επισημασμένες ενώσεις η ανίχνευση μπορεί να γίνει και με μέτρηση της ραδιενέργειας.

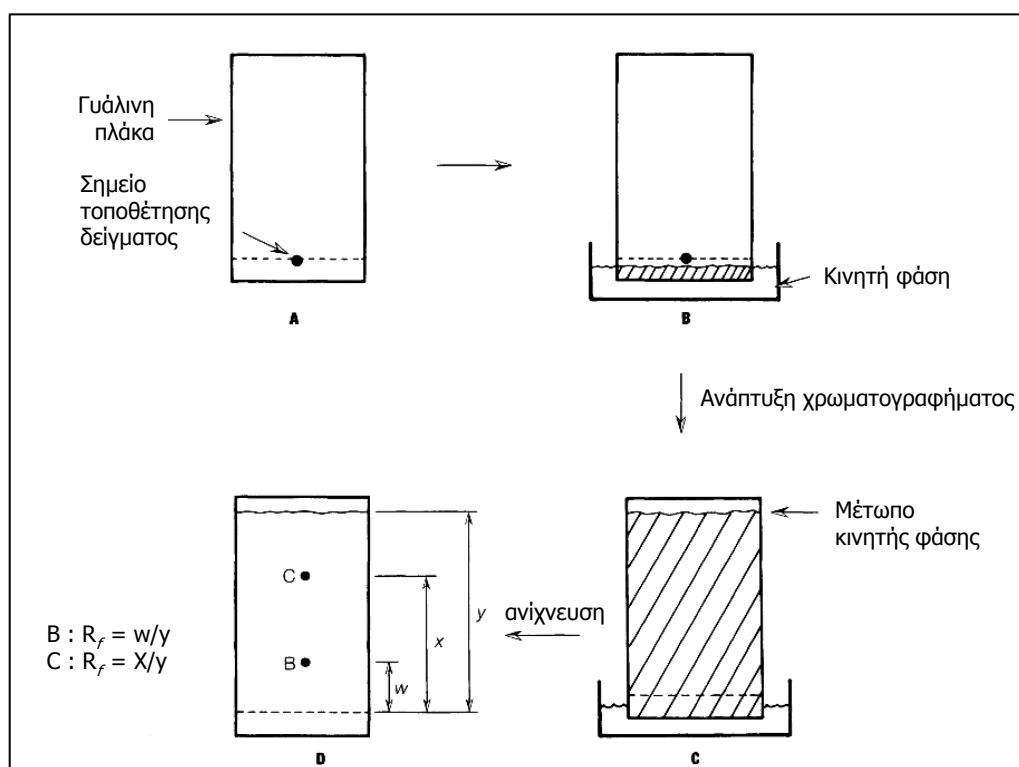
4.3.6. Ποιοτική ανάλυση των κηλίδων

Η κάθε ένωση του μίγματος, εξαιτίας της διαφορετικής συγγένειας που έχει για τη στατική και την κινητή φάση, μετακινείται με διαφορετική ταχύτητα. Επειδή η ταχύτητα του κάθε συστατικού είναι δύσκολο να μετρηθεί, η μετακίνηση του κάθε συστατικού μπορεί να εκφραστεί με τον συντελεστή ανάσχεσης (retention factor, R_f) που αναφέρεται στη σχετική μετακίνηση της ένωσης ως προς τη μετακίνηση της κινητής φάσης (Εξίσωση 4.2, Σχήμα 4.5).

Εξίσωση 4.2. Συντελεστής ανάσχεσης, R_f

R_f = απόσταση που διένυσε η ένωση / απόσταση που διένυσε η κινητή φάση

Κάθε συστατικό έχει χαρακτηριστική τιμή R_f για συγκεκριμένες συνθήκες χρωματογραφήματος, δηλαδή ίδια στατική φάση, κινητή φάση και θερμοκρασία. Η τοποθέτηση παράλληλα με το δείγμα πρότυπων ενώσεων στη χρωματογραφική πλάκα δίνει τη δυνατότητα της ταυτοποίησης ουσιών συγκρίνοντας τις τιμές R_f των άγνωστων συστατικών με τις τιμές R_f των πρότυπων ενώσεων. Η ταυτοποίηση αυτή μαζί με τη χρήση των ειδικών αντιδραστηρίων ψεκασμού μας δίνει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή των συστατικών (Σχήμα 4.5).



Σχήμα 4.5. Σχηματικό διάγραμμα ανάπτυξης χρωματογραφίας TLC και υπολογισμός του R_f .

Πρέπει να τονισθεί όμως ότι μια κηλίδα στην TLC μπορεί να αποτελείται από μίγμα δομικά παρόμοιων ενώσεων και χρειάζονται και άλλες τεχνικές περαιτέρω διαχωρισμού (HPLC, GC) καθώς και πιστοποίησης δομής όπως φασματομετρία μάζας (MS) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

4.3.7. Ποσοτική ανάλυση των κηλίδων

Η ποσοτική ανάλυση γίνεται με ειδικά όργανα που σαρώνουν τη χρωματογραφική πλάκα και είτε μετράνε την οπτική πυκνότητα των κηλίδων (πυκνόμετρα), είτε τη ραδιενέργεια εάν πρόκειται για επισημασμένες ενώσεις, είτε το φθορισμό εάν πρόκειται για φθορίζοντα συστατικά. Σε κάθε περίπτωση το μετρούμενο μέγεθος είναι ανάλογο της ποσότητας του συστατικού.

4.3.8. Παραλαβή συστατικών

Σε αρκετές περιπτώσεις κρίνεται σκόπιμο να ανακτηθούν τα συστατικά μετά το διαχωρισμό, είτε γιατί απαιτείται ο περαιτέρω διαχωρισμός τους με άλλο είδος χρωματογραφίας, είτε γιατί θέλουμε να προχωρήσουμε σε πλήρη πιστοποίηση της δομής τους, είτε γιατί θέλουμε να προσδιορίσουμε τη βιολογική τους δράση. Στην περίπτωση της TLC αυτό επιτυγχάνεται με απόξυση του προσροφητικού υλικού από την πλάκα (στην περιοχή της κηλίδας), τοποθέτησή του σε σωλήνα και εκχύλιση του συστατικού με κατάλληλο διαλύτη. Στη χρωματογραφία χάρτου κόβεται η περιοχή του χαρτιού που βρίσκεται το συστατικό και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

4.4. Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χωρίζεται σε δύο βασικά είδη, τη χρωματογραφία ανοικτής στήλης και την χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High pressure liquid chromatography, HPLC) (κλειστού συστήματος) η οποία είναι ουσιαστικά η εξελιγμένη αυτής. Ανάλογα το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού τα βασικά είδη χρωματογραφίας στήλης είναι η χρωματογραφία κατανομής/προσρόφησης, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η χρωματογραφία μοριακής διήθησης, και η χρωματογραφία χημικής συγγένειας.

4.4.1. Χρωματογραφία κατανομής / προσρόφησης

Ο διαχωρισμός σε κατανομή και προσρόφηση δεν έχει πρακτική αξία στη χρωματογραφία στήλης για αυτό και θα εξετασθούν μαζί.

Στατική φάση: Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν στην επίπεδη χρωματογραφία. Στον πίνακα 4.2 φαίνονται προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για το διαχωρισμό των βιομορίων. Χαρακτηριστικά των υλικών, δηλαδή το μέγεθος των πόρων, το μέγεθος των σωματιδίων και η ενεργή τους επιφάνεια, παίζουν ρόλο στο διαχωρισμό.

Κινητή φάση: Η κινητή φάση (σύστημα έκλουσης) παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της κατανομής/προσρόφησης. Συνηθίζεται στην αρχή του χρωματογραφήματος να χρησιμοποιείται κινητή φάση με μέτρια ικανότητα δέσμευσης στη στατική φάση και στη συνέχεια, εάν χρειάζεται, αυξάνεται η ικανότητα δέσμευσης της. Για πολικές στατικές φάσεις (π.χ. silica, αλουμίνα) όσο πιο πολική είναι η κινητή φάση (Παράρτημα 5) τόσο πιο μεγάλη ικανότητα δέσμευσης έχει. Το αντίθετο συμβαίνει στις άπολες στατικές φάσεις (π.χ. άνθρακας).

Πίνακας 4.1. Συνήθη προσροφητικά υλικά για την ανάλυση των βιομορίων.

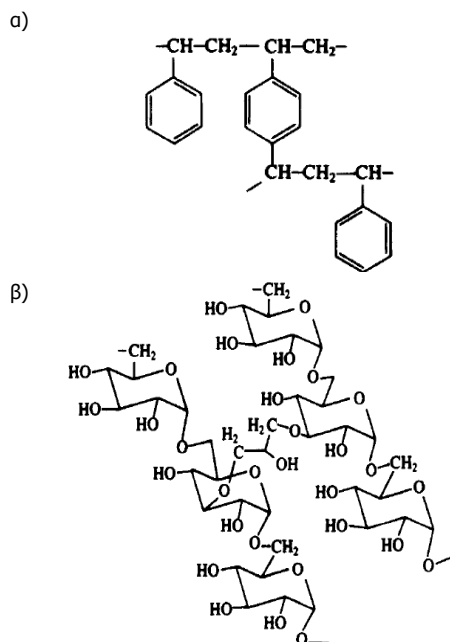
Προσροφητικό υλικό	Εφαρμογή
Αλουμίνα	Στερόλες, λιποειδή, βιταμίνες
Silica gel	Αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιποειδή
Πυριτικό μαγνήσιο	Ουδέτερα λιποειδή, αλκαλοειδή
Υδροξυαπατίτης (φωσφορικό ασβέστιο)	Πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα
Υδροξείδιο του ασβεστίου	Καρτενοειδή
Άμυλο	Πουρίνες
Celite (γη διατόμων)	Κορτικοστεροειδή
Kieselguhr (γη διατόμων)	Πρωτεΐνες
Κυτταρίνη (cellulose)	Φαινόλες
Άνθρακας	Πεπτίδια, αμινοξέα, υδατάνθρακες

Θεωρία διαχωρισμού: Ο διαχωρισμός γίνεται βάση της διαφορετικής προσρόφησης/κατανομής των ενώσεων μεταξύ των δυο φάσεων και ισχύουν αυτά που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 4.3.4.

4.4.2. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Ο διαχωρισμός στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια φορτισμένων ιόντων ή μορίων, σε διάλυμα, για φορτισμένες ομάδες που έχουν ακινητοποιηθεί σε στερεή επιφάνεια (στατική φάση).

Στατική φάση: Υπάρχουν γενικά δύο είδη στατικής φάσης στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής: α) υλικά στα οποία οι φορτισμένες ομάδες βρίσκονται ακινητοποιημένες σε συνθετική ρητίνη (πολυστυρόλιο) και β) υλικά στα οποία οι φορτισμένες ομάδες βρίσκονται ακινητοποιημένες σε πολυσακχαρική ρητίνη (δεξτράνη ή κυτταρίνη). Στα υλικά αυτά η ύπαρξη πλευρικών ομάδων δημιουργεί ένα τρισδιάστο πλέγμα. Ο βαθμός της διασταύρωσης της ρητίνης παίζει σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό. Σε μια ρητίνη με λίγες διασταυρώσεις (μεγάλο μέγεθος πόρων) η εξισορρόπηση ανταλλαγής ιόντων γίνεται πιο εύκολα αλλά με μικρή εκλεκτικότητα ενώ σε μια πηκτή με πολλές διασταυρώσεις (μικρό μέγεθος πόρων) τα μεγάλα ιόντα αποκλείονται από τη ρητίνη. Ένας βαθμός διασταύρωσης 4-8% θεωρείται ικανοποιητικός. Οι επιθυμητές φορτισμένες ομάδες προστίθενται σε αυτές τις τρισδιάστατες μήτρες και προκύπτουν τα διαφορετικά υλικά της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής.



Σχήμα 4.6. α) Μέρος της δομής πολυστυρολίου β) Μέρος της δομής της διασταυρούμενης δεξτράνης

Στη συνέχεια τα υλικά χωρίζονται σε αυτά που έχουν αρνητικό φορτίο και ονομάζονται κατιονικά (ανταλλάσσουν θετικά φορτία) και σε αυτά που έχουν θετικό φορτίο και ονομάζονται ανιονικά (ανταλλάσσουν αρνητικά φορτία). Οι κατιονικές ρητίνες έχουν όξινες ομάδες ενώ οι ανιονικές βασικές ομάδες. Ένας επιπλέον διαχωρισμός γίνεται με βάση το πόσο ισχυρή είναι η ομάδα και χωρίζονται σε ισχυρά όξινη ή βασική και ασθενώς όξινη ή βασική ρητίνες. Στον πίνακα 4.3 συνοψίζονται μερικές από τις πιο κοινές ρητίνες καθώς και τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 4.2. Χαρακτηριστικές ρητίνες ιονανταλλαγής

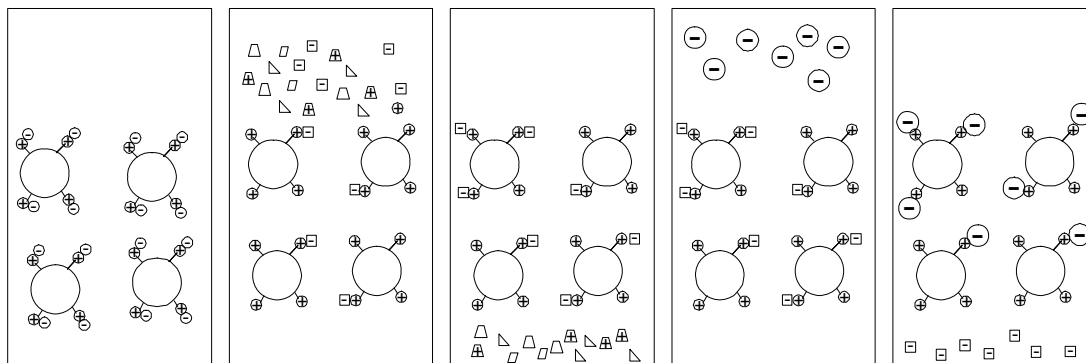
Όνομα	Μήτρα	Ενεργός ομάδα	Είδος
Dowex 50	Πολυστυρένιο	SO ³⁻	Κατιονική - ισχυρή
IRC - 150	Πολυστυρένιο	CH ₂ -COO ⁻	Κατιονική - ασθενής
Dowex 3	Πολυστυρένιο	CH ₂ -N ⁺ (CH ₃)	Ανιονική - ισχυρή
Dowex 1	Πολυστυρένιο	CH ₂ -NH ₃ ⁺	Ανιονική - ασθενής
DEAE- κυτταρίνη	Κυτταρίνη	CH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₃ CH ₃) ₂	Ανιονική - ασθενής
DEAE-sephadex	Δεξτράνη	CH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₃ CH ₃) ₂	Ανιονική - ασθενής
CM- κυτταρίνη	Κυτταρίνη	CH ₂ COO ⁻	Κατιονική - ασθενής
CM- sephadex	Δεξτράνη	CH ₂ COO ⁻	Κατιονική - ασθενής
P- sephadex	Δεξτράνη	PO ₄ ²⁻	Κατιονική - ισχυρή

CM: Καρβοξυμέθυλο-, DEAE: Διαιθυλοαμινοαιθυλο-

Κινητή φάση: Το σύστημα έκλουσης είναι συνήθως διάλυμα άλατος. Τα ιόντα του άλατος ανταγωνίζονται με τα συστατικά του δείγματος για τις φορτισμένες ομάδες πάνω στη στατική φάση. Χαρακτηριστικά επομένως της κινητής φάσης είναι η φύση του άλατος (των ιόντων του) που θα επιλεγεί και η συγκέντρωσή του. Η επιλογή του κατάλληλου ιόντος εξαρτάται από το είδος της ρητίνης. Ισχυρές ιονανταλλακτικές ρητίνες (Πίνακας 4.3) σχηματίζουν σταθερά άλατα με ιόντα ισχυρών οξέων ή βάσεων (Na⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻) και λιγότερο σταθερά

με τα ιόντα ασθενών οξέων (NH_4^+ , HCOO^- , HCO_3^-). Αντιθέτως, ασθενείς ρητίνες σχηματίζουν μέτριας σταθερότητας άλατα με ιόντα ισχυρών οξέων ή βάσεων και ασταθή με τα ιόντα ασθενών οξέων. Έτσι ένα διάλυμα ισχυρού ιόντος μπορεί να εκτοπίσει ένα ασθενές ιόν από τη στατική φάση. Ανάλογα το είδος της ρητίνης υπάρχουν πίνακες με τη σειρά προτίμησης των ιόντων, γενικά όμως τα πολυσθενή ιόντα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τη ρητίνη. Τέλος, πολύ βασική παράμετρος είναι η συγκέντρωση του ιόντος στο σύστημα έκλουσης γιατί όταν αυξηθεί πολύ θα εκτοπίσει τα ιόντα (ενώσεις του δείγματος). Αυτό που συνήθως εφαρμόζεται είναι να γίνεται η έκλυση με μια σειρά διαλυμάτων αυξανόμενης αλατότητας (σταδιακή έκλυση) ή με συνεχόμενη αύξηση της αλατότητας (βαθμιδωτή έκλυση).

Θεωρία διαχωρισμού: Η στατική φάση έχει φορτισμένες ομάδες θετικές ή αρνητικές. Τα ιόντα της στατικής φάσης σχηματίζουν δεσμούς ιοντικής φάσης με τα ιόντα της κινητής φάσης (συμπληρωματικά ιόντα) (Σχήμα 4.7). Όταν τοποθετηθεί το μίγμα στη στήλη ενώσεις με διαφορετικά φορτία (αρνητικό ή θετικό ή ουδέτερο) θα εισέλθουν στη στατική φάση. Οι ενώσεις που έχουν φορτίο όμοιο με τη στήλη ή δεν είναι φορτισμένες θα προχωρήσουν με τη κινητή φάση καθώς αυτή θα διέρχεται από τη στήλη. Οι ενώσεις που έχουν αντίθετο φορτίο από τη στήλη θα δεσμευτούν αντιστρεπτά σε αυτήν. Το πόσο ισχυρά θα δεσμευτούν εξαρτάται από το φορτίο τους. Όσο περισσότερο φορτισμένη είναι μια ένωση τόσο πιο ισχυρά θα δεσμευτεί. Οι δεσμευμένες ενώσεις απελευθερώνονται από τη στατική φάση με προσθήκη συστήματος έκλουσης που περιέχει αυξημένη ιοντική ισχύ, ή διαφορετικό pH. Η απελευθέρωση των ενώσεων στην αυξημένη ιοντική ισχύ γίνεται λόγω εκτόπισης (ανταλλαγή ιόντων), και στο διαφορετικό pH λόγω εξασθένησης των αλληλεπιδράσεων εξαιτίας της μεταβολής του φορτίου των ενώσεων. Όταν η στατική φάση έχει αρνητικό φορτίο και τα προς διαχωρισμό συστατικά έχουν θετικό φορτίο γίνεται ανταλλαγή κατιόντων και η διαδικασία καλείται κατιονανταλλαγή. Η αντίστροφη διαδικασία καλείται ανιονανταλλαγή.



Σχήμα 4.7. Σχηματική αναπαράσταση της θεωρίας της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

4.4.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

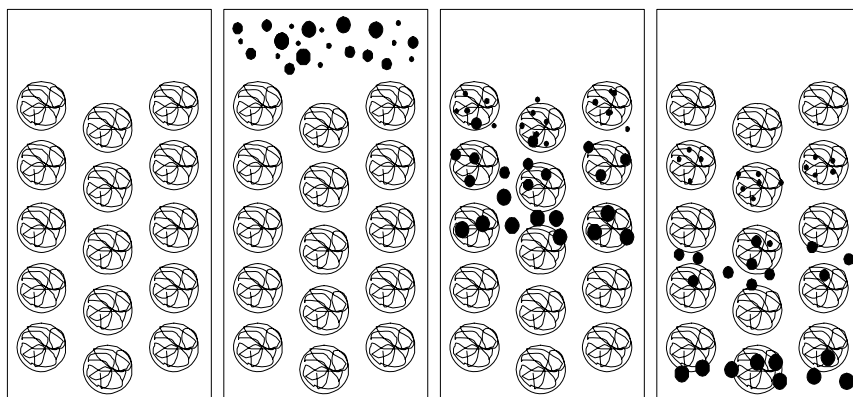
Στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, ή χρωματογραφία μοριακής διήθησης ή μοριακό κόσκινο, ο διαχωρισμός οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος των ενώσεων.

Στατική φάση: Τα υλικά που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι η δεξτράνη, το πολυακρυλαμίδιο, η αγαρόζη (shepharose) και η silica. Τα υλικά αυτά είναι πορώδη πολυμερή και λειτουργούν ως μοριακά κόσκινα. Το μέγεθος επομένως των πόρων σε αυτά καθορίζει το διαχωρισμό αφού

ενώσεις οι οποίες έχουν μεγαλύτερο μέγεθος (μεγάλο μοριακό βάρος) από τους πόρους της πηκτής αποκλείονται από αυτούς. Βασικά χαρακτηριστικά των πηκτών στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι: α) το «όριο αποκλεισμού» δηλαδή το μοριακό βάρος του μικρότερου μορίου που μπορεί να εισχωρήσει στους πόρους της πηκτής και β) το «εύρος διαχωρισμού» δηλαδή το εύρος των μοριακών βαρών των μορίων που μπορούν να διαχωριστούν. Όλα τα μόρια που έχουν μοριακό βάρος πάνω από το όριο αποκλεισμού εκκλούνται από τη στήλη μέσω του νεκρού όγκου χωρίς να εισέρχονται στους πόρους της πηκτής. Τα μόρια που βρίσκονται μέσα στο εύρος διαχωρισμού, διαχωρίζονται από τη πηκτή με σχεδόν γραμμικό τρόπο. Ο πιο απλός διαχωρισμός με εφαρμογή της χρωματογραφίας αποκλεισμού είναι ο διαχωρισμός του δείγματος σε δυο ομάδες μια με ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και μια με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (εξαλάτωση, απομάκρυνση προσμίξεων). Ο κλασματικός διαχωρισμός οδηγεί σε παραλαβή κλασμάτων με ενώσεων μειούμενου μοριακού βάρους.

Κινητή φάση: Δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι περιορισμοί για την επιλογή του συστήματος έκλουσης αφού συνήθως τα μόρια του διαλύτη ή των ιόντων εάν πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα έχουν πολύ μικρότερο μοριακό βάρος από τα προς διαχωρισμό βιομόρια. Βασική προϋπόθεση είναι να είναι συμβατό με τα συστατικά του δείγματος δηλαδή να είναι διαλυτά σε αυτό και ειδικά για τις πρωτεΐνες να μην καταστρέφεται η δομή τους.

Θεωρία διαχωρισμού: Η στατική φάση αποτελείται από αδρανή σωματίδια τα οποία έχουν συγκεκριμένο μέγεθος πόρων. Η παρατήρηση των σωματιδίων στο μικροσκόπιο θα έδειχνε ότι μοιάζουν με σφουγγάρι. Όταν φορτωθεί η στήλη με το δείγμα τα συστατικά διαφορετικού μεγέθους θα εισέλθουν στη στατική φάση και καθώς το σύστημα έκλουσης μετακινείται κατά μήκος της στήλης θα μετακινούνται και αυτά. Τα μεγάλου μεγέθους συστατικά δε θα χωράνε να εισέλθουν στους πόρους των σωματιδίων (αποκλείονται) με αποτέλεσμα να περιορίζονται στο χώρο ανάμεσα στα σωματίδια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην καθυστερεί η κίνηση τους κατά μήκος της στήλης και να εκκλούνται γρήγορα. Τα μικρού μεγέθους μόρια θα διαχέονται μέσα και έξω από τους πόρους των σωματιδίων κατά μήκος της στήλης, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η κίνηση τους και να εκκλούνται πιο αργά. Τα μεσαίου μεγέθους συστατικά θα κινούνται με μια ενδιάμεση ταχύτητα σε σχέση με αυτή των μεγάλων και μικρών. Επομένως η σειρά έκλουσης των συστατικών είναι ανάλογη του μοριακού τους μεγέθους (Σχήμα 4.8).



Σχήμα 4.8. Σχηματική αναπαράσταση της θεωρίας της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών.

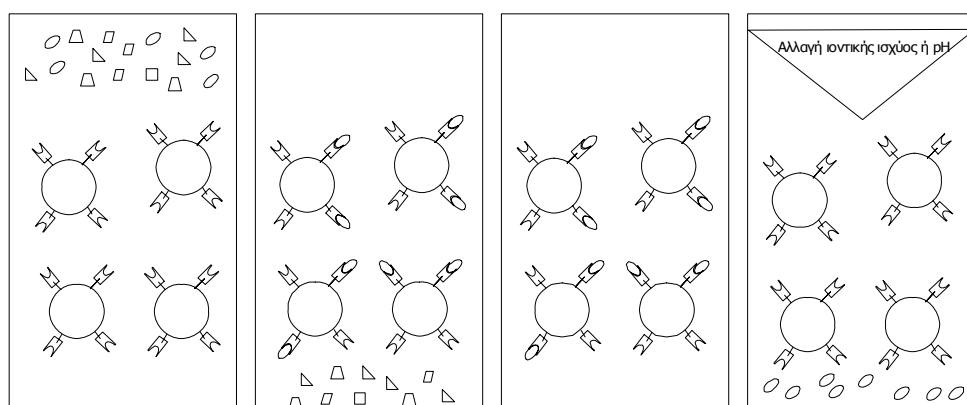
4.4.4. Χρωματογραφία χημικής συγγένειας

Στη χρωματογραφία χημικής συγγένειας ο διαχωρισμός οφείλεται στην ειδική δέσμευση (εκλεκτική) των ενώσεων στη στατική φάση.

Στατική φάση: Ως υλικά για τη μήτρα της στατικής φάσης συνήθως χρησιμοποιούνται το πολυακρυλαμίδιο, η αγαρόζη (shepharose) και το πολυβινύλιο. Τα υλικά αυτά έχουν το πλεονέκτημα της δυνατότητας δημιουργίας μεγάλων πόρων στην πηκτή, εμφανίζουν σχετικά μικρή μη ειδική προσρόφηση και έχουν λειτουργικές χημικές ομάδες, στις οποίες μπορούν να δεσμευτούν οι προσδέτες για τη χρωματογραφία συγγένειας. Ο προσδέτης που θα ενωθεί ομοιοπολικά πάνω στη μήτρα εξαρτάται από τη χημική δομή του μορίου που θέλουμε να απομονώσουμε. Θα πρέπει να συνδέεται ισχυρά, ειδικά, άλλα και αντιστρεπτά στο μόριο προς διαχωρισμό. Για παράδειγμα εάν θέλουμε να απομονώσουμε τον υποδοχέα κάποιας ορμόνης, η ίδια η ορμόνη θα είναι ο προσδέτης ενώ εάν θέλουμε να απομονώσουμε ένα αντίσωμα το αντιγόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσδέτης. Τα υλικά μπορεί να χωριστούν σε αυτά που έχουν προσδέτη ειδικό για μια ένωση ή αυτά που έχουν προσδέτη ειδικό για μια ομάδα ενώσεων.

Κινητή φάση: δεν υπάρχει συγκεκριμένος περιορισμός στην επιλογή της κινητής φάσης. Βασική προϋπόθεση είναι να διαλύονται οι ενώσεις του δείγματος σε αυτό.

Θεωρία διαχωρισμού: Η στατική φάση αποτελείται από αδρανές υλικό πάνω στο οποίο έχει ακινητοποιηθεί με ομοιοπολικό τρόπο ένας προσδέτης. Ο προσδέτης αυτός συνδέεται εκλεκτικά με συγκεκριμένη χημική ομάδα στο μόριο συγκεκριμένου συστατικού ή ομάδας συστατικών. Όταν φορτωθεί η στήλη με το δείγμα τα συστατικά θα εισέλθουν στη στατική φάση και καθώς το σύστημα έκλουσης μετακινείται κατά μήκος της στήλης θα μετακινούνται και αυτά. Τα συστατικά τα οποία δεσμεύονται ειδικά με τον προσδέτη θα παραμείνουν στη στατική φάση ενώ τα υπόλοιπα θα εκλουστούν από τη στήλη. Η έκλυση στη συνέχεια του συστατικού που μας ενδιαφέρει μπορεί να γίνει, είτε με σύστημα έκλουσης που περιέχει ελεύθερο τον προσδέτη, είτε αλλάζοντας το pH ή την ιονική ισχύ του συστήματος ανάπτυξης, όπως στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής, είτε χρησιμοποιώντας χαοτροπικά αντιδραστήρια.



Σχήμα 4.9. Αρχή της χρωματογραφίας συγγένειας

4.4.5. Χρωματογραφία ανοικτής στήλης

Για την περιγραφή των διαφόρων διαδικασιών στη χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται ειδική ορολογία η οποία φαίνεται στον Πίνακα 4.4.

Στήλη: Στην περίπτωση της χρωματογραφίας ανοικτής στήλης το υλικό της στήλης είναι γυαλί ή πλαστικό. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της στήλης τόσο πιο αποτελεσματικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται. Πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη ότι όσο αυξάνει το μήκος της στήλης μειώνεται η ροή της κινητής φάσης, αυξάνει ο όγκος έκλουσης των ενώσεων και ο χρόνος ανάλυσης. Για παρασκευαστικής κλίμακας ανάλυση το μήκος της στήλης κυμαίνεται στα 20-50 cm και η διάμετρος στα 0,5-5 cm. Στο κάτω μέρος της στήλης υπάρχει πορώδες γυάλινο φίλτρο για τη σταθεροποίηση του υλικού της στατικής φάσης.

Πίνακας 4.3. Ορολογία που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία στήλης

Ορολογία	Διαδικασία
Πακετάρισμα	Η τοποθέτηση του προσροφητικού υλικού στη στήλη
Σύστημα έκλουσης	Η κινητή φάση
Φόρτωμα	Η τοποθέτηση του δείγματος στη στήλη
Έκλουση	Η μετακίνηση της κινητής φάσης και των συστατικών κατά μήκος της στήλης
Όγκος στήλης	Ο συνολικός όγκος της στατικής φάσης και της κινητής φάσης μέσα σε αυτή
Νεκρός όγκος	Ο όγκος μόνο της κινητής φάσης (του υγρού)
Όγκος έκλουσης συστατικού	Ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται για να εξέλθει ένα συστατικό από τη στήλη

Πακετάρισμα στήλης: Για το πακετάρισμα του υλικού της στατικής φάσης δημιουργείται ένα εναιώρημα (χυλός) από το προσροφητικό υλικό σε κατάλληλο διαλύτη ή ρυθμιστικό διάλυμα. Συνήθως για τη δημιουργία του χυλού χρησιμοποιείται ο διαλύτης ή το ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελεί το αρχικό σύστημα έκλουσης. Σημειώνεται στη στήλη το επιθυμητό ύψος που θέλουμε να καταλάβει η στατική φάση και ο χυλός αποχύνεται ομοιόμορφα στη στήλη έως ότου το υλικό φτάσει στο επιθυμητό ύψος. Ακολουθεί συνεχόμενη ροή του διαλύτη ώστε τα σωματίδια του υλικού να κατανεμηθούν ομοιόμορφα (καλό πακετάρισμα) στη στήλη. Η περίσσεια του διαλύτη εκλούεται από το κάτω μέρος της στήλης. Για να επιτευχθεί καλό πακετάρισμα του υλικού πληρώσης της στήλης, θα πρέπει να διέλθει από αυτή ποσότητα διαλύτη ίση με 8 φορές τον όγκο της στήλης (Εξίσωση 4.3). Η στατική φάση πρέπει να καλύπτεται πάντα με την κινητή και δεν πρέπει ποτέ να ξεραθεί. Για την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων του διαχωρισμού μίγματος με στήλη θα πρέπει ο όγκος της στήλης (το ύψος της στατικής φάσης) να είναι ο ίδιος.

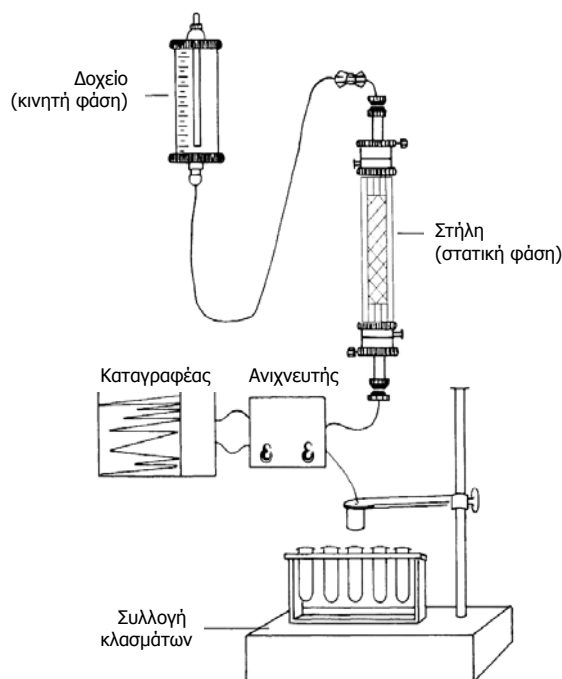
Εξίσωση 4.3. Όγκος στήλης

$$V_{στ} = 2\pi r^2 h$$

$V_{στ}$: όγκος στήλης (mL)

r : η ακτίνα της στήλης (cm)

h : το ύψος της στατικής φάσης μέσα στη στήλη (cm)



Σχήμα 4.10. Σύστημα χρωματογραφίας ανοικτής στήλης

Φόρτωμα στήλης και διαδικασία έκλουσης: Το προς διαχωρισμό δείγμα εξατμίζεται και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο κατάλληλου διαλύτη. Συνήθως χρησιμοποιείται ο διαλύτης ή το ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελεί το αρχικό σύστημα έκλουσης.

Όταν πακεταριστεί η στήλη τοποθετείται το δείγμα στην επιφάνεια της στατικής φάσης και αφήνεται να διεισδύσει σε αυτή. Η ποσότητα του δείγματος πρέπει να είναι αρκετή ώστε να ανιχνευτούν τα συστατικά μετά το διαχωρισμό αλλά όχι πολύ μεγάλη γιατί θα δημιουργηθούν "ουρές" στις ζώνες των συστατικών και δε θα γίνει σωστός διαχωρισμός. Στη συνέχεια τοποθετείται το σύστημα έκλουσης στη στήλη και ξεκινάει ο διαχωρισμός με συνεχόμενη ροή του διαλύτη. Η κατάλληλη ροή της κινητής φάσης είναι βασική προϋπόθεση για ικανοποιητικό διαχωρισμό. Τα συστατικά λόγω της διαφορετικής τους συγγένειας με τη στατική φάση θα μετακινούνται ως ζώνες με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης.

Η έκλουση των συστατικών μπορεί να γίνει είτε με ισοκρατική έκλουση, είτε με σταδιακή έκλουση, είτε με βαθμιδωτή έκλουση. Στην ισοκρατική έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια του χρωματογραφήματος, στη σταδιακή έκλουση αρχίζει ο διαχωρισμός με μια κινητή φάση καθορισμένης σύστασης και στη συνέχεια ακολουθούν κινητές φάσεις διαφορετικής σύστασης και στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει συνεχόμενα κατά τη διάρκεια του χρωματογραφήματος. Πλεονεκτήματα των δυο τελευταίων είναι ο διαχωρισμός συστατικών, με πολύ διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, στο ίδιο χρωματογράφημα.

Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού συλλέγονται στο κάτω μέρος της στήλης διαφορετικά κλάσματα συγκεκριμένου όγκου. Σημειώνεται ο όγκος έκλουσης του κάθε κλάσματος. Ο όγκος έκλουσης κάθε συστατικού είναι αντίστοιχη έκφραση του συντελεστή R_f στην επίπεδη χρωματογραφία.

Ανίχνευση των εκλουόμενων συστατικών: Ο τρόπος ανίχνευσης των συστατικών που εκλούνται από τη στήλη εξαρτάται από τη φύση τους. Οι έγχρωμες ενώσεις (χλωροφύλλες, καροτένια) θα φαίνονται ως ξεχωριστές ζώνες και μπορούν να συλλεχθούν σε διαφορετικά

κλάσματα. Οι ζώνες όμως των άχρωμων ενώσεων δε φαίνονται και επομένως πρέπει στα κλάσματα που έχουν συλλεχθεί να πραγματοποιηθεί μια δοκιμασία χαρακτηριστική της ένωσης ή των ενώσεων που θέλαμε να διαχωρίσουμε. Ένας τρόπος ανίχνευσης είναι η μέτρηση της απορρόφησης του κάθε κλάσματος σε κατάλληλο για την ένωση μήκος κύματος. Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν στα 280 nm. Τα ένζυμα μπορούν να ανιχνευτούν στα διάφορα κλάσματα πραγματοποιώντας την ενζυμική αντίδραση που καταλύουν. Για την ανίχνευση λιποειδών, αμινοξέων, και σακχάρων μπορεί να τοποθετηθεί μια κηλίδα από κάθε κλάσμα σε πλακίδιο TLC και να ανιχνευτούν με ειδικά αντιδραστήρια εμφάνισης με ψεκασμό (παράγραφος 4.3.5). Επιπλέον ανάλογα με τη φύση του συστατικού μπορεί να πραγματοποιηθεί κάποιος χημικός προσδιορισμός στα κλάσματα, όπως προσδιορισμός πρωτεΐνης, φωσφόρου, σακχάρων ή φαινολικών ενώσεων.

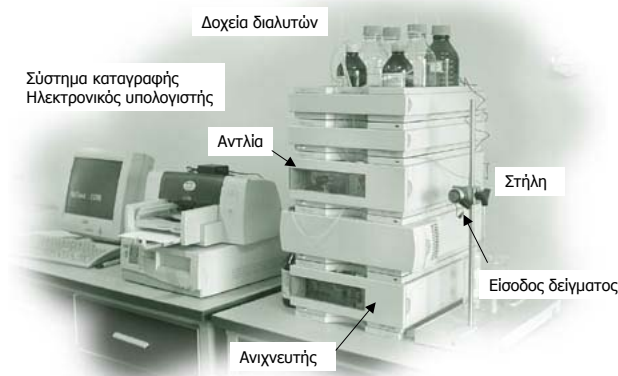
4.4.6. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Η χρωματογραφία HPLC είναι μια εξέλιξη της χρωματογραφίας στήλης. Το υλικό της στήλης είναι ατσάλι, το όλο σύστημα της χρωματογραφίας είναι κλειστό και η κινητή φάση προωθείται στη στήλη μέσω ειδικών αντλιών. Αυτό επιτρέπει την εφαρμογή υψηλών πιέσεων και τη χρήση υλικών για τη στατική φάση που είναι πιο λεπτόκοκα. Τα πλεονεκτήματα της HPLC έναντι των άλλων ειδών υγρής χρωματογραφίας είναι τα εξής:

- Επαναχρησιμοποίηση της στήλης χωρίς να απαιτείται κάθε φορά πακετάρισμα του υλικού.
- Η δυνατότητα εφαρμογής μεγάλων πιέσεων, που οδηγεί σε μικρότερους χρόνους ανάλυσης και καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών.
- Ο καλύτερος έλεγχος των συνθηκών ανάλυσης (ροή κινητής φάσης, θερμοκρασία, πακετάρισμα στήλης) με αποτέλεσμα την επαναληψιμότητα της ανάλυσης.
- Η δυνατότητα αυτοματοποίησης της ανάλυσης και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.
- Δε χρειάζεται συνήθως να τροποποιηθούν χημικά οι προς διαχωρισμό ενώσεις όπως συμβαίνει στην αέρια χρωματογραφία.
- Η δυνατότητα σύνδεσης με άλλες διατάξεις ή όργανα π.χ. φασματοσκοπία μάζας.

Τα βασικά μέρη ενός συστήματος HPLC είναι τα εξής: τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών, οι αντλίες, ο θάλαμος ανάμιξης (αποτελεί το χώρο όπου κάθε αντλία μεταφέρει την κατάλληλη ποσότητα διαλύτη για την αναμίξη τους και την παρασκευή της κινητής φάσης), η βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος, η προστήλη, η στήλη, ο ανιχνευτή και ο καταγραφέα ή ηλεκτρονικός υπολογιστής (Σχήμα 4.11).

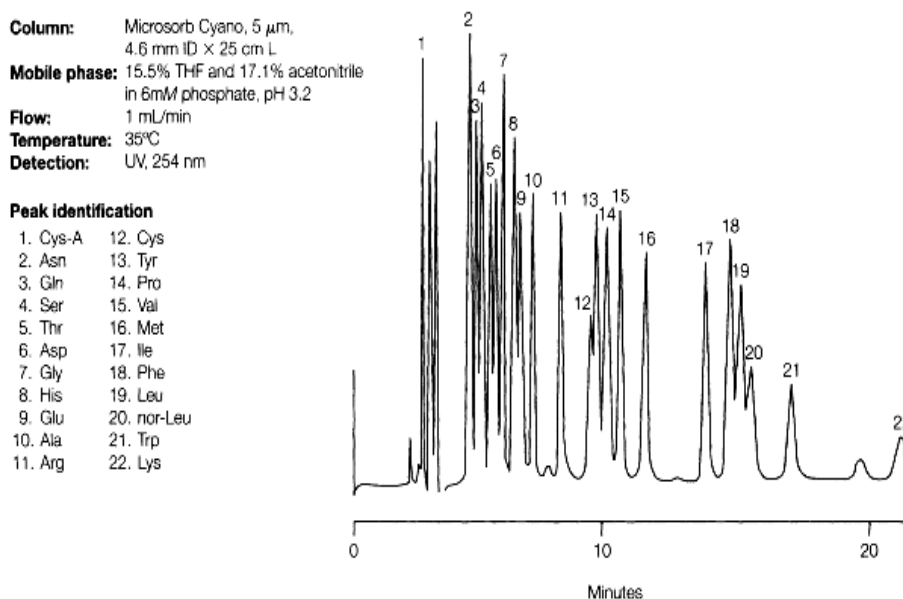
Η προστήλη είναι από ανοξείδωτο χάλυβα, μικρού μήκους ($\approx 2\text{cm}$) και περιέχει την ίδια στατική φάση με τη στήλη. Χρησιμεύει ως φίλτρο απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που πιθανώς να κορέσουν και να καταστρέψουν την στήλη. Η στήλη είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα. Χαρακτηριστικά είναι το μήκος (5 - 20 cm), η εσωτερική διάμετρος και η φύση του προσροφητικού υλικού που περιέχει.



Σχήμα 4.11. Τυπικό σύστημα χρωματογραφίας HPLC.

Διαδικασία διαχωρισμού: Ρυθμίζεται στο όργανο η σύσταση της κινητής φάσης, δηλαδή το % του κάθε διαλύτη στην κινητή φάση. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται στη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος με γυάλινη βαθμονομημένη σύριγγα. Το δείγμα παρασυρόμενο από την κινητή φάση εισέρχεται αρχικά στη προστήλη και στη συνέχεια εισέρχεται στη στήλη όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Όταν εκλουστεί ένα συστατικό από τη στήλη οδηγείται στον ανιχνευτή όπου παράγεται ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της ποσότητας του συστατικού, το οποίο καταγράφεται στον καταγραφέα. Μετά την έξοδό τους από τον ανιχνευτή τα συστατικά οδηγούνται εκτός του συστήματος της HPLC όπου μπορούν να συλλεχθούν σε διαφορετικούς σωλήνες.

Η φύση της στατικής φάσης που περιέχει η στήλη θα καθορίσει το είδος της αλληλεπίδρασης με τα συστατικά. Όλα τα είδη διαχωρισμού που αναφέρθηκαν προηγουμένως (κατανομή, προσρόφηση, ιονανταλλαγή, χημική συγγένεια, μοριακής διήθησης) μπορούν να εφαρμοστούν στην HPLC. Τα υλικά επομένως της στατικής φάσης είναι ίδια με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως με τη διαφορά ότι είναι πιο λεπτόκοκα. Η κινητή φάση αποτελείται, είτε από οργανικούς διαλύτες, είτε από υδατικά διαλύματα ιόντων. Και στις δυο περιπτώσεις πρέπει να είναι διαλύματα υψηλής καθαρότητας.



Σχήμα 4.12. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού αμινοξέων με HPLC.

4.4.7. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των κορυφών στη χρωματογραφία στήλης

Ο χρόνος ανάσχεσης ενός συστατικού (Retention factor, t_R) εξαρτάται από τη δομή του και ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για τη μέγιστη έκλουση του συστατικού (Σχήμα 4.13). Η χρήση πρότυπων ενώσεων στην ίδια στήλη και στις ίδιες συνθήκες χρωματογραφήματος (φύση κινητής φάσης, ροή κινητής φάσης, θερμοκρασία) δίνει τη δυνατότητα της ταυτοποίησης ουσιών συγκρίνοντας τις τιμές t_R των άγνωστων συστατικών με τις τιμές t_R των πρότυπων ενώσεων. Ο όγκος έκλουσης ενός συστατικού ορίζεται από την εξίσωση 4.4.

Εξίσωση 4.4. Όγκος έκλουσης συστατικού στη χρωματογραφία στήλης

$$V_R = F t_R$$

V_R : όγκος έκλουσης

F : ροή κινητής φάσης

t_R : Χρόνος ανάσχεσης

Το πόσο καλός είναι ο διαχωρισμός μεταξύ δυο συστατικών εκφράζεται από τη διαχωριστική ικανότητα η οποία ορίζεται από την εξίσωση 4.5 (Σχήμα 4.13).

Για την ποσοτική ανάλυση ενός συστατικού χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα του συστατικού διαφορετικής συγκέντρωσης και πραγματοποιείται στο κάθε ένα ανάλυση. Το εμβαδόν της κορυφής στα χρωματογραφήματα θα είναι ανάλογο της ποσότητας του συστατικού. Κατασκευάζεται επομένως καμπύλη αναφοράς του εμβαδού της κορυφής του συστατικού συναρτήσει της συγκέντρωσης. Από το χρωματογράφημα του αγνώστου διαλύματος υπολογίζεται το εμβαδόν των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς η συγκέντρωση του συστατικού.

Εξίσωση 4.5. Διαχωριστική ικανότητα στήλης

$$R = 2 (t_{RA} - t_{RB}) / (w_A - w_B)$$

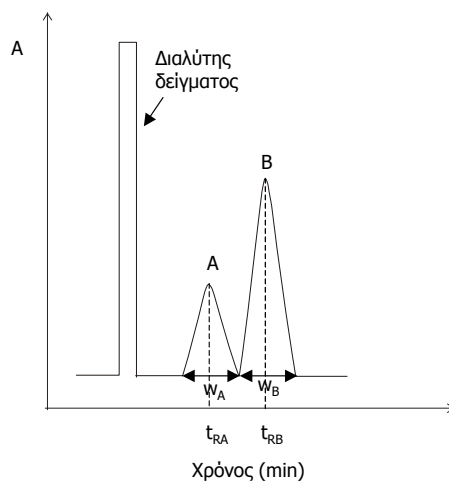
R : Διαχωριστική ικανότητα

t_{RA} : Χρόνος έκλουσης συστατικού A

t_{RB} : Χρόνος έκλουσης συστατικού B

w_A : Εύρος της κορυφής συστατικού A

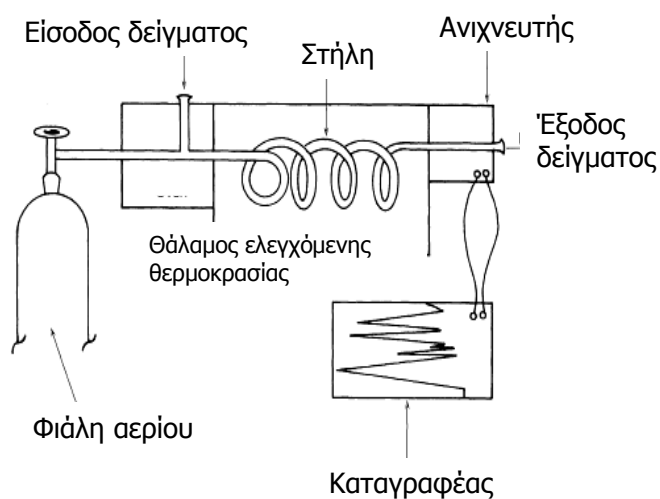
w_B : Εύρος της κορυφής συστατικού B



Σχήμα 4.13. Χρωματογράφημα διαχωρισμού των συστατικών A και B.

4.5. Αέρια χρωματογραφία (GC)

Η λεπτομερής περιγραφή της αέριας χρωματογραφίας ξεφεύγει από το πλαίσιο του συγκεκριμένου συγγράμματος γι' αυτό θα γίνει μια σύντομη αναφορά σε αυτό το είδος χρωματογραφίας. Στην αέρια χρωματογραφία η κινητή φάση είναι αέρια και η στατική φάση είναι, είτε στερεή, είτε υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υλικό. Απαραίτητη προϋπόθεση για το διαχωρισμό ενώσεων με αέρια χρωματογραφία είναι να είναι πτητικά ή να μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Διάλυμα του δείγματος εισέρχεται σε θάλαμο υψηλής θερμοκρασίας ώστε τα συστατικά να μετατραπούν σε αέρια και παρασύρονται από την αέρια κινητή φάση κατά μήκος της στήλης. Η αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η κατανομή. Τα αέρια συστατικά κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο ανάμεσα στην αέρια κινητή φάση και στη στατική. Ενώσεις με μεγαλύτερη συγγένεια για τη στατική φάση καθυστερούν να προχωρήσουν και εκλύονται πιο αργά.



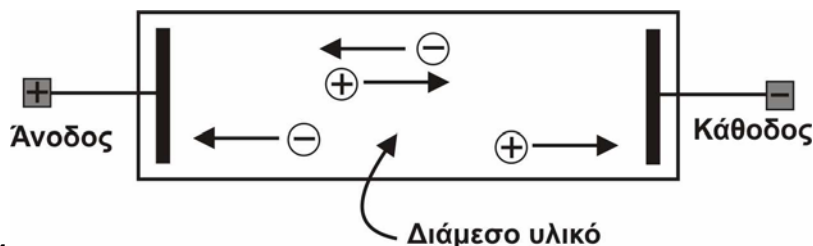
Σχήμα 4.14. Βασικά μέρη του συστήματος αέριας χρωματογραφίας.

5.1 Εισαγωγή

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια βιοαναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και χαρακτηρισμό βιομορίων μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και λιπίδια. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κινητικότητα που εμφανίζουν τα φορτισμένα μακρομόρια υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου.

Ένας ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός διεξάγεται μέσα σε ένα αδρανές μέσο, το οποίο διαχωρίζει δύο ηλεκτρόδια. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου θα έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των θετικά φορτισμένων μορίων προς την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο και των αρνητικά φορτισμένων μορίων προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο. Το μέσο μέσα στο οποίο διεξάγεται ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός αποτελείται από υγρό, συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο είναι σταθεροποιημένο σε αδρανές στερεό υλικό όπως χαρτί ή ημιστερεή πηκτή. Το υγρό επιτρέπει την κίνηση των ιόντων, ενώ αντιθέτως το στερεό υλικό προβάλλει αντίσταση στην κίνηση των ιόντων και οδηγεί στη δημιουργία τριβής κατά την κίνηση τους.

Η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού (τάσης) μεταξύ των ηλεκτροδίων προκαλεί την κίνηση των ιόντων και τη δημιουργία ηλεκτρικού ρεύματος, η ένταση, E , του οποίου καθορίζει την ταχύτητα μετακίνησης τους.



Σχήμα 5.1. Αρχή μεθόδου ηλεκτροφορήσεως

5.2 Ηλεκτροφορητική ικανότητα φορτισμένου σωματιδίου

Έστω φορτισμένο σωματίδιο (μακρομόριο, πολυμοριακό σύμπλεγμα) φορτίου q , το οποίο αιωρείται στο μέσο ηλεκτροφόρησης, δέχεται την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου έντασης E και κινείται με ταχύτητα U . Καθώς θα αυξάνει η ταχύτητα του σωματιδίου θα αυξάνει σταδιακά και η τριβή που δέχεται με αποτέλεσμα τελικά η ηλεκτρική δύναμη που δέχεται το σωματίδιο να εξισωθεί με την αντίσταση τριβής σύμφωνα με την εξίσωση 5.1:

Εξίσωση 5.1. Νόμος ηλεκτροφόρησης

$$qE = fU$$

q : φορτίο σωματιδίου (μονάδες: C)

E : ένταση ηλεκτρικού πεδίου (μονάδες: V/m)

f : συντελεστής τριβής

U : ταχύτητα κίνησης σωματιδίου (m/s)

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα (μ) κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες pH, ιονικής ισχύος, ηλεκτροφορητικού μέσου και θερμοκρασία ορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 5.2.

Εξίσωση 5.2. Ηλεκτροφορητική ικανότητα φορτισμένου σωματιδίου

$$\mu = U/E = q/f$$

μ : ηλεκτροφορητική ικανότητα (μονάδες: m^2/sV)

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα (μ) είναι χαρακτηριστική για κάθε μακρομόριο και εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του (τα οποία καθορίζουν την αντίσταση της τριβής που δέχεται) καθώς και από το φορτίο του.

5.3 Τεχνικές ηλεκτροφόρησης

5.3.1. Ηλεκτροφόρηση επί χάρτου

Η ηλεκτροφόρηση επί χάρτου είναι η πρώτη ηλεκτροφορητική τεχνική που εφαρμόστηκε και χρησιμοποιεί ως υποστηρικτικό μέσο χαρτί κυτταρίνης ή οξικής κυτταρίνης. Πριν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό το χαρτί κορένεται με το ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ το προς ανάλυση δείγμα (διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα ή νερό) μπορεί να εναποτεθεί πάνω στο χαρτί πριν ή μετά τον κορεσμό. Το χαρτί στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Μόλις τελειώσει ο διαχωρισμός, το χαρτί ξηραίνεται και ανιχνεύονται οι σχηματιζόμενες ζώνες που έχουν σχηματιστεί (βλέπε παράγραφο 5.4). Υπάρχει η δυνατότητα παραλαβής των διαχωριζόμενων συστατικών με απλή αποκοπή της ζώνης που ενδιαφέρει και εκχύλιση τους με διαβροχή με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

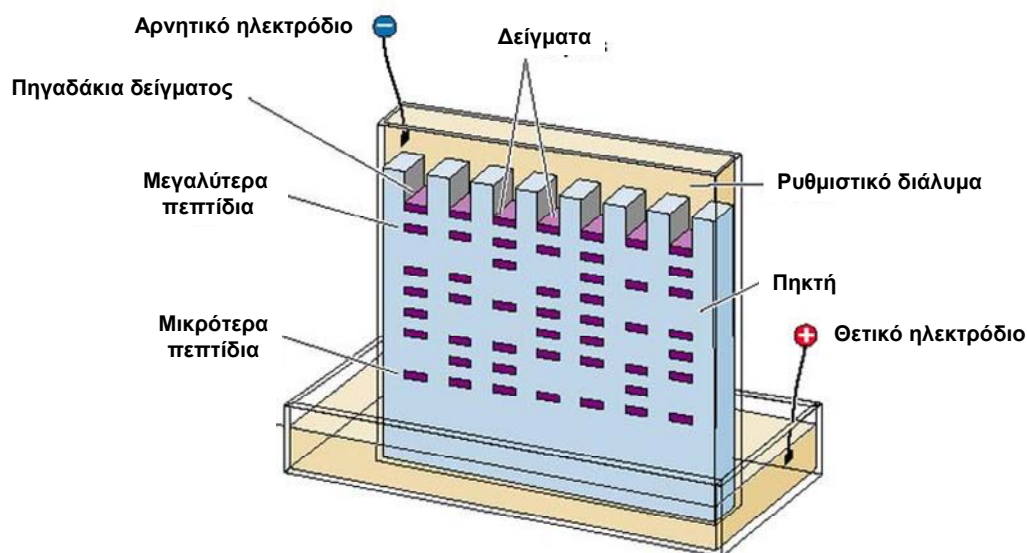
Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου και η ροή ρεύματος, λόγω της αντίστασης που αναπτύσσεται στο χαρτί έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία θερμότητας. Για το λόγο αυτό οι συσκευές ηλεκτροφόρησης χάρτου διαθέτουν και τα κατάλληλα συστήματα ψύξης.

Η ηλεκτροφόρηση χάρτου βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό μικρών μορίων αλλά δεν είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό μακρομορίων αφού η επιφανειακή τάση και η απορρόφηση τους στο χαρτί οδηγεί στη μετουσίωση των μακρομορίων και το μη ικανοποιητικό διαχωρισμό τους. Για αυτό το λόγο η ηλεκτροφόρηση χάρτου έχει αντικατασταθεί σήμερα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή για το διαχωρισμό μακρομορίων. Ωστόσο, είναι ακόμα χρήσιμη για το διαχωρισμό μικρών μορίων (αμινοξέα, νουκλεοτίδια).

5.3.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτής

Κατά την ηλεκτροφόρηση πηκτής ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται σε ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία βρίσκονται μέσα σε μία μήτρα πηκτής. Αυτή αποτελείται από πόρους με αποτέλεσμα να λειτουργεί και ως μοριακό κόσκινο. Συνέπεια αυτού είναι ότι ο διαχωρισμός δεν εξαρτάται μόνο από το ηλεκτρικό φορτίο του μορίου αλλά και από το μέγεθος του. Το πρώτο υλικό που είχε χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό ήταν το άμυλο, το οποίο με κατάλληλη θερμική επεξεργασία και στη συνέχεια ψύξη μετατρέποταν σε μία ημιστερεή πηκτή. Ωστόσο, σήμερα οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες πηκτές ηλεκτροφόρησης προκύπτουν από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και της αγαρόζης.

Οι πηκτές μπορούν να παρασκευαστούν, είτε μέσα σε στήλες, οπότε μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός ενός μόνο δείγματος, είτε σε μορφή πλάκας (Σχήμα 5.2), οπότε τότε μπορούν να επιτευχθούν διαχωρισμοί περισσότερων του ενός δείγματος στην ίδια ηλεκτροφόρηση.



Σχήμα 5.2. Μία κλασσική συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτής σε μορφή πλάκας

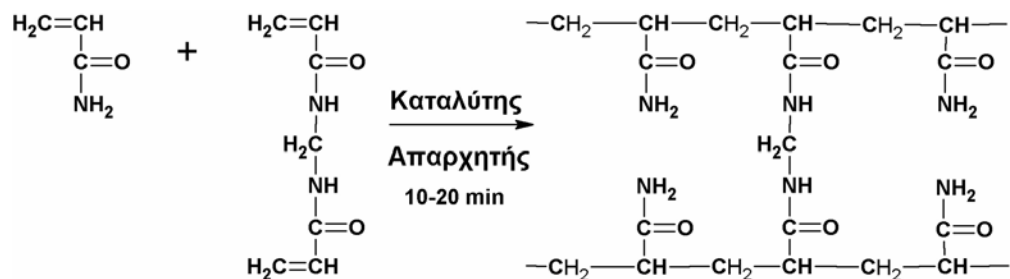
5.3.2.1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό πρωτεϊνών και μικρών θραυσμάτων RNA και DNA. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζονται από το συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου (μονομερές) με το N,N'-μεθυλενοδις(ακρυλαμίδιο) (αντιδραστήριο διασταύρωσης) παρουσία ενός καταλύτη και ενός εκκινητή της αντίδρασης (Σχήμα 5.3). Ως εκκινητές πολυμερισμού χρησιμοποιούνται υπερθειικά άλατα αμμωνίου ή καλίου, αφού το υπερθειικό διανιόν $S_2O_8^{2-}$ μπορεί να διασπαστεί σε δύο θειικές ρίζες ($SO_4^{\cdot-}$), οι οποίες μπορούν να ξεκινήσουν τον πολυμερισμό. Ο συνηθέστερος καταλύτης είναι η τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (tetramethylethylenediamine, TEMED), ο οποίος αντιδρά με την υπερθειική ρίζα οδηγώντας σε μία σταθερότερη ελεύθερη ρίζα. Το μέγεθος των πόρων της πηκτής που σχηματίζεται καθορίζει την κινητικότητα των μακρομορίων και τη διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής και εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα του ακρυλαμιδίου και του αντιδραστηρίου διασταύρωσης. Η σύσταση της πηκτής καθορίζεται από δύο παραμέτρους και αυτοί είναι το :

$$\%T = [(\text{βάρος μονομερούς και αντιδραστηρίου διασταύρωσης, g})/100 \text{ mL}] \times 100$$

$$\%C = 100 \times (\text{βάρος αντιδραστηρίου διασταύρωσης, g})/(\text{βάρος μονομερούς και αντιδραστηρίου διασταύρωσης, g})$$

Η πορεία της ηλεκτροφόρησης για κάθε δείγμα παρακολουθείται με την προσθήκη σε αυτό ειδικής χρωστικής-ιχνηθέτη, η οποία δε συγκρατείται από την πηκτή. Τέτοιες χρωστικές είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης (ανιονική χρωστική) ή το μπλε του μεθυλενίου (κατιονική χρωστική).



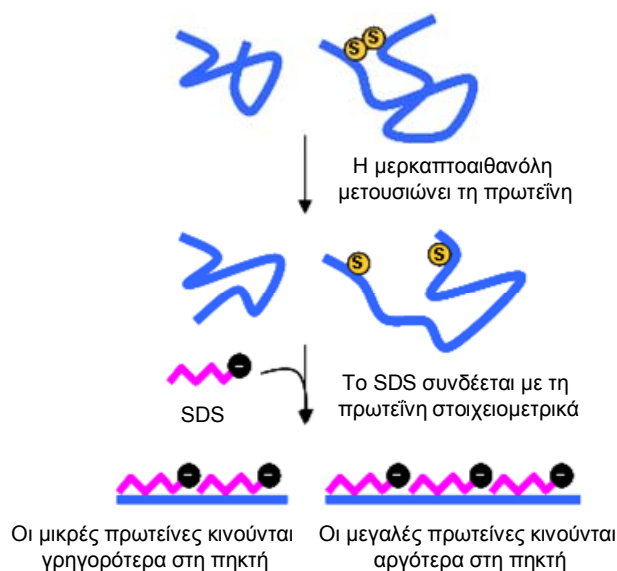
Σχήμα 5.3. Πολυμερισμός ακρυλαμιδίου

Μία παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι η πραγματοποίηση της παρουσία δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) οπότε η τεχνική αυτή ονομάζεται SDS-PAGE. Στην τεχνική αυτή η πηκτή κατασκευάζεται παρουσία ~ 0,1% w/v δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS). Τα δείγματα της πρωτεΐνης, πριν την ηλεκτροφόρηση κατεργάζονται με 1% SDS και 0,1% μερκαπτοαιθανόλη. Η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που διατηρούν την 3^η και 4^η δομή της πρωτεΐνης και οδηγούν στο σχηματισμό τυχαίων πρωτεϊνικών σπειρών στις υδρόφοβες περιοχές των οποίων συνδέεται το SDS με σχετικά σταθερή αναλογία 1,4 g SDS/g πρωτεΐνης (Σχήμα 5.4). Η σύνδεση του αρνητικού SDS στις αποδιατεταγμένες πρωτεϊνικές αλυσίδες έχει σαν αποτέλεσμα αυτές να αποκτήσουν ένα σταθερό λόγο φορτίου προς μονάδα βάρους και συνεπώς η σχετική μετακίνηση των αποδιατεταγμένων αλυσίδων να εξαρτάται μόνο από το σχετικό τους μέγεθος και την ικανότητα τους να διαπεράσουν τους πόρους της πηκτής (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση).

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους (logMB) της πρωτεΐνης. Η ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες πρωτεϊνών γνωστού MB έχει σαν αποτέλεσμα την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μεταξύ του logMB και της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ορίζεται η σχετική μετακίνηση, R_f , της υπο μελέτης πρωτεΐνης σε σχέση με τη χρωστική-ιχνηθέτη όπως φαίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$R_f = (\text{απόσταση μετακίνησης της πρωτεΐνης})/(\text{απόσταση μετακίνησης της χρωστικής})$$

Από την καμπύλη αναφοράς και το R_f της άγνωστης πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί το MB της. Η SDS PAGE μπορεί να προσδιορίσει το MB μίας πρωτεΐνης με ακρίβεια έως 5% στην περιοχή 10^4 - 10^6 Da.



Σχήμα 5.4. Μετουσίωση πρωτεΐνης παρουσία μερκαπτοαιθανόλης και προσκόλληση του SDS στην αποδιατεταγμένη αλυσίδα στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Η πιο διαδομένη τεχνική SDS-PAGE είναι η τεχνική της ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης. Στην τεχνική αυτή η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάσης και την πηκτή διαχωρισμού, διαφορετικού μεγέθους πόρων, pH και ιονικής ισχύος. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάσης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από τη πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μία στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μία λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός τους.

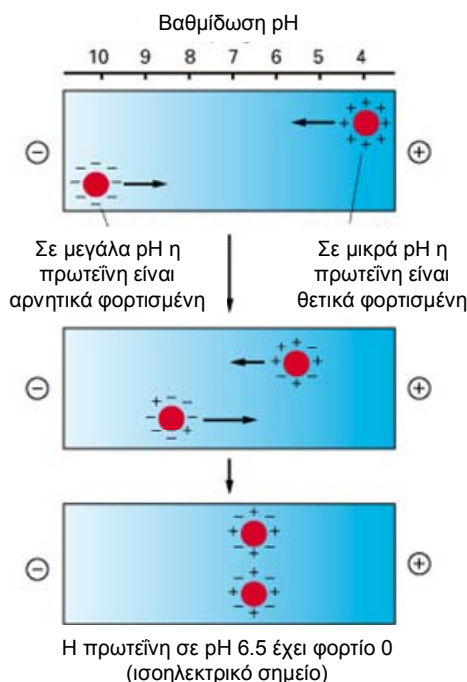
5.3.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η αгарόζη είναι γραμμικό πολυμερές της D-γαλακτόζης και της 3,6-ανυδρογαλακτόζης και απομονώνεται από τα φύκια. Όπως και στις πηκτές πολυακρυλαμίδιου, η συγκέντρωση της αгарόζης στην πηκτή καθορίζει τους πόρους της. Οι πόροι σε μία πηκτή αгарόζης είναι πολύ μεγαλύτεροι σε σχέση με την πηκτή πολυακρυλαμίδιου, με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό μεγάλων πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

5.3.3. Ισοηλεκτρική εστίαση

Με την τεχνική αυτή επιτρέπεται ο διαχωρισμός πρωτεϊνών βάση της σχετικής αναλογίας όξινων και βασικών ομάδων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η ισοηλεκτρική εστίαση απαιτεί μία στήλη, η οποία περιέχει ένα αντιδραστήριο απαγωγής της θερμότητας και ένα γραμμικά μεταβαλλόμενο, μη ιοντικό διάλυμα σακχαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου καθώς και ηλεκτροδία αραιού οξέος και βάσης. Μέσα σε αυτό το σύστημα εισάγεται ένα εμπορικά διαθέσιμο παρασκεύασμα αμφολυτών και το προς διαχωρισμό μίγμα. Οι αμφολύτες είναι μικρού μοριακού βάρους πολυμερή με τυχαίες κατανομές ασθενών όξινων και βασικών ομάδων, εμφανίζουν συνεπώς τόσο όξινες όσο και βασικές ιδιότητες. Η σχετική αναλογία όξινων και βασικών ομάδων πάνω στο μόριο τους καθορίζει το ισοηλεκτρικό σημείο τους, pI. Το pI ενός αμφολύτη είναι το pH στο οποίο έχει συνολικό φορτίο 0 και συνεπώς δεν εμφανίζει ηλεκτροφορητική ικανότητα.

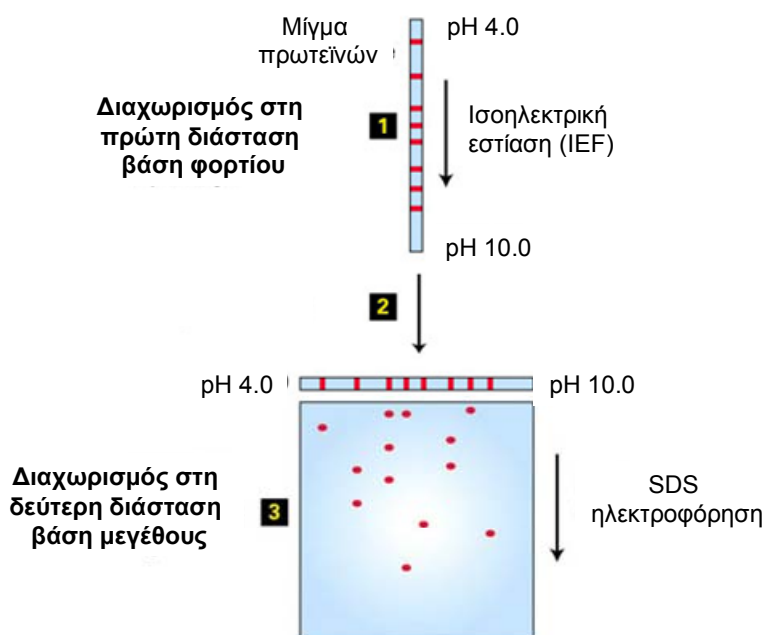
Η εφαρμογή δυναμικού στο σύστημα αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη ροή των αμφολυτών σύμφωνα με την κατανομή των φορτίων τους προς το ηλεκτρόδιο οξέος ή βάσεως. Η μετακίνηση αυτή των αμφολυτών δημιουργεί μία βαθμίδωση pH μέσα στη στήλη ηλεκτροφόρησης. Τα μακρομόρια που υπάρχουν στο σύστημα λειτουργούν και αυτά ως αμφολύτες και καθώς δημιουργείται η βαθμίδωση pH μετατοπίζονται σε περιοχές pH όπου οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις πάνω στο μόριο εξισώνονται. Όταν οι πρωτεΐνες φτάσουν στην περιοχή pH που αντιστοιχεί στο pI τους τότε σταματά η μετακίνησή τους και σχηματίζουν μία ζώνη (Σχήμα 5.5).



Σχήμα 5.5. Αρχή μεθόδου ισοηλεκτρικής εστίασης

5.3.4. Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων το προς ανάλυση μίγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται αρχικά προς μία κατεύθυνση μέσω συγκεκριμένης τεχνικής διαχωρισμού και στη συνέχεια η πηκτή περιστρέφεται κατά 90° οπότε γίνεται δεύτερη ηλεκτροφόρηση με τεχνική διαφορετική από αυτή της πρώτης. Σήμερα, ο καλύτερος συνδυασμός τεχνικών συμπεριλαμβάνει το διαχωρισμό με ισοηλεκτρική εστίαση στη πρώτη διάσταση και στη συνέχεια διαχωρισμό με SDS-PAGE στη δεύτερη διάσταση. Με αυτόν τον τρόπο, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αρχικά βάση του φορτίου τους και στη συνέχεια βάση του μεγέθους τους (Σχήμα 5.6). Το μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτή είναι η μεγάλη διαχωριστική της ικανότητα, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων πρωτεϊνών.



Σχήμα 5.6. Αρχή μεθόδου δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης

5.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους.

Η ανίχνευση των διαχωριζόμενων συστατικών μετά από ένα ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη κατεργασία των συστατικών με κάποιο αντιδραστήριο ανίχνευσης (χρωστική, επισημασμένο αντίσωμα), είτε πάνω στην πηκτή, είτε ύστερα από μεταφορά των συστατικών σε λεπτή μεμβράνη με την τεχνική της αποτύπωσης.

5.4.1. Ανίχνευση με χρωστικές

Ο πιο κοινός τρόπος ανίχνευσης των διαχωριζόμενων συστατικών περιλαμβάνει τη βαφή της πηκτής με κατάλληλη χρωστική που αλληλεπιδρά με όλες τις πρωτεΐνες ή τα νουκλεϊνικά οξέα, με μη εκλεκτικό τρόπο. Μερικές από τις συνηθέστερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται καθώς και τα αντίστοιχα λ_{max} τους φαίνονται στον πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Οι σημαντικότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση

Χρωστική	λ_{max} (nm)	Ανιχνεύει
Amido Black 10B	620	Πρωτεΐνεςγενικά
Coomassie Brilliant Blue G-250	595	Πρωτεΐνεςγενικά
Alcian Blue	630	Γλυκοπρωτεΐνες
Methylene blue	665	RNA
Methyl Green	635	DNA
Ethidium bromide		DNA (φθορισμομετρικά)

Μία ακόμα πιο ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης είναι η κατεργασία της πηκτής με διάλυμα ιόντων Ag^+ τα οποία ανάγονται από τις ομάδες θειολών, τυροσινών και αμινών των

πρωτεϊνών και από τις βάσεις πουρινών του DNA μετατρεπόμενα σε στερεό Ag^0 , ο οποίος καταβυθίζεται στην πηκτή προκαλώντας τη μόνιμη βαφή της.

Η ένταση της κάθε ζώνης αντανακλά την ποσότητα της διαχωριζόμενης ουσίας σε αυτή. Ποσοτικές πληροφορίες για την ποσότητα της πρωτεΐνης ή των νουκλεϊνικών οξέων σε κάθε διαχωριζόμενη ζώνη μπορεί να προκύψει με σάρωση της πηκτής με πυκνομετρικό σαρωτή, ο οποίος μετράει την ένταση του φωτός που διέρχεται από την πηκτή σε συνάρτηση με την περιοχή της πηκτής.

5.4.2. Τεχνικές αποτύπωσης

Αποτύπωση κατά Southern: Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον E.M. Southern το 1975 για τη μεταφορά του DNA από πηκτές αгарόζης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης ή nylon για την μετέπειτα ανίχνευση του. Η τεχνική βασίζεται στη διαβροχή της πηκτής με διάλυμα αποδιάταξης, το οποίο διασπά τους δεσμούς μεταξύ των βάσεων του δίκλωνου DNA με αποτέλεσμα να παραμένει στην πηκτή μόνο η μία αλυσίδα του DNA. Στην συνέχεια η πηκτή μεταφέρεται σε ειδική συσκευή στην οποία, το DNA μεταφέρεται από την πηκτή στη νιτροκυτταρίνη μέσω διηθητικού χαρτιού. Το πλεονέκτημα της μεταφοράς του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή nylon πριν την ανίχνευση είναι ότι πάνω στη μεμβράνη αποφεύγεται η διάχυση των πρωτεϊνών, όπως θα συνέμβαινε στην πηκτή μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

Αποτύπωση κατά Northern: Η αποτύπωση κατά Northern χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του RNA από πηκτές αгарόζης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι παρόμοιες με αυτές της αποτύπωσης Southern.

Αποτύπωση κατά Western: Η τεχνική αυτή αποτύπωσης είναι σχεδιασμένη για τη μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτές σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και βασίζεται στις ίδιες αρχές με τις τεχνικές Southern και Northern. Πολλές φορές μία ηλεκτροφορητική τεχνική επιταγχύνει τη μεταφορά αυτή έτσι ώστε να αποφεύγεται η διάχυση των πρωτεϊνών και η διεύρυνση των μπαντών.

Ανοσοαποτύπωση: Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων με τη βοήθεια ειδικών επισημασμένων αντισωμάτων έναντι αυτών. Η αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος επάγεται είτε πάνω στην πηκτή, αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση, είτε μετά τη μεταφορά των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την τεχνική Western.

ΜΕΡΟΣ Β

ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Η μελέτη της δομής μίας πρωτεΐνης αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντικείμενα της Βιοχημείας, δεδομένης της σημασίας των πρωτεϊνών ως φορέων της γενετικής πληροφορίας και των πολλαπλών ρόλων που έχουν μέσα σε ένα κύτταρο. Η γνώση της δομής μίας πρωτεΐνης εξηγεί το μηχανισμό δράσης της, την τοπολογία της και επιτρέπει την ανάπτυξη μορίων τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν τη δράση της και να λειτουργήσουν ως φάρμακα. Επίσης, η σύγκριση της δομής της ίδιας πρωτεΐνης μεταξύ διαφορετικών ειδών έχει βοηθήσει στην κατανόηση της εξέλιξης των ειδών. Πάρα πολλές γενετικές ασθένειες βασίζονται σε αλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Η γνώση της δομής αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών επιτρέπει την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών δοκιμασιών και την εφαρμογή νέων κλινικών θεραπειών. Τα τελευταία χρόνια, απώτερος σκοπός της βιοχημείας των πρωτεϊνών είναι ο ταυτόγχρονος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του συνόλου των πρωτεϊνών (του πρωτεώματος) ενός κυττάρου ή ενός βιολογικού δείγματος κάτω από διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις με τις τεχνικές της πρωτεωμικής. Αυτό θα έδινε τη δυνατότητα στους ερευνητές να ανακαλύψουν σε σύντομο χρονικό διάστημα τους βιολογικούς ρόλους των πρωτεϊνών και τους μηχανισμούς ρύθμισής τους.

Το πρώτο στάδιο για τη μελέτη μίας πρωτεΐνης είναι ο διαχωρισμός της από το πλήθος των άλλων μορίων και πρωτεϊνών με τις οποίες συνυπάρχει. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι διαχωρισμού, οι οποίες βασίζονται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Για την παρακολούθηση της διαδικασίας καθαρισμού απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης μέσα σε ένα δείγμα καθώς και ένας εξειδικευμένος τρόπος προσδιορισμού της προς μελέτη πρωτεΐνης. Αν η πρωτεΐνη καθαριστεί επιτυχώς, το επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της, της πιθανής ύπαρξης περισσότερων του ενός πολυπεπτιδικών αλυσίδων στο μόριο της και τελικά της δομής της στο χώρο.

Για όλες αυτές τις διαδικασίες σημαντική βοήθεια έχει προσφέρει η δυνατότητα παρασκευής εκλεκτικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών, τα οποία οδήγησαν στην ανάπτυξη ιδιαίτερα ευαίσθητων και εκλεκτικών ανοσοχημικών τεχνικών προσδιορισμού και διαχωρισμού των πρωτεϊνών.

6.2 Απομόνωση πρωτεϊνών από τα βιολογικά δείγματα

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη των πρωτεϊνών ενός βιολογικού δείγματος είναι η απομόνωση του πρωτεϊνικού κλάσματος από αυτό. Οι πηγές πρωτεϊνών είναι συνήθως κύτταρα, ιστοί καθώς και βιολογικά υγρά. Όσον αφορά τα κύτταρα και τους ιστούς αυτοί πρέπει πρώτα να ομογενοποιηθούν σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, υψηλής ωσμωτικής ισχύος, έτσι ώστε να σπάσουν οι πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και να απελευθερωθούν οι κυτταρικές πρωτεΐνες. Η ομογενοποίηση μπορεί να επιτευχθεί, είτε με κατάλληλους ομογενοποιητές, παρόμοιους με τα μίξερ οικιακής χρήσης (κυρίως για ιστούς), ενώ για ηπιότερους χειρισμούς χρησιμοποιείται ο ομογενοποιητής Potter–Elvehjem. Ο

ομογενοποιητής αυτός αποτελείται από ειδικό γυάλινο σωλήνα μέσα στο οποίο περιστρέφεται μηχανικά ένα έμβολο. Για ιστούς ή κύτταρα, τα οποία σπάνε δυσκολότερα, όπως τα βακτηριακά κύτταρα, χρησιμοποιούνται εντονότερες συνθήκες ομογενοποίησης, συνήθως με τη βοήθεια υπέρηχων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης, αφού ακραίες τιμές pH ή ιονικής ισχύος είναι δυνατόν να καταστρέψουν την τριτοταγή δομή μίας πρωτεΐνης. Επίσης, η διαδικασία απομόνωσης πρέπει να γίνεται υπό ψύξη έτσι ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση και η τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών από ένζυμα που συνυπάρχουν με αυτές στο βιολογικό δείγμα. Αν είναι γνωστή η υποκυτταρική τοπολογία της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, μετά την ομογενοποίηση μπορεί να παραληφθεί το υποκυτταρικό κλάσμα, στο οποίο εντοπίζεται, με τη βοήθεια διαφορικής φυγοκέντρωσης.

6.3 Μέθοδοι προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης σε βιολογικά δείγματα

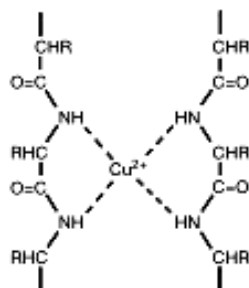
Οι μέθοδοι προσδιορισμού της ολικής πρωτεΐνης σε ένα βιολογικό δείγμα βασίζονται σε κάποιες κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, όπως η παρουσία των πεπτιδικών δεσμών ή χαρακτηριστικών αμινοξέων στο μόριο τους. Αν και οι παραδοχές, πάνω στις οποίες βασίζονται οι περισσότερες από αυτές, δεν είναι απόλυτα ακριβείς, επιτρέπουν ωστόσο τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης με απλό και πρακτικό τρόπο. Οι κύριες μέθοδοι προσδιορισμού ολικής πρωτεΐνης βασίζονται: α) στην παρουσία αζώτου στο μόριο των πρωτεϊνών, β) στην ικανότητα των πεπτιδικών δεσμών να αντιδρούν με το αντιδραστήριο διουρίας, γ) στην ικανότητα των αρωματικών αμινοξέων της τυροσίνης και της θρυπτοφάνης να αντιδρούν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, δ) στην ικανότητα των πρωτεϊνών να απορροφούν στο υπεριώδες, ε) στην ικανότητα τους να συνδέονται με χρωστικές ενώσεις. Η κάθε μέθοδος έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία και σχολιάζονται παρακάτω.

6.3.1 Προσδιορισμός αζώτου ολικής πρωτεΐνης

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη παραδοχή ότι όλα τα πρωτεϊνικά μόρια είναι καθαρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που περιέχουν κατά μέσο όρο 16% κ.β. άζωτο. Ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού αζώτου γίνεται με τη μέθοδο Kjeldahl σύμφωνα με την οποία μετατρέπεται το πρωτεϊνικό άζωτο σε ιόν αμμωνίου παρουσία ισχυρών οξέων. Η συγκέντρωση των ιόντων αμμωνίου προσδιορίζεται με τιτλοδότηση. Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης ισούται με τη συγκέντρωση του αζώτου της αμμωνίας πολλαπλασιαζόμενη με το συντελεστή 6,25. Ουσίες που περιέχουν άζωτο επηρεάζουν τον προσδιορισμό, για αυτό, πριν τη μέθοδο Kjeldahl, οι πρωτεΐνες συνήθως καταβυθίζονται παρουσία ισχυρών οξέων και το άζωτο προσδιορίζεται στο ίζημα που προκύπτει.

6.3.2 Μέθοδος διουρίας

Η μέθοδος διουρίας βασίζεται στην αντίδραση της πρωτεΐνης με ιόντα Cu^{2+} σε αλκαλικό περιβάλλον και στο σχηματισμό έγχρωμου χηλικού συμπλόκου ανάμεσα στο Cu^{2+} και σε τέσσερα N από τέσσερις πεπτιδικούς δεσμούς (Σχήμα 6.1). Η ένταση του χρώματος του συμπλόκου που προκύπτει στα 550 nm είναι ανάλογη του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών και συνεπώς του αριθμού των πρωτεϊνικών μορίων. Η μέθοδος αυτή είναι απλή και αξιόπιστη αλλά στερείται ευαισθησίας αφού έχει όριο ανίχνευσης 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ πρωτεΐνης.



Σχήμα 6.1. Το σύμπλοκο των ιόντων Cu^{2+} με τους πεπτιδικούς δεσμούς μίας πρωτεΐνης που σχηματίζεται κατά την αντίδραση διουρίας

6.3.3 Αντίδραση αρωματικών αμινοξέων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

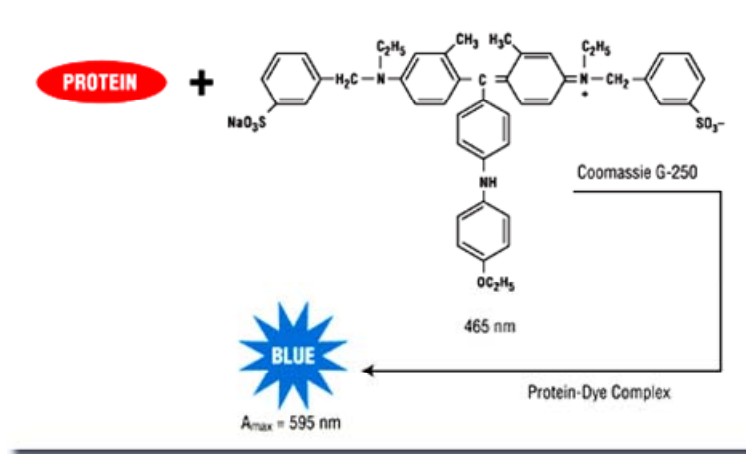
Τα αρωματικά κατάλοιπα τυροσίνης και θρυπτοφάνης απαντώνται σε όλες τις πρωτεΐνες. Τα αμινοξέα αυτά, είτε ελεύθερα, είτε ως μέρος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μπορούν να ανάγουν το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (μίγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος) δίνοντας χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Η δοκιμασία αυτή καλό είναι να χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό καθαρών πρωτεϊνών και όχι μιγμάτων πρωτεϊνών αφού κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετικό ποσοστό αρωματικών αμινοξέων στην πολυπεπτιδική της αλυσίδα. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu μπορεί να προσδιορίσει διαλύματα πρωτεϊνών στην περιοχή των 10-60 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.4 Απορρόφηση πρωτεϊνών στο υπεριώδες

Η πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm σε pH 8.0 λόγω της παρουσίας των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και θρυπτοφάνης σε αυτές. Επειδή όλες οι πρωτεΐνες δεν έχουν το ίδιο ποσοστό αρωματικών αμινοξέων αλλά και επειδή στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν η ελεύθερη τυροσίνη και θρυπτοφάνη καθώς και το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη και τα νουκλεϊνικά οξέα, η μέθοδος στερείται εξειδίκευσης, όσον αφορά τουλάχιστον τον προσδιορισμό πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Η μέτρηση της απορρόφησης στην περιοχή 190-225 nm προσδίδει πολύ μεγαλύτερη εξειδίκευση στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών αφού η απορρόφηση στην περιοχή αυτή οφείλεται κυρίως στους πεπτιδικούς δεσμούς.

6.3.5 Σύνδεση πρωτεϊνών με χρωστικές

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην ικανότητα των πρωτεϊνών να δεσμεύουν χρωστικές ουσίες όπως το Amido Black 10B και το Coomassie Brilliant Blue G250. Οι χρωστικές αυτές εμφανίζουν διαφορετικό λ_{max} αμέσως μετά τη σύνδεση τους με τις πρωτεΐνες και η απορρόφηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε αυτό το λ_{max} είναι ανάλογο της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης (Σχήμα 6.2). Αυτές οι μέθοδοι εμφανίζουν τα μικρότερα όρια ανίχνευσης αλλά μειονεκτούν στο ότι κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετική τάση σύνδεσης με τη χρωστική.



Σχήμα 6.2. Η αντίδραση Bradford

6.4 Μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών

Το πρώτο στάδιο για τη μελέτη μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι ο διαχωρισμός της από όλα τα άλλα βιομορία και ιδιαίτερα από τις άλλες πρωτεΐνες.

Ο καθαρισμός μίας πρωτεΐνης αποτελεί ίσως και το πιο δύσκολο στάδιο στην ανάλυση των πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται στο ότι συνήθως η προς μελέτη πρωτεΐνη αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος με αποτέλεσμα να απαιτούνται χρονοβόρες και επίπονες τεχνικές για την παραλαβή μεγάλης ποσότητας, καθαρής πρωτεΐνης, έτσι ώστε να εφαρμοστούν σε αυτή οι διάφορες τεχνικές προσδιορισμού της δομής της. Επίσης, πολλές πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες και απαιτούν ειδικό χειρισμό αφού κατά τις διάφορες διεργασίες καθαρισμού τους μπορούν εύκολα να μετουσιωθούν.

Όλες οι μέθοδοι διαχωρισμού πρωτεϊνών εκμεταλλεύονται τις διαφορές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της κάθε πρωτεΐνης. Οι φυσικοχημικές αυτές ιδιότητες μπορεί να είναι η διαλυτότητα, το μέγεθος, το φορτίο και η ικανότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης με κάποιον προσδότη της. Δεδομένου του μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, όλων των ειδών σε ένα βιολογικό δείγμα, ο πλήρης καθαρισμός μίας πρωτεΐνης απαιτεί, τις περισσότερες φορές, την εφαρμογή συνδυασμού διαφορετικών τεχνικών διαχωρισμού.

Απαραίτητες προϋποθέσεις για να μπορέσει ένας ερευνητής να παρακολουθήσει τη πορεία διαχωρισμού μίας πρωτεΐνης είναι: α) ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης σε κάθε στάδιο καθαρισμού με κάποια από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2, β) η ανάπτυξη μίας ειδικής δοκιμασίας προσδιορισμού της προς διαχωρισμό πρωτεΐνης έτσι ώστε να μπορεί να ανιχνεύεται ειδικά στο μίγμα των άλλων πρωτεϊνών. Η δοκιμασία αυτή (assay) πρέπει να βασίζεται σε μία, το δυνατόν, μοναδική ιδιότητα της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση για παράδειγμα των ενζύμων, η διαδικασία καθαρισμού παρακολουθείται με προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας.

Στα διάφορα στάδια της πορείας διαχωρισμού μίας πρωτεΐνης ο λόγος της ποσότητας της προς μελέτη πρωτεΐνης (η οποία προσδιορίζεται με την ειδική για αυτήν δοκιμασία) προς τη συνολική πρωτεΐνη (η οποία προσδιορίζεται με μία από τις μεθόδους του κεφαλαίου) πρέπει σταδιακά να αυξάνεται και ιδανικά, μετά και το τελευταίο στάδιο καθαρισμού, το σύνολο της πρωτεΐνης θα πρέπει να αποτελείται από την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Οι σημαντικότερες τεχνικές για το διαχωρισμό πρωτεϊνών αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω.

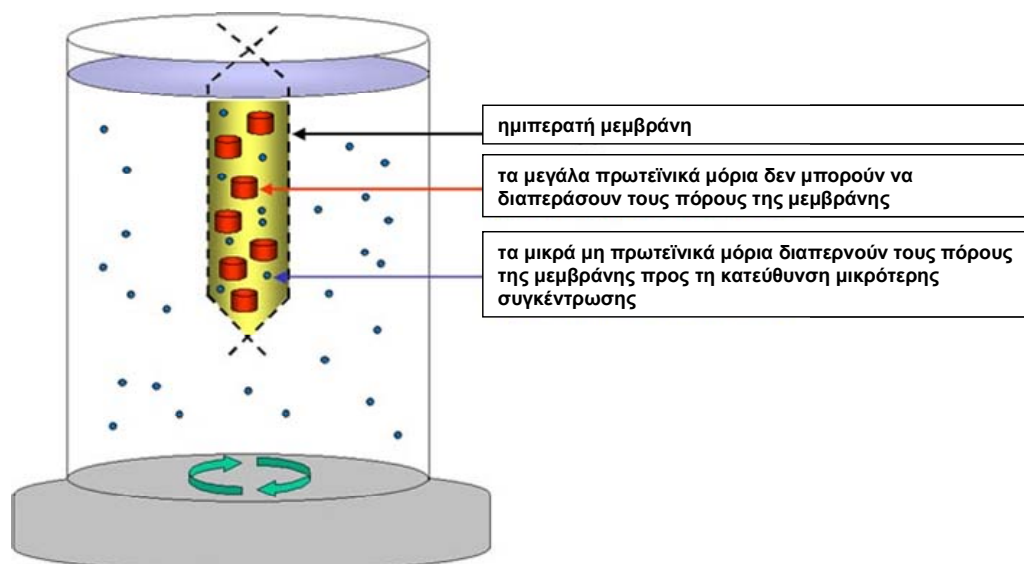
6.4.1. Καταβύθιση πρωτεϊνών

Η διαλυτότητα μίας πρωτεΐνης, όπως και κάθε άλλου μορίου, καθορίζεται από τις δυνάμεις μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης αλλά και τις δυνάμεις μεταξύ της πρωτεΐνης και των μορίων του διαλύτη. Οι πρωτεΐνες έχουν πολλά θετικά και αρνητικά φορτία στην επιφάνειά τους. Σε συγκεκριμένα pH οι πρωτεΐνες έχουν καθαρό αρνητικό ή θετικό φορτίο με αποτέλεσμα να απωθούνται μεταξύ τους και να παραμένουν εν διαλύσει. Αν ωστόσο το pH τους διαλύματος γίνει ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης, τότε το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι 0 και η διαλυτότητα της πρωτεΐνης είναι η μικρότερη δυνατή γεγονός που οδηγεί στη καταβύθιση της. Συνεπώς, με κατάλληλη ρύθμιση του pH ενός πρωτεϊνικού διαλύματος μπορεί να γίνει ένας πρώτος διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάση της διαλυτότητας τους.

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο μπορούν να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες βάση της διαλυτότητας τους είναι η εξαλάτωση (salting out). Εξαλάτωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μειώνεται η διαλυτότητα των πρωτεϊνών σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων, τα ιόντα του άλατος δεσμεύουν όλα τα μόρια του νερού για την ενυδάτωσή τους με αποτέλεσμα να μειώνεται η επιδιαλύτωση των πρωτεϊνών γεγονός που οδηγεί στη καταβύθιση τους. Ο διαχωρισμός βάση αυτού του φαινομένου στηρίζεται στο ότι κάθε πρωτεΐνη καταβυθίζεται σε διαφορετική συγκέντρωση άλατος. Το άλας που χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για την καταβύθιση των πρωτεϊνών είναι το θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) λόγω της μεγάλης του διαλυτότητας στο νερό. Η διαδικασία της εξαλάτωσης εφαρμόζεται επίσης και στη συμπύκνωση αραιών διαλυμάτων πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένων και κλασμάτων που έχουν προέλθει από άλλα στάδια καθαρισμού. Γενικότερα, οι μέθοδοι διαχωρισμού βάση της διαλυτότητας αποτελούν συνήθως το πρώτο στάδιο καθαρισμού μίας πρωτεΐνης επειδή μπορούν να εφαρμοστούν σε παρασκευαστική κλίμακα.

6.4.2. Διαπίδυση

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από μικρά μόρια με διαπίδυση διαμέσου ημιπερατής μεμβράνης, όπως είναι για παράδειγμα οι μεμβράνες οξικής κυτταρίνης (cellulose). Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε ασκό κατασκευασμένο από ημιπερατή μεμβράνη. Η ημιπερατή μεμβράνη με το πρωτεϊνικό διάλυμα βυθίζεται μέσα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος. Τα μόρια που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από τη διάμετρο πόρων της μεμβράνης (πρωτεϊνικά μόρια) παραμένουν στο εσωτερικό ασκού διαπίδυσης, ενώ μικρότερα μόρια και ιόντα (μόρια άλατος) διαπερνούν τους πόρους της μεμβράνης του ασκού και εξέρχονται από αυτόν προς την κατεύθυνση της μικρότερης συγκέντρωσης (Σχήμα 6.3). Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση αλάτων ή μικρών μορίων από ένα πρωτεϊνικό διάλυμα αλλά δε μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες μεταξύ τους.



Σχήμα 6.3. Διαχωρισμός πρωτεϊνών από μικρά μόρια με διαπίδυση

6.4.3. Φυγοκέντρωση βαθμίδωσης πυκνότητας

Η τεχνική της φυγοκέντρωσης βαθμίδωσης πυκνότητας επιτρέπει το διαχωρισμό πρωτεϊνών βάση του συντελεστή καταβύθισης τους, ο οποίος εξαρτάται τόσο από τη μάζα της πρωτεΐνης όσο και από το σχήμα της. Το μίγμα των πρωτεϊνών τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα, στην επιφάνεια διαλύματος οργανικού συστατικού (π.χ. σακχαρόζη, γλυκερόλη) γραμμικής ή εκθετικής αύξησης της πυκνότητας. Κατά τη φυγοκέντρωση οι πρωτεΐνες κινούνται μέσω του διαλύματος και διαχωρίζονται ανάλογα το συντελεστή καταβύθισης τους. Η αυξανόμενη πυκνότητα του μέσου μέσα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός επιτρέπει την κλασματοποίηση έτσι ώστε κάθε ζώνη πρωτεϊνών παρόμοιου συντελεστή καταβύθισης να διαχωρίζεται από τη λιγότερη πυκνή, που βρίσκεται από πάνω της και την περισσότερο πυκνή που βρίσκεται από κάτω της. Οι διαχωριζόμενες ζώνες πρωτεϊνών συλλέγονται ξεχωριστά με το άνοιγμα τρύπας από το κάτω μέρος του σωλήνα.

6.4.4. Χρωματογραφία

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης: Η τεχνική αυτή χωρίζει τις πρωτεΐνες βάση του μεγέθους του πρωτεϊνικού μορίου όπως αναφέρεται στη παράγραφο 4.4.3. Η έκλουση των πρωτεϊνών μπορεί να παρακολουθηθεί με σύνδεση της εξόδου της στήλης με ανιχνευτή υπεριώδους και μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm.

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής: Με τη χρωματογραφία ιονανταλλαγής διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες βάση του συνολικού τους φορτίου καθώς εκκλύονται από φορτισμένες στατικές φάσεις (βλέπε παράγραφο 4.4.2). Το είδος και το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης καθώς και το είδος της ιονανταλλακτικής ρητίνης καθορίζουν το είδος του διαχωρισμού και τη σειρά έκλουσης των πρωτεϊνών. Η έκλουση της στήλης γίνεται με διαλύματα αλάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης. Τα ιόντα του αλάτος συναγωνίζονται με τις φορτισμένες πρωτεΐνες για τη σύνδεση τους στις ιονανταλλακτικές ρητίνες με αποτέλεσμα σταδιακά να εκκλύονται και οι ισχυρότερα συνδεδεμένες σε αυτές πρωτεΐνες.

Χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων: Η χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (hydrophobic interaction chromatography, HIC) εκμεταλλεύεται την υδρόφοβη φύση των πρωτεϊνών για να τις διαχωρίσει. Συγκεκριμένα, το μίγμα πρωτεϊνών εκλούεται από στήλη που περιέχει ως στατική φάση ένα αδρανές πολυμερικό υλικό (π.χ. αγαρόζη) πάνω στον οποίο είναι συνδεδεμένες υδρόφοβες ομάδες (π.χ. φαινυλο- ομάδες). Σε διαλύματα υψηλής αλατότητας οι πρωτεΐνες συνδέονται στη στατική φάση λόγω της υδροφοβικότητας τους και σταδιακά απελευθερώνονται από αυτή με έκλυση της στήλης με διαλύματα σταδιακά μειωμένης αλατότητας ή με την προσθήκη διαλύματος πολυαιθυλενογλυκόλης.

Χρωματογραφία χημικής συγγένειας: Η τεχνική αυτή διαχωρισμού εκμεταλλεύεται την ισχυρή τάση σύνδεσης πολλών πρωτεϊνών με συγκεκριμένες χημικές ομάδες που λειτουργούν ως προσδέτες (ligands) της πρωτεΐνης (βλέπε παράγραφο 4.4.4). Οι ομάδες αυτές που μπορεί να είναι υδατανθρακικές ομάδες, αλληλουχίες DNA ή και αντισώματα ενσωματώνονται σε αδρανή πολυμερικά υλικά μέσα από τα οποία εκλούεται το μίγμα πρωτεϊνών. Η έκλυση της συνδεδεμένης στη στατική φάση πρωτεΐνης γίνεται συνήθως με ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής αλατότητας που ευνοούν την αποσύνδεση της πρωτεΐνης από τη χημική ομάδα πάνω στην οποία συγκρατείται.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high-pressure liquid chromatography, HPLC): Οι προαναφερθέντες χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού, οι οποίες τα παλαιότερα χρόνια εφαρμόζονταν συνήθως ως χρωματογραφία στήλης πλέον μπορούν να εφαρμοστούν και με την πιο σύγχρονη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (βλέπε παράγραφο 4.4.6).

6.4.5. Ηλεκτροφόρηση

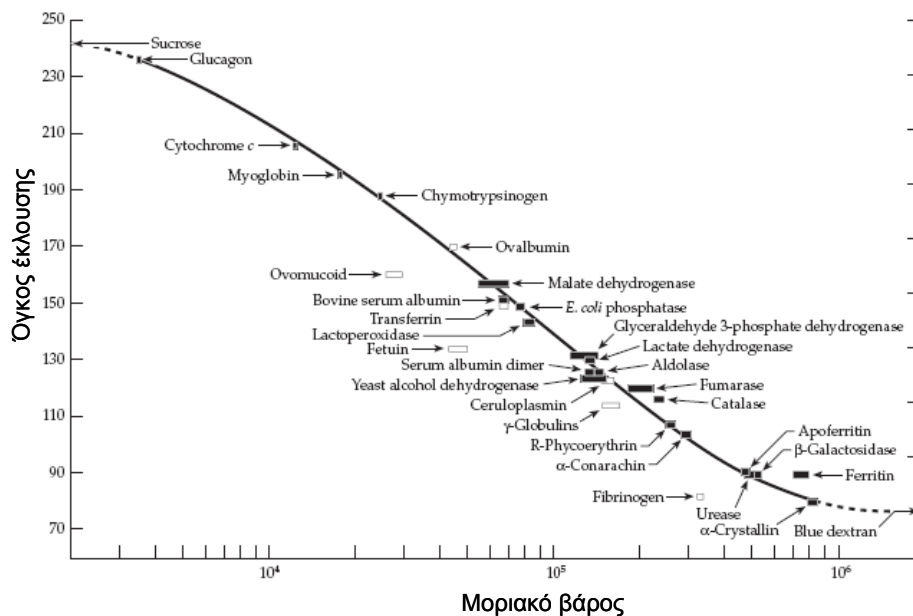
Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόζεται τόσο στον καθαρισμό, όσο και στο χαρακτηρισμό μίας πρωτεΐνης. Σπάνια χρησιμοποιείται για διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών σε παρασκευαστική κλίμακα αφού υπάρχουν ευκολότερες εναλλακτικές λύσεις για αυτή τη περίπτωση (π.χ. χρωματογραφία) αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας του καθαρισμού μίας πρωτεΐνης. Τα κλάσματα από τα διάφορα στάδια καθαρισμού ηλεκτροφορούνται και ιδανικά θα πρέπει, καθώς προχωράει ο καθαρισμός μίας πρωτεΐνης, να μειώνεται ο αριθμός και η ένταση των ζωνών των άλλων πρωτεϊνών και να αυξάνει η ένταση μίας συγκεκριμένης μπάντας που αντιστοιχεί στην προς διαχωρισμό πρωτεΐνη (βλέπε Κεφάλαιο 5).

6.5 Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών

6.5.1. Εύρεση MB πρωτεΐνης

Με χρωματογραφία μοριακής διήθησης: Ο όγκος έκλυσης μίας πρωτεΐνης από μία στήλη μοριακής διήθησης εξαρτάται από το μέγεθος αυτής και συγκεκριμένα από την ακτίνα Stokes, την διάμετρο δηλαδή της σφαίρας που καταλαμβάνει η πρωτεΐνη ευρισκόμενη σε διάλυμα. Η ακτίνα Stokes εξαρτάται από το μέγεθος και το MB της πρωτεΐνης. Για σφαιρικές πρωτεΐνες, που έχουν περίπου το ίδιο σχήμα, παρατηρείται μία γραμμική σχέση μεταξύ του δεκαδικού

λογάριθμου του MB της πρωτεΐνης ($\log MB$) και του όγκου έκλουσης από τη στήλη. Αν κατασκευαστούν καμπύλες όγκου έκλουσης γνωστών πρωτεϊνών σε συνάρτηση με το MB αυτών τότε από τον όγκο έκλουσης της προς προσδιορισμό πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί το MB της με σχετική ακρίβεια (Σχήμα 6.4).



Σχήμα 6.4. Καμπύλη μοριακού βάρους πρωτεϊνών με τον όγκο έκλουσης τους από στήλη μοριακής διήθησης Sephadex G-200

Με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου: Το μοριακό βάρος και το καθαρό φορτίο μίας πρωτεΐνης μπορούν να βρεθούν με διεξαγωγή PAGE σε πηκτές που έχουν σταθερό το %C αλλά διαφέρουν στο %T (βλέπε παράγραφο 5.3.2.1). Μετά από κάθε ηλεκτροφόρηση στις διαφορετικές πηκτές υπολογίζεται η σχετική μετακίνηση, R_f , της υπό μελέτης πρωτεΐνης σε σχέση με τη χρωστική-ιχνηθέτη. Στη συνέχεια κατασκευάζεται το διάγραμμα του $\log(R_f)$ σε σχέση με το %T (διάγραμμα Ferguson). Ο αντιστοίχτος της τεταγμένης επί την αρχή (%T=0) δείχνει το λόγο του φορτίου της πρωτεΐνης προς το φορτίο της χρωστικής και επειδή το φορτίο της χρωστικής είναι γνωστό μπορεί από αυτόν να βρεθεί το φορτίο της πρωτεΐνης. Η κλίση της καμπύλης είναι ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης. Συνεπώς, με την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους μπορεί να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς της κλίσης του διαγράμματος Ferguson για κάθε μοριακό βάρος και από την αντίστοιχη κλίση της άγνωστης πρωτεΐνης να βρεθεί το μοριακό της βάρος.

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους μίας πρωτεΐνης μπορεί να γίνει σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες με την τεχνική SDS-PAGE (βλέπε 5.3.2.1).

Φυγοκέντρωση: Το MB μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά, είτε από την εξίσωση Svedberg με τη τεχνική της διαφορικής φυγοκέντρωσης (βλέπε παράγραφο 2.4.1), είτε άμεσα με την τεχνική της φυγοκέντρωσης σε βαθμίδωση πυκνότητας (βλέπε παράγραφο 2.4.2). Με αυτό τον τρόπο προσδιορίζεται το MB μίας πρωτεΐνης κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες και συνεπώς μπορεί να προσδιοριστεί και η μάζα πρωτεϊνών με τεταρτοταγή δομή.

Φασματομετρία μάζας: Η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) είναι μία πολύ ισχυρή αναλυτική τεχνική αποκαλύπτοντας σημαντικές πληροφορίες για τη δομή μίας οργανικής ένωσης και το MB της. Τα προς ανάλυση μόρια ιονίζονται σε κενό αέρος και τα φορτισμένα μόρια εισέρχονται μέσα σε ηλεκτρικό ή/και μαγνητικό πεδίο. Η διαδρομή που ακολουθούν μέσα σε αυτό το πεδίο εξαρτάται από το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους (m/z), ο οποίος μπορεί να μετρηθεί και να μας δώσει το MB της ένωσης.

Αν και η τεχνική MS είναι πολύ διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της δομής οργανικών ενώσεων τα τελευταία μόνο χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών. Το μεγάλο πρόβλημα που αντιμετώπιζε η ανάλυση πρωτεϊνών με το MS ήταν ο ιονισμός και η διασπορά των πρωτεϊνικών μορίων στην αέρια φάση, ο οποίος με τις συμβατικές τεχνικές θα οδηγούσε σε διάσπαση των πρωτεϊνών. Το πρόβλημα λύθηκε με την ανάπτυξη τεχνικών όπως η matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI-MS) και το electrospray ionization (ES-MS) με τη βοήθεια των οποίων μπορούν να δημιουργηθούν ιόντα των πρωτεϊνικών μορίων τα οποία στη συνέχεια επιταγχύνονται μέσα από ένα ειδικό σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Ο χρόνος πτήσης των πρωτεϊνικών αυτών ιόντων μέσα στο σωλήνα μέχρι να φτάσουν στον ανιχνευτή (time of flight, TOF) είναι μέτρο του m/z του πρωτεϊνικού ιόντος, από τον οποίο μπορεί να βρεθεί και το MB. Η τεχνική αυτή έχει ίσως το μικρότερο όριο ανίχνευσης από όλες τις άλλες τεχνικές ανάλυσης πρωτεϊνών έχοντας την ικανότητα να προσδιορίσει το MB μίας πρωτεΐνης ποσότητας μερικών pmoles έως και fmoles.

6.5.2. Εύρεση ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεΐνης

Το ισοηλεκτρικό σημείο μίας πρωτεΐνης είναι χαρακτηριστική σταθερά για αυτήν, χαρακτηρίζει τη σχετική αναλογία των όξινων και βασικών αμινοξέων της και ισοδυναμεί με το pH στο οποίο το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν. Σε αυτό το pH η πρωτεΐνη χάνει την ηλεκτροφορητική της ικανότητα αφού δεν έχει φορτίο. Η τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης, επιτρέπει, αφενός το διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάση του ισοηλεκτρικού τους σημείου, αφετέρου την εύρεση του pI που είναι χαρακτηριστική σταθερά μίας πρωτεΐνης.

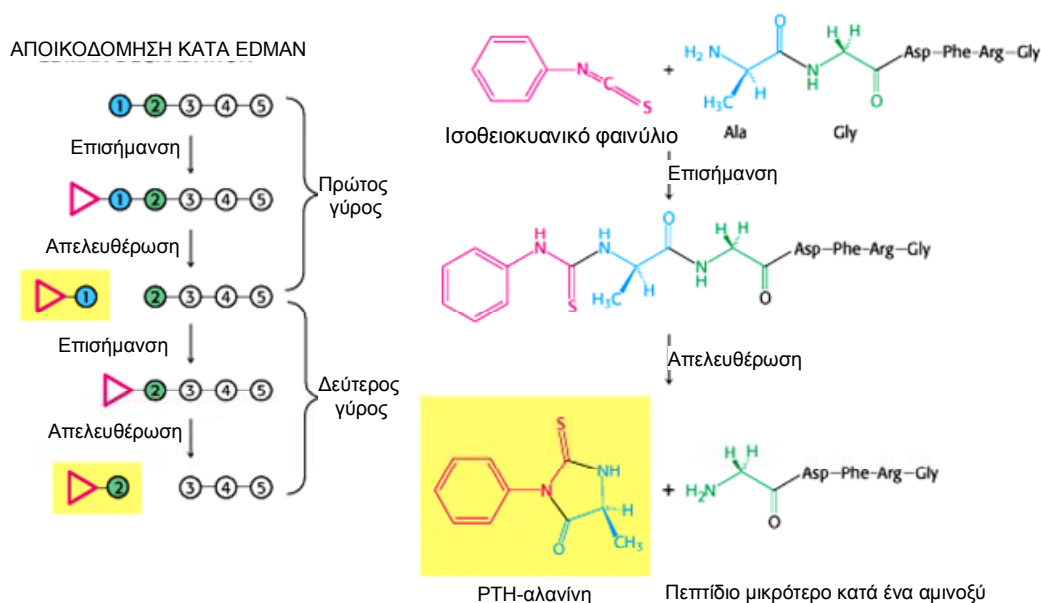
6.5.3. Εύρεση πρωτοταγούς δομής μίας πρωτεΐνης

Το πρώτο στάδιο στην εύρεση της δομής μίας πρωτεΐνης, η οποία έχει επιτυχώς καθαριστεί, είναι η εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων της.

Μια απλή ανάλυση της σύστασης των αμινοξέων μίας πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί αν αυτή υδrolυθεί κάτω από όξινες συνθήκες (HCl 6N, 110 °C, 24h) οπότε υδrolύονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και απελευθερώνονται τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια το μίγμα των αμινοξέων μπορεί να διαχωριστεί με κάποια χρωματογραφική μέθοδος και η ποσότητα των διαχωρισμένων αμινοξέων να προσδιοριστεί ύστερα από αντίδραση τους με νινυδρίνη ή κάποια φθορίζουσα ουσία. Η ένταση του χρώματος ή του φθορισμού του συμπλόκου του αμινοξέος με τη νινυδρίνη ή τη φθορίζουσα ουσία, αντίστοιχα είναι ανάλογη της ποσότητας του αμινοξέος.

Η παραπάνω τεχνική μπορεί να προσδιορίζει το είδος και τη σχετική αναλογία των αμινοξέων που απαρτίζουν μία πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν προσδιορίζει όμως τη σχετική θέση τους μέσα σε αυτή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αποικοδόμηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κατά Edman. Συγκεκριμένα, η ένωση ισοθειοκυανιούχο φαινύλιο αντιδρά με την αμινομάδα του αμινοτελικού αμινοξέος δίνοντας το φαινυλοθειοκαρβαμοΐλο παράγωγο. Η

παρουσία του παραγώγου αυτού στο αμινοτελικό αμινοξύ προσδίδει αυξημένη αστάθεια στο αμινοτελικό πεπτιδικό δεσμό σε σχέση με τους άλλους πεπτιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα κάτω από ήπιες αλκαλικές συνθήκες να αποκόπτεται, ένα κυκλικό παράγωγο του αμινοτελικού αμινοξέος αφήνοντας παράλληλα την πολυπεπτιδική αλυσίδα με ένα λιγότερο αμινοξύ. Το κυκλικό παράγωγο μπορεί να προσδιοριστεί με χρωματογραφικές τεχνικές. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται στο μικρότερο πεπτίδιο αποκαλύπτοντας τη φύση και του επόμενου αμινοξέος από το αμινοτελικό άκρο. Κάθε φορά που επαναλαμβάνεται η διαδικασία προσδιορίζονται ένα-ένα τα αμινοξέα της πρωτεΐνης με τη σειρά που βρίσκονται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο αυτής (Σχήμα 6.5). Σήμερα έχουν αναπτυχθεί αυτόματοι αναλυτές, που βασίζονται στη διαδικασία Edman, οι οποίοι μειώνουν πολύ το κόπο και το χρόνο ανάλυσης.



Σχήμα 6.5. Αρχή μεθόδου προσδιορισμού της αλληλουχίας αμινοξέων ενός πεπτιδίου με τη μέθοδο Edman

Στην πραγματικότητα δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί η μέθοδος Edman σε πεπτίδια μεγαλύτερα από 50 αμινοξέα λόγω σταδιακής μείωσης της ακρίβειας της μεθόδου. Για αυτό το λόγο η εύρεση της πρωτοταγούς δομής μίας μεγάλης πολυπεπτιδικής αλυσίδας γίνεται αφού πρώτα αυτή διασπαστεί σε μικρότερα πεπτίδια, των οποίων η πρωτοταγή δομή προσδιορίζεται με τη μέθοδο Edman. Η διάσπαση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γίνεται εξειδικευμένα, δηλαδή μεταξύ συγκεκριμένων αμινοξέων, είτε με χημικό, είτε με ενζυμικό τρόπο. Για παράδειγμα, το κυανογόνο βρωμίδιο διασπά την πολυπεπτιδική αλυσίδα στο καρβοξυ- άκρο καταλοίπων μεθειονίνης, ενώ το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη διασπά την πολυπεπτιδική αλυσίδα στην καρβοξυ πλευρά καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης. Τα πεπτίδια που προκύπτουν από τις εξειδικευμένες υδρολυτικές διασπάσεις διαχωρίζονται με χρωματογραφικές μεθόδους και στη συνέχεια προσδιορίζεται η πρωτοταγής δομή τους. Το επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της σωστής αλληλουχίας αυτών των πεπτιδίων μέσα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διάσπαση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με διαφορετικό τρόπο (π.χ. διαφορετικό πρωτεολυτικό ένζυμο) οπότε θα προκύψει ένα καινούργιο μίγμα πεπτιδίων των οποίων η πρωτοταγής δομή μπορεί να προσδιοριστεί, όπως παραπάνω. Η λογική σε αυτή τη

διαδικασία είναι να βρεθούν αλληλοεπικαλύπτομενες αλληλουχίες αμινοξέων στα πεπτίδια που προκύπτουν από τις διαφορετικές διασπάσεις τις πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οι οποίες θα βοηθήσουν τους ερευνητές να τοποθετήσουν σε σωστή σειρά τα πεπτίδια έτσι ώστε να προσδιορίσουν την αλληλουχία όλης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

6.5.4. Εύρεση τριτοταγούς δομής πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων μίας πρωτεΐνης μπορεί να δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την πιθανή δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της αλλά σε καμμία περίπτωση δε μπορεί να αποκαλύψει τη πραγματική δομή της πρωτεΐνης στο χώρο. Δύο πολύ ισχυρές φυσικοχημικές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκόπο είναι η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectroscopy) και η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποτελεί την καλύτερη τεχνική για τον προσδιορισμό της τριτοδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης αποκαλύπτοντας τις σχετικές θέσεις των ατόμων στο μόριο της πρωτεΐνης. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι η δημιουργία κρυστάλλων της προς προσδιορισμό πρωτεΐνης. Η δημιουργία κρυστάλλων επιτυγχάνεται συνήθως με την αργή προσθήκη θεϊκού αμμωνίου ή άλλου άλατος σε πυκνά διαλύματα της πρωτεΐνης. Η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης είναι πολλές φορές επίπονη διαδικασία και όχι πάντοτε επιτυχής. Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης ακτινοβολούνται από μία λεπτή δέσμη ακτίνων Χ, η οποία σκεδάζεται σε διάφορες κατευθύνσεις από τα άτομα της πρωτεΐνης. Οι σκεδαζόμενες ακτίνες προσπίπτουν σε φωτογραφικό χαρτί και ανιχνεύονται. Από την ένταση και τη σχετική θέση των ιχνών των σκεδαζόμενων ακτίνων και ύστερα από πολύπλοκους υπολογισμούς μπορεί να βρεθεί η σχετική θέση των ατόμων μίας πρωτεΐνης στο χώρο και συνεπώς η τριτοταγής της δομή (Σχήμα 6.6).

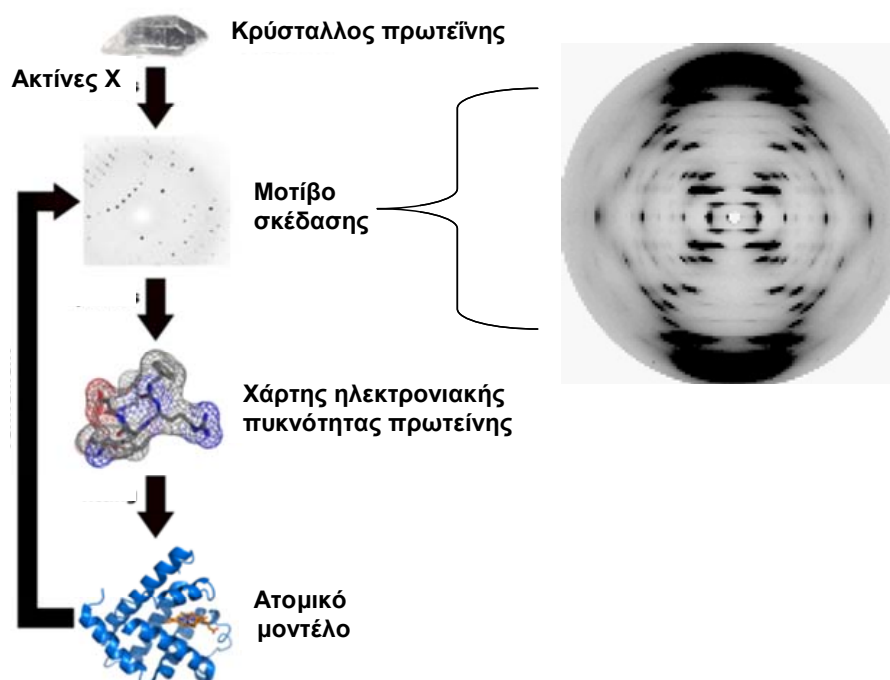
Η τεχνική NMR στηρίζεται γενικά στη καταγραφή των μαγνητικών ιδιοτήτων συγκεκριμένων ατομικών πυρήνων. Οι μαγνητικές ιδιότητες των ατομικών πυρήνων επηρεάζονται από το χημικό περιβάλλον αυτών και την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που τους περιβάλλει. Η τεχνική NMR πλεονεκτεί έναντι της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ στο ότι δεν απαιτείται η δημιουργία κρυστάλλων της πρωτεΐνης αλλά μπορεί να διεξαχθεί σε διάλυμα αυτής.

6.5.5. Εύρεση τεταρτοταγούς δομής πρωτεΐνης

Ο χαρακτηρισμός της τεταρτοταγής δομής μίας πρωτεΐνης αποσκοπεί βασικά στο να ανακαλύψει τον αριθμό και το είδος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων από τις οποίες μπορεί να αποτελείται μία πρωτεΐνη.

Ένας απλός τρόπος για να βρεθεί αυτό είναι να προσδιοριστεί το MB της ολικής πρωτεΐνης κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες με την τεχνική της φυγοκέντρωσης με εξισορρόπηση σε βαθμίδωση πυκνότητας και στη συνέχεια να προσδιοριστούν τα είδη και τα MB των επιμέρους πολυπεπτιδικών αλυσίδων της πρωτεΐνης με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτικές συνθήκες. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες πολυμερικών πρωτεϊνών συγκρατούνται συνήθως μεταξύ τους με ασθενείς, μη ομοιοπολικούς δεσμούς, όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβοι δεσμοί αλλά και με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί μπορούν διασπαστούν με κατεργασία της πρωτεΐνης με διαλύματα ακραίων pH, υψηλής

αλατότητας, χαοτροπικά αντιδραστήρια, όπως ουρία ή και με αναγωγικά αντιδραστήρια που διασπούν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (μερκαπτοαιθανόλη). Η διάσπαση των δεσμών αυτών θα απελευθερώσει τις επιμέρους πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν και να υπολογιστεί το MB τους με μία από τις προαναφερθείσες τεχνικές. Από το MB της μη αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης και από τα MB των επιμέρους πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορούν να υπολογιστεί ο αριθμός των αντιγράφων αυτών. Παράλληλα, μετά το διαχωρισμό των επιμέρους πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να προσδιοριστεί η αλληλουχία αμινοξέων σε αυτές με την μέθοδο Edman.



Σχήμα 6.6. Στάδια προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία ακτίνων X

6.6. Οι ανοσοχημικές τεχνικές στην υπηρεσία της ανάλυσης πρωτεϊνών

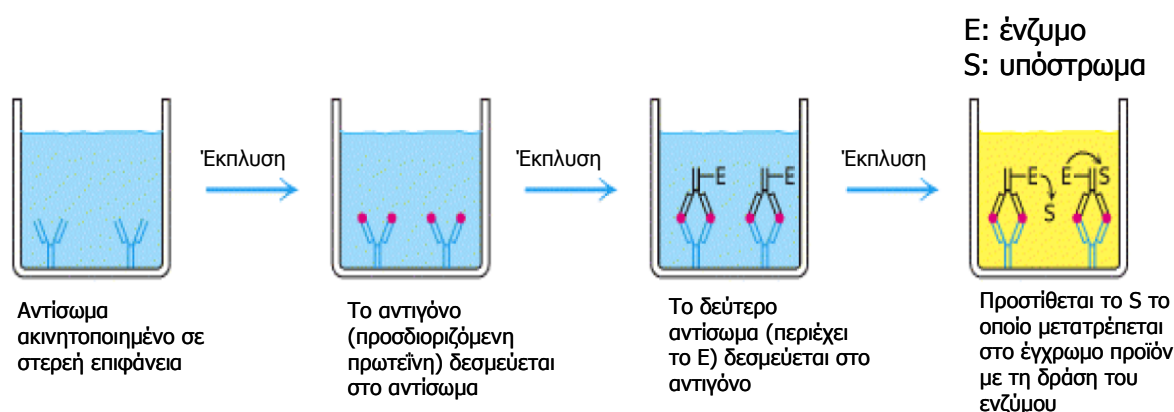
Οι ανοσοχημικές τεχνικές χρησιμοποιούν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν με σκοπό το διαχωρισμό τους, την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στα βιολογικά δείγματα. Το μεγάλο πλεονέκτημα των ανοσοχημικών τεχνικών έναντι των άλλων μεθόδων ανάλυσης των πρωτεϊνών είναι η μεγάλη εξειδίκευση τους λόγω της χρησιμοποίησης αντισωμάτων, απόλυτα εξειδικευμένων για την προς μελέτη πρωτεΐνη.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη των ανοσοχημικών τεχνικών είναι η δημιουργία αντισωμάτων έναντι μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες (ανοσοσφαιρίνες), οι οποίες δημιουργούνται φυσιολογικά από ένα οργανισμό σε απόκριση ξένων σωμάτων (αντιγόνων) μέσα σε αυτόν. Η παρουσία των αντιγόνων έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος του οργανισμού που επάγει τη δημιουργία, εξειδικευμένων ως προς το ξένο σώμα, αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη χημική ομάδα ή μία συγκεκριμένη αλληλουχία

αμινοξέων σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και μπορούν να συνδεόνται εξειδικευμένα πάνω σε αυτή. Οι χημικές αυτές ομάδες, που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα, λέγονται επίτοποι.

Είναι προφανές ότι για να δημιουργηθούν αντισώματα έναντι μίας πρωτεΐνης πρέπει αυτή να έχει προηγουμένως καθαριστεί. Η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι αυτής γίνεται συνήθως με ένεση διαλύματος της πρωτεΐνης σε πειραματόζωα, τα οποία, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, συνθέτουν αντισώματα έναντι αυτής. Στη συνέχεια, συλλέγεται αίμα από τα πειραματόζωα και απομονώνεται ο όρος, ο οποίος περιέχει τα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης. Ο όρος αυτός λέγεται αντιορός. Ο αντιορός περιέχει μία ποικιλία αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, το καθένα από τα οποία αναγνωρίζει διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο αυτής. Τα αντισώματα αυτά λέγονται πολυκλωνικά και παράγονται από πολλούς κλώνους των Β λεμφοκυττάρων. Ωστόσο σήμερα ο συνδυασμός κυτταρικών και μοριακών τεχνικών επιτρέπουν τη σύνθεση, σε μεγάλα ποσά, μονοκλωνικών αντισωμάτων, δηλαδή αντισωμάτων ενός μοριακού είδους που συνδέεται σε συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο μίας πρωτεΐνης τα οποία παράγονται από ένα μόνο κλώνο Β λεμφοκυττάρων.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα βρίσκουν αρχικά εφαρμογή στον καθαρισμό των πρωτεϊνών και ειδικότερα στη χρωματογραφία χημικής συγγένειας όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναλυτικό αντιδραστήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα χωρίς να απαιτείται ο προηγούμενος διαχωρισμός τους από αυτά. Η τεχνική που εφαρμόζεται για το σκοπό αυτό λέγεται ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές ELISA. Στην πιο κοινή, τύπου sandwich, ένα πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται σε στερεή αδρανή επιφάνεια. Στη συνέχεια, η προσθήκη του δείγματος οδηγεί στη δέσμευση της προς μελέτη πρωτεΐνης στο πρώτο αντίσωμα. Μετά από έκπλυση προστίθεται ένα διάλυμα δεύτερου αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης. Το δεύτερο αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένζυμο το οποίο μπορεί να αντιδράσει με ένα άχρωμο υπόστρωμα και να δώσει έγχρωμο προϊόν. Η ένταση του χρώματος του έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη της ποσότητας της προς προσδιορισμό πρωτεΐνης στο αρχικό μίγμα (Σχήμα 6.7). Η τεχνική ELISA είναι γρήγορη, απλή, αυτοματοποιήσιμη και μπορεί να ανιχνεύσει εξειδικευμένα λιγότερο από 1 ng πρωτεΐνης σε ένα βιολογικό δείγμα.



Σχήμα 6.7. Αρχή μεθόδου ELISA τύπου sandwich

Τα αντισώματα βρίσκουν εφαρμογή και στην ανίχνευση των πρωτεϊνών μετά από μία ηλεκτροφόρηση. Η τεχνική που εφαρμόζεται σε αυτή τη περίπτωση λέγεται ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting). Σύμφωνα με αυτή, αμέσως μετά από μία ηλεκτροφόρηση γίνεται μεταφορά (αποτύπωση) των πρωτεϊνών που βρίσκονται διαχωρισμένες πάνω στη

πηκτή, από τη πηκτή σε ένα φύλλο από πολυμερικό υλικό (π.χ. νιτροκυτταρίνη). Διάλυμα αντισώματος επεξεργάζεται στη συνέχεια με το πολυμερικό υλικό με αποτέλεσμα το αντίσωμα να συνδέεται εξειδικευμένα στην περιοχή που βρίσκεται η πρωτεΐνη-αντιγόνο. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος μπορεί να ανιχνευθεί με κατεργασία του πολυμερικού υλικού με ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι εξειδικευμένο για το πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα έχει συνδεδεμένο συνήθως πάνω του ραδιενεργή ή φθορίζουσα χημική ομάδα, η οποία δημιουργεί μία χαρακτηριστική σκοτεινή ζώνη σε φωτογραφικό χαρτί. Με αυτό το τρόπο μπορεί να ανιχνευθεί με ακρίβεια και ευαισθησία μία πρωτεΐνη μέσα σε ένα μίγμα χιλιάδων πρωτεϊνών.

7.1 Εισαγωγή

Τα λιποειδή αποτελούν την πιο ετερογενή, από άποψη χημικής δομής, τάξη βιομορίων. Στον όρο λιποειδή περιλαμβάνονται όλα τα βιομόρια που είναι αδιάλυτα στο νερό και διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος μορίων όπως υδρογονάνθρακες, λιπαρές αλκοόλες, λιπαρές αλδεΐδες, λιπαρά οξέα, κηρούς, φωσφολιποειδή, γλυκολιποειδή και σουλφατίδια. Επίσης περιλαμβάνει και συστατικά τα οποία συνήθως θεωρούνται ότι ανήκουν σε άλλες τάξεις μορίων όπως οι λιποδιαλυτές βιταμίνες Α, D, Ε, Κ και τα παράγωγά τους, τα καρτενοειδή και οι φαινολικές ενώσεις. Οι βιολογικές δράσεις και ο ρόλος των λιποειδών είναι τόσο ετερογενείς όσο και η χημική τους δομή. Αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των μεμβρανών των κυττάρων, μορφή αποθήκευσης ενέργειας για τον οργανισμό ενώ συγκεκριμένα λιποειδή έχουν ρόλο συνενζύμων, ορμονών, μορίων μεταφοράς ηλεκτρονίων και μεταγωγής μηνυμάτων. Η μελέτη επομένως των λιποειδών αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της Βιοχημείας και είναι απαραίτητη για την κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών.

Το πρώτο βήμα στη μελέτη των λιποειδών αποτελεί η απομόνωση τους από το βιολογικό δείγμα, στο οποίο μπορούν να βρίσκονται, είτε ελεύθερα, είτε δεσμευμένα με πρωτεΐνες (σύμπλοκα, χωρίς χημικούς δεσμούς) ή με υδατάνθρακες (συνδεδεμένα με χημικούς δεσμούς). Αρχικά επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του συνόλου των λιποειδών σε ομάδες που αποτελούν και τρόπο κατάταξης των λιποειδών: Στα απλά ή ουδέτερα και στα σύνθετα ή πολικά λιποειδή. Τα ουδέτερα λιποειδή (Neutral Lipids, NL) περιλαμβάνουν μη σαπωνοποιήσιμες ενώσεις ή απλούς εστέρες (λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, κηρούς, γλυκερίδια, κ.λπ.), τα δε πολικά λιποειδή (Polar Lipids, PL) έχουν χαρακτηριστικές χημικές ομάδες που προσδίδουν και την πολικότητα στο μόριό τους. Τέτοιες χημικές ομάδες είναι η φωσφορική (φωσφολιποειδή) ή κάποια υδατανθρακική ομάδα (γλυκολιποειδή). Ο διαχωρισμός σε φωσφολιποειδή, γλυκολιποειδή και ουδέτερα λιποειδή, είναι απαραίτητος γιατί έτσι σε κάθε ομάδα περιλαμβάνονται μόρια που δεν έχουν πολύ μεγάλες διαφορές στη πολικότητα, οπότε μπορούν να διαχωριστούν επιτυχώς με διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους, ώστε να απομονωθούν συγκεκριμένες τάξεις και είδη λιποειδών. Στη συνέχεια θα πρέπει να διαχωριστούν τα λιποειδή στις διάφορες τάξεις ομοιογενών χημικά λιποειδών (π.χ. λιπαρά οξέα, φωσφατιδυλο-χολίνες κ.λπ.) και περαιτέρω σε είδη, δηλαδή συγκεκριμένα μόρια (ελαϊκό οξύ, δι-παλμιτυλο-φωσφατιδυλο-χολίνη κ.λπ.).

7.2 Μέθοδοι παραλαβής λιποειδών

Πρώτο στάδιο στη μελέτη των λιποειδών είναι η παραλαβή τους από τη βιολογική πηγή, η οποία γίνεται συνήθως με εκχύλιση.

Ανεξάρτητα όμως από την ακριβή πορεία εκχύλισης είναι σημαντικό να ακολουθούνται κάποιοι βασικοί κανόνες για να αποφευχθούν σφάλματα. Η εκχύλιση των λιποειδών από ένα βιολογικό δείγμα πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν πιο γρήγορα ώστε να μην πραγματοποιηθεί οξειδωση τους ή να μη δράσουν ένζυμα, τα οποία βρίσκονται στο βιολογικό δείγμα, και τροποποιήσουν τη σύσταση των λιποειδών σε αυτό. Απενεργοποίηση των ενζύμων

επιτυγχάνεται με προσθήκη άμεσα στο προς εκχύλιση δείγμα αιθανόλης ή μεθανόλης. Κατά τη διαδικασία παραλαβής αλλά και γενικά επεξεργασίας των λιποειδών πρέπει να χρησιμοποιούνται γυάλινα σκεύη, τα οποία είναι ανθεκτικά σε οργανικούς διαλύτες, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των πλαστικών. Επίσης από ένα εργαστήριο λιποειδών απομακρύνεται κάθε λιπαντική ύλη που χρησιμοποιείται στα εσφυρισμένα υάλινα όργανα (π.χ. στρόφιγγες προχοϊδων), για να μη συμβούν μολύνσεις των προς ανάλυση λιποειδικών δειγμάτων. Η αποθήκευση των εκχυλισμάτων των λιποειδών πρέπει να γίνεται στους -20°C σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει αδρανές αέριο ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση τους. Σε αρκετές περιπτώσεις κρίνεται σκόπιμη η προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων, όπως βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), μέσα στο διάλυμα των λιποειδών. Κατά τα στάδια επεξεργασίας τους δεν πρέπει να εκτίθενται σε θερμοκρασίες άνω των $40-45^{\circ}\text{C}$.

Στην περίπτωση που το δείγμα είναι υγρό η παραλαβή των λιποειδών πραγματοποιείται με απευθείας εκχύλιση με κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι στερεό απαιτείται ένα πρώτο βήμα ομογενοποίησης, είτε με μηχανικό ομογενοποιητή, είτε με χρήση υπερήχων ώστε να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Η φύση του οργανικού διαλύτη που θα επιλεγεί για την εκχύλιση εξαρτάται από τη φύση των λιποειδών που θέλουμε να παραλάβουμε. Τα πολικά λιποειδή παραλαμβάνονται με οργανικό διαλύτη αυξημένης πολικότητας, όπως μεθανόλη, αιθανόλη ή μίγματα αλκοόλης με νερό σε διάφορες αναλογίες. Τα ουδέτερα λιποειδή τα οποία δεν έχουν ισχυρές πολικές ομάδες παραλαμβάνονται με διαλύτες χαμηλής πολικότητας όπως χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, πετρελαϊκός αιθέρας και βενζόλιο. Ειδικά, η εκχύλιση των λιποειδών από ένα στερεό δείγμα συνηθίζεται να γίνεται με διαδοχική χρήση διαλυτών αυξανόμενης (ή μειούμενης) πολικότητας.

Ο καλύτερος όμως τρόπος παραλαβής του συνόλου των λιποειδών από ένα βιολογικό δείγμα θεωρείται ότι είναι η χρήση μίγματος διαλυτών. Το μίγμα χλωροφορμίου, μεθανόλης και νερού σε διάφορες αναλογίες είναι αυτό που συνήθως χρησιμοποιείται. Οι μέθοδοι εκχύλισης των ολικών λιποειδών κατά Bligh Dyer και Folch χρησιμοποιούν αυτό το μίγμα διαλυτών και είναι οι πλέον διαδεδομένες για την παραλαβή των ολικών λιποειδών. Σύμφωνα με αυτές, σε κατάλληλη αναλογία χλωροφορμίου, μεθανόλης και νερού σχηματίζεται μονοφασικό σύστημα που με την προσθήκη χλωροφορμίου και νερού μετατρέπεται σε διφασικό σύστημα. Η μια φάση αποτελείται κυρίως από το χλωροφόρμιο ενώ η άλλη αποτελείται από το νερό και τη μεθανόλη. Η μεθανόλη διασπά τα σύμπλοκα των λιποειδών με τις πρωτεΐνες, η προσθήκη στο νερό άλατος (KCl , NaCl) βοηθάει στη μεταφορά των μη λιποειδικών συστατικών στην υδατική φάση ενώ το χλωροφόρμιο διαλύει τα λιποειδή. Η παραλαβή των ολικών λιποειδών γίνεται με παραλαβή της χλωροφορμικής φάσης.

Το κλάσμα των ολικών λιποειδών, που παραλαμβάνεται με την εκχύλιση, διαχωρίζεται αρχικά σε τάξεις (ουδέτερα λιποειδή, φωσφολιποειδή, γλυκολιποειδή) και, στη συνέχεια, κάθε τάξη διαχωρίζεται περαιτέρω σε ομάδες χημικά ομοιογενών λιποειδών.

7.3 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού λιποειδών

Για τον υπολογισμό των ολικών λιποειδών σε ένα δείγμα ο πιο απλός τρόπος είναι η εκχύλιση τους, η εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης και η ζύγιση μέχρι σταθερού βάρους. Όλες οι άλλοι μέθοδοι βασίζονται στον προσδιορισμό συγκεκριμένων λιποειδικών τάξεων ή μορίων.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιποειδών πραγματοποιείται με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις, τόσο στο εκχύλισμα όσο και στα κλάσματα που προκύπτουν κατά το διαχωρισμό

τους. Με τους χημικούς προσδιορισμούς προσδιορίζονται ποσοτικά συγκεκριμένα χημικά στοιχεία ή ομάδες των λιποειδών, όπως η φωσφορική ομάδα, το άζωτο, οι εστερικοί δεσμοί, τα σάκχαρα, οι αμινομάδες, οι αιθερικοί δεσμοί, η γλυκερόλη, ηθειϊκή ομάδα κ.α. Στη περίπτωση που οι χημικοί προσδιορισμοί εφαρμοστούν σε καθαρό κλάσμα (μία ένωση) αποτελούν τρόπο ποσοτικού προσδιορισμού της συγκεκριμένης ένωσης. Οι χημικοί προσδιορισμοί συνήθως καταλήγουν σε προϊόντα που απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος οπότε με χρήση κατάλληλης καμπύλης αναφοράς γίνεται η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Μερικές φορές είναι σκόπιμο να πραγματοποιηθεί υδρόλυση των λιποειδών στα επιμέρους δομικά συστατικά τους τα οποία και αναλύονται χημικά στη συνέχεια.

7.3.1. Προσδιορισμός φωσφολιποειδών

Ο ποσοτικός υπολογισμός των φωσφολιποειδών στο εκχύλισμα των λιποειδών μπορεί να γίνει με προσδιορισμό του λιποειδικού φωσφόρου. Ο προσδιορισμός βασίζεται στη καύση του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανο παρουσία υπερχλωρικού οξέος. Στη συνέχεια με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο που ανάγεται προς κυανού του φωσφομολυβδαινίου με προσθήκη αμινοναφθολοσουλφονικού οξέος και θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Το προϊόν που παράγεται είναι έγχρωμο και φωτομετρείται στα 820 ή 660 nm.

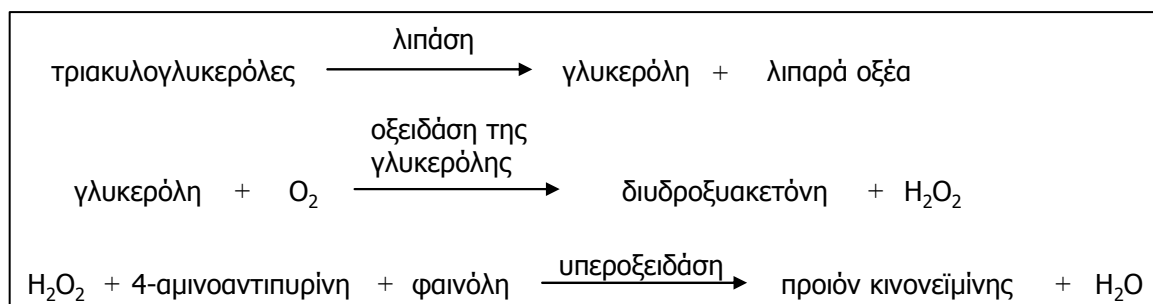
7.3.2. Προσδιορισμός γλυκολιποειδών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των γλυκολιποειδών στο εκχύλισμα των λιποειδών μπορεί να γίνει με προσθήκη πυκνούθειϊκού οξέος οπότε οι εξόζες δίνουν 5-υδροξυμεθυλοφουρφυράλη και οι πεντόζες σχηματίζουν φουρφυράλη, οι οποίες με φαινόλη δίνουν έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm (βλέπε παράγραφο 8.3.1.2). Η προσθήκη του πυκνούθειϊκού οξέος έχει παράλληλα σαν αποτέλεσμα την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των σακχάρων.

7.3.3. Προσδιορισμός ακυλογλυκερολών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μονο-, δι- και τριακυλογλυκερολών μπορεί να γίνει με προσδιορισμό της γλυκερόλης. Το εκχύλισμα των λιποειδών σαπωνοποιείται σε συνθήκες που δεν επηρεάζονται οι φωσφοεστερικοί δεσμοί. Η σαπωνοποίηση περιλαμβάνει την αλκαλική υδρόλυση των εστέρων των λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα να ελευθερώνεται η γλυκερόλη. Η αλκαλική υδρόλυση γίνεται με προσθήκη υδροξειδίου του καλίου και θέρμανση στους 70°C. Ο προσδιορισμός της γλυκερόλης που προκύπτει γίνεται με διάσπασή της σε φορμαλδεΰδη με προσθήκη υπερωδικού νατρίου. Η φορμαλδεΰδη, είτε αντιδρά με χρωμοτροπικό οξύ δίνοντας έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 570 nm, είτε αντιδρά με ακετυλοακετόνη και οξικό αμμώνιο προς παραγωγή φθορίζοντος προϊόντος.

Εναλλακτικά, ο προσδιορισμός των τριακυλογλυκερολών μπορεί να γίνει με ενζυμική μέθοδο που περιλαμβάνει την υδρόλυση με τη δράση του ενζύμου λιπάση και στη συνέχεια η γλυκερόλη που προκύπτει προσδιορίζεται με διάφορες συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις που οδηγούν σε προϊόν το οποίο προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Το τελικό προϊόν των συζευγμένων αντιδράσεων είναι ανάλογο της ποσότητας της γλυκερόλης η οποία με τη σειρά της είναι επίσης ανάλογη με τη ποσότητα των τριακυλογλυκερολών (Σχήμα 7.1).



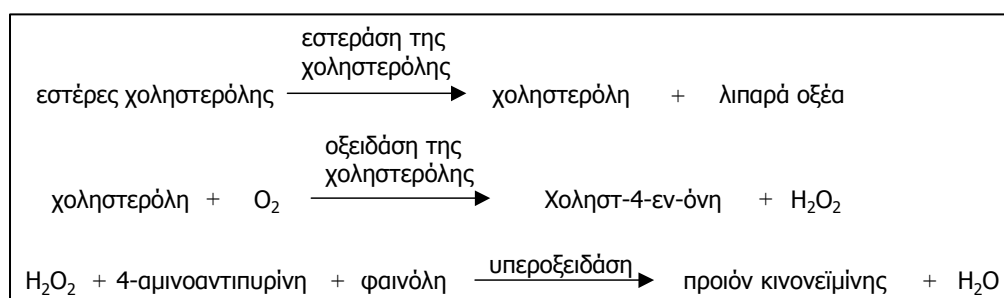
Σχήμα 7.1. Προσδιορισμός τριακυλογλυκερών με ενζυμική μέθοδο. Το προϊόν που κινονεΐμινης απορροφά στα 510 nm.

7.3.4. Προσδιορισμός χοληστερόλης

Στα περισσότερα βιολογικά δείγματα η χοληστερόλη βρίσκεται, είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε με τη μορφή εστέρων της. Ο προσδιορισμός επομένως της χοληστερόλης σε ένα δείγμα μπορεί να περιλαμβάνει, είτε τον προσδιορισμό των δυο μορφών ξεχωριστά, είτε τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης. Η καταβύθιση της ελεύθερης χοληστερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί με προσθήκη στο δείγμα διγτονίνης και τη δημιουργία αδιάλυτου συμπλόκου. Οπότε εάν πραγματοποιηθεί προσδιορισμός πριν και μετά την καταβύθιση και απομάκρυνση του ιζήματος προσδιορίζεται η ολική και εστεροποιημένη χοληστερόλη, αντίστοιχα. Από τη διαφορά των τιμών προκύπτει και η ελεύθερη χοληστερόλη.

Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης μπορεί να γίνει χημικά με τη μέθοδο Liebermann-Burchardt. Στη μέθοδο αυτή γίνεται αφυδάτωση της χοληστερόλης με οξικό οξύ και οξικό ανυδρίτη προς παραγωγή 3,5-χολησταδιενίου και στη συνέχεια η προσθήκη πυκνού θειικού οξέος οδηγεί στην οξείδωση και την παραγωγή χολησταεξενικού σουλφονικού οξέως που απορροφά στα 410 nm.

Εναλλακτικά, ο προσδιορισμός της ολικής χοληστερόλης μπορεί να γίνει με ενζυμική μέθοδο που περιλαμβάνει την υδρόλυση των εστέρων της με τη δράση του ενζύμου εστεράση της χοληστερόλης και στη συνέχεια η χοληστερόλη προσδιορίζεται με διάφορες συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις που οδηγούν σε προϊόν, το οποίο προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Το τελικό προϊόν των συζευγμένων αντιδράσεων είναι ανάλογο της ποσότητας της χοληστερόλης. Εάν παράλληλα γίνει προσδιορισμός παραλείποντας το στάδιο της υδρόλυσης τότε προσδιορίζεται μόνο η ελεύθερη χοληστερόλη και εκ της διαφοράς και η εστεροποιημένη.



Σχήμα 7.2. Προσδιορισμός χοληστερόλης με ενζυμική μέθοδο. Το προϊόν που κινονεΐμινης απορροφά στα 510 nm.

Πίνακας 7.1. Τάξεις των λιποειδών με σειρά αυξανόμενης πολικότητας

Λιγότερο πολικά			
Κορεσμένοι υδρογονάνθρακες	RH	Άπολα λιποειδή	
Ακόρεστοι υδρογονάνθρακες	RH		
Κηροί	W		
Εστέρες στερολών	SE		
Λιπαρές αλδεΐδες	Fald		
Τριακυλογλυκερόλες	TG		
Λιπαρές αλκοόλες	Falc		
Λιπαρά οξέα	FA		
Στερόλες	S		
Διακυλογλυκερόλες	DG		
Μονοακυλογλυκερόλες	MG		
Κερεβροζίτες	Cer	Πολικά λιποειδή	Γλυκο-
Γλυκοζυλο-διακυλογλυκερόλη	G-DG		
Σουλφατίδια	Sulph		
Φωσφατιδικό οξύ	PA		
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	PE		Φώσφο-
Λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	LPE		
Φωσφατιδυλοχολίνη	LPC		
Σφιγγομυελίνη	Sm		
Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη	LPC		
Περισσότερο πολικά			

7.4.1. Μέθοδοι καταβύθισης

Ένας τρόπος διαχωρισμού των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα και πολικά λιποειδή είναι η προσθήκη κατάλληλου διαλύτη όπου κάποια ομάδα λιποειδών θα καταβυθιστεί. Τα φωσφολιποειδή είναι αδιάλυτα σε παγωμένη ακετόνη ενώ τα ουδέτερα λιποειδή, συμπεριλαμβανομένου και των χρωστικών, είναι διαλυτά. Η προσθήκη επομένως στο δείγμα παγωμένης ακετόνης οδηγεί στην καταβύθιση των φωσφολιποειδών και το διαχωρισμό τους από τα άλλα λιποειδή.

7.4.2. Μέθοδοι εκχύλισης

Ο διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ουδέτερα και πολικά λιποειδή μπορεί να γίνει με κατανομή τους μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων οργανικών διαλυτών. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος περιλαμβάνει την κατανομή των ολικών λιποειδών σε διφασικό σύστημα, πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης (87%). Τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης (πολικός διαλύτης), τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα (μη πολικός διαλύτης).

7.4.3. Χρωματογραφία ανοικτής στήλης

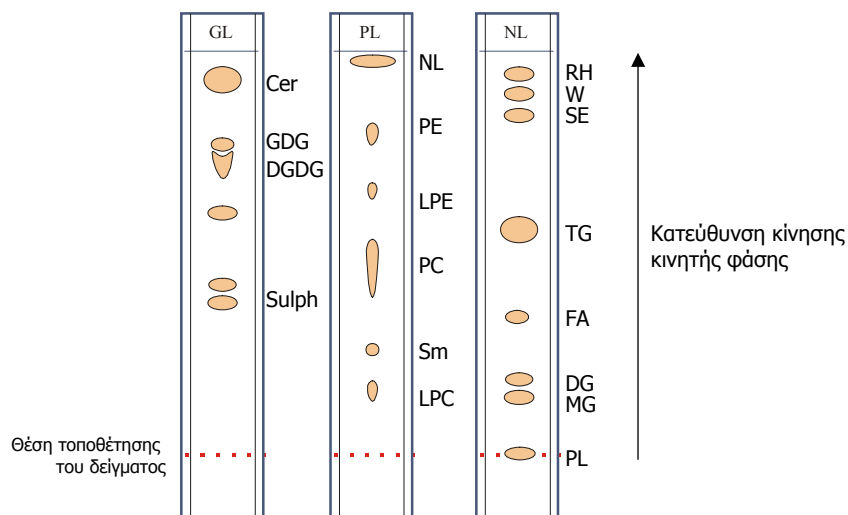
Ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει με τοποθέτηση του δείγματος σε στήλη που περιέχει κατάλληλη στατική φάση (βλέπε παράγραφο 4.4.5). Μπορεί να εφαρμοστεί τόσο η χρωματογραφία ιονανταλλαγής όσο και η χρωματογραφία προσρόφησης. Συνήθως ως στατική φάση χρησιμοποιείται η πηκτή πυριτικού οξέος. Όσο πιο πολικά είναι τα λιποειδή τόσο πιο ισχυρά θα δεσμεύονται στην πολική στατική φάση και θα καθυστερούν να εκλουστούν.

Η εφαρμογή της χρωματογραφίας στήλης για το διαχωρισμό των λιποειδών μπορεί να γίνει, είτε σε παρασκευαστική κλίμακα, είτε σε αναλυτική κλίμακα. Στη παρασκευαστική χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες δείγματος και προκύπτουν κλάσματα λιποειδών παρόμοιας πολικότητας, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω. Η χρήση επομένως αρχικά άπολου διαλύτη, όπως χλωροφόρμιο, οδηγεί στην έκλυση και την παραλαβή του κλάσματος των ουδετέρων λιποειδών, η χρήση ακετόνης στη συνέχεια οδηγεί στην έκλυση και την παραλαβή του κλάσματος των πολικών-μη φορτισμένων λιποειδών και τέλος η χρήση μεθανόλης οδηγεί στην έκλυση και την παραλαβή του κλάσματος των πολικών-φορτισμένων λιποειδών. Τα κλάσματα αυτά μπορούν στη συνέχεια να διαχωριστούν περαιτέρω σε άλλη στήλη με χρήση κατάλληλων διαλυτών ή με άλλο είδος χρωματογραφίας (TLC, HPLC).

7.4.4. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Ο διαχωρισμός με TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί, είτε σε παρασκευαστική κλίμακα, πριν την εφαρμογή άλλης τεχνικής διαχωρισμού, είτε σε αναλυτική κλίμακα. Η πιο συνηθισμένη στατική φάση, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των λιποειδών με TLC, είναι η πηκτή πυριτικού οξέος (βλέπε κεφάλαιο 4.3). Η πηκτή πυριτικού είναι πολική στατική φάση με αποτέλεσμα τα πολικά λιποειδή να δεσμεύονται πιο ισχυρά σε αυτήν καθώς ανεβαίνει η κινητή φάση και να καθυστερούν να μετακινηθούν (κύριο φυσικοχημικό φαινόμενο η προσρόφηση). Αντίθετα τα ουδέτερα λιποειδή δε δεσμεύονται ισχυρά στη στατική φάση και παρασύρονται από την κινητή φάση μετακινούμενα πιο ψηλά στην πλάκα. Ο διαλύτης της κινητής φάσης και σε αυτή την περίπτωση ανταγωνίζεται με τα λιποειδή για τις θέσεις δέσμευσης στη στατική φάση. Η αυξανόμενη πολικότητα της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την εκτόπιση των λιποειδών από τη στατική φάση και την πιο γρήγορη μετακίνηση τους.

Εάν θέλουμε να διαχωρίσουμε το κλάσμα των πολικών λιποειδών στις διάφορες τάξεις τότε θα χρησιμοποιηθεί σχετικά πολική κινητή φάση, συνήθως μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου, μεθανόλης και νερού σε διάφορες αναλογίες. Εάν θέλουμε να διαχωρίσουμε το κλάσμα των ουδετέρων λιποειδών στις επιμέρους τάξεις τότε θα χρησιμοποιηθεί σχετικά άπολη κινητή φάση, συνήθως μίγμα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα, διαιθυλαιθέρα, οξικού οξέος. Στο σχήμα 7.4 φαίνεται ένας χαρακτηριστικός διαχωρισμός γλυκολιποειδών (GL), πολικών λιποειδών (PL) και ουδετέρων λιποειδών (NL) σε στατική φάση πυριτικού οξέος.



Σχήμα 7.4. Διαχωρισμός GL, PL και NL σε TLC πυριτικού οξέος. Τα συστήματα ανάπτυξης είναι για τα GL χλωροφόρμιο:ακετόνη:μεθανόλη:οξικό οξύ:νερό (50:20:17:5:5, v/v/v/v/v), για τα PL χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:35:6, v/v/v) και για τα NL πετρελαιοί αιθέρας:αιθέρας:οξικό οξύ (90:10:1, v/v/v), αντίστοιχα.

Η ανίχνευση των λιποειδών στη TLC (βλέπε παράγραφο 4.3.5) μπορεί να γίνει, είτε με τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο με ατμούς ιωδίου, είτε με ειδικά αντιδραστήρια ψεκασμού. Στον πίνακα 7.2 φαίνονται τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ψεκασμού για τη μελέτη των λιποειδών.

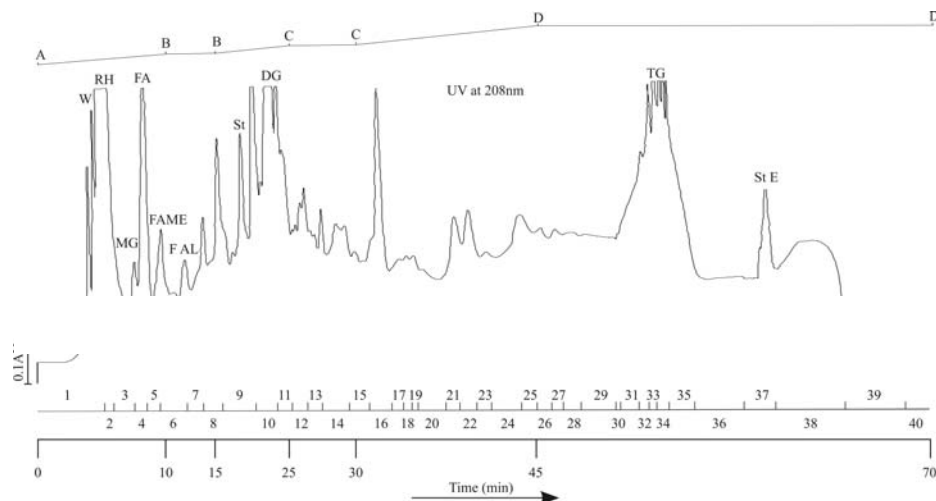
Πίνακας 7.2. Ειδικά αντιδραστήρια ψεκασμού για την ανίχνευση των λιποειδών

Αντιδραστήριο ψεκασμού	Ομάδα που ανιχνεύεται
Μολυβδαινικό αμμώνιο	Φωσφορικές ομάδες
Νινυδρίνη	Αμινο-ομάδες
Ναφθόλη	Σάκχαρα
Χλωριούχος σίδηρος	Χοληστερόλη

7.4.5. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

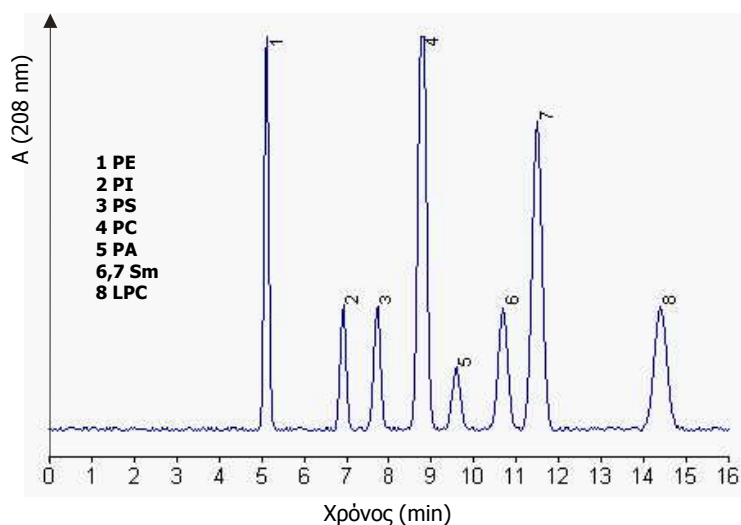
Συνήθως στη μελέτη των λιποειδών εφαρμόζεται πρώτα μια χρωματογραφία στήλης για έναν πρώτο διαχωρισμό των λιποειδών σε ομάδες και στη συνέχεια στα κλάσματα που προκύπτουν εφαρμόζεται χρωματογραφία HPLC (παράγραφος 7.4.5) για το περαιτέρω διαχωρισμό των λιποειδών σε τάξεις. Η λογική του διαχωρισμού είναι ίδια με αυτή της χρωματογραφίας ανοικτής στήλης.

Στην αναστροφής φάσης HPLC (reversed phase, RP-HPLC) η στατική φάση είναι άπολη οπότε τα λιποειδή εκλούνται με αντίστροφη σειρά δηλαδή μειούμενης πολικότητας (Σχήμα 7.5). Το κύριο φυσικοχημικό φαινόμενο είναι η κατανομή.



Σχήμα 7.5. Χαρακτηριστικός διαχωρισμός ουδέτερων λιποειδών με HPLC σε στήλη αντιστρόφου φάσης με βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης διαλυτών αποτελούμενο από χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και ισοπροπανόλη.

Στην κανονικής φάσης HPLC (normal phase, NP-HPLC) η στατική φάση είναι πολική οπότε τα λιποειδή εκλούνται από τη στήλη με σειρά αυξανόμενης πολικότητας (Σχήμα 7.6). Το κύριο φυσικοχημικό φαινόμενο είναι η προσρόφηση.

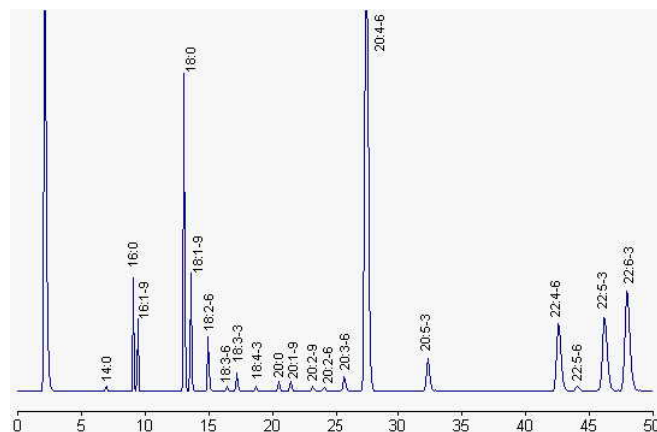


Σχήμα 7.6. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των φωσφολιποειδών σε HPLC σε στήλη κανονικής φάσης και βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης διαλυτών αποτελούμενο από χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό.

7.4.6. Αέριος χρωματογραφία, GC

Όπως έχει προαναφερθεί η κινητή φάση στην αέρια χρωματογραφία είναι αέριο επομένως τα προς διαχωρισμό λιποειδή πρέπει να βρίσκονται σε αέρια μορφή. Κάποια από τα λιποειδή είναι ήδη πτητικά (π.χ. αλδεΐδες) και μπορούν να διαχωριστούν άμεσα κάποια όμως πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγά. Συνήθως με την GC αναλύονται τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στις ομάδες των λιποειδών. Για παράδειγμα το κλάσμα των φωσφολιποειδών μπορεί να υποστεί αρχικά υδρόλυση σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον

παρουσία μεθανόλης και να προκύψουν οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που υπήρχαν στο σκελετό γλυκερόλης των φωσfolιποειδών. Οι εστέρες αυτοί μπορούν να διαχωριστούν σε GC και ο διαχωρισμός τους θα οφείλεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Κάθε εστέρας έχει διαφορετική κατανομή ανάμεσα στις δυο φάσεις ανάλογα την πτητικότητα του που εξαρτάται από το μήκος και την ακορεστότητα της λιπαρής αλυσίδας (Σχήμα 7.7). Η επανάληψη της διαδικασίας σε διάφορα κλάσματα λιποειδών μας δίνει τη περιεκτικότητα και το είδος των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στις διάφορες τάξεις/είδη των λιποειδών.



Σχήμα 7.7. Χαρακτηριστικός διαχωρισμός λιπαρών οξέων με GC

7.5 Χαρακτηρισμός λιποειδών

Ο καθορισμός της δομής ενός λιποειδούς απαιτεί τον συνδιασμό πολλών μεθοδών συμπεριλαμβανομένου της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του, χαρακτηριστικών χημικών αντιδράσεων και φασματοσκοπικών τεχνικών.

7.5.1. Χρωματογραφική συμπεριφορά

Οι χρωματογραφικές τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως (στήλη, TLC, HPLC, GC) δίνουν πληροφορίες και για τη δομή. Η σύγκριση του όγκου έκλουσης, του R_f , ή του R_t ενός συστατικού με τα αντίστοιχα πρότυπων ενώσεων δίνει στοιχεία για τη δομή του μορίου, ενώ το εμβαδόν των κορυφών ή η ένταση των κηλίδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του.

7.5.2 Χημικοί προσδιορισμοί

Με τους χημικούς προσδιορισμούς εκτός από τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιποειδών προκύπτουν στοιχεία και για τη δομή τους. Μπορεί να καθοριστεί η ύπαρξη ή μη συγκεκριμένων ομάδων των λιποειδών, όπως φωσφόρος, άζωτο, εστέρες, σάκχαρα, αμινομάδες, γλυκεριναιθερικές ομάδες, γλυκερόλη, θειικές ομάδες κ.λπ. Επιπλέον ο ποιοτικός προσδιορισμός (ανίχνευση) μπορεί να γίνει με τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε πλάκα TLC

(χωρίς ανάπτυξη) και με χρήση ειδικών αντιδραστηρίων ψεκασμού να βρεθεί εάν περιέχει φωσφολιποειδή ή γλυκολιποειδή κ.τ.λ. (βλεπε παράγραφο 4.3.5).

7.5.3. Υδρόλυση Λιποειδών

Στα διάφορα είδη λιποειδών υπάρχει μεγάλη ποικιλία δεσμών (εστερικός, αιθερικός, αμιδικός, γλυκοζιτικός). Οι δεσμοί αυτοί έχουν διαφορετικές ιδιότητες και υδρολύονται (σπάνε) σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Η υδρόλυση επομένως των λιποειδών μπορεί να μας δώσει στοιχεία για τη δομή τους αφού επιτυγχάνεται διάσπασή τους σε επιμέρους δομικά συστατικά τα οποία και αναλύονται χημικά. Η υδρόλυση των λιποειδών μπορεί να γίνει είτε χημικά, είτε ενζυμικά. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες υδρολύονται τα λιποειδή είναι χαρακτηριστικές των δεσμών που υπάρχουν σε αυτά. Η ανάλυση στη συνέχεια των υδρολυμένων προϊόντων των λιποειδών συντείνει την ταυτοποίηση τους.

7.5.4. Φασματοσκοπικές τεχνικές

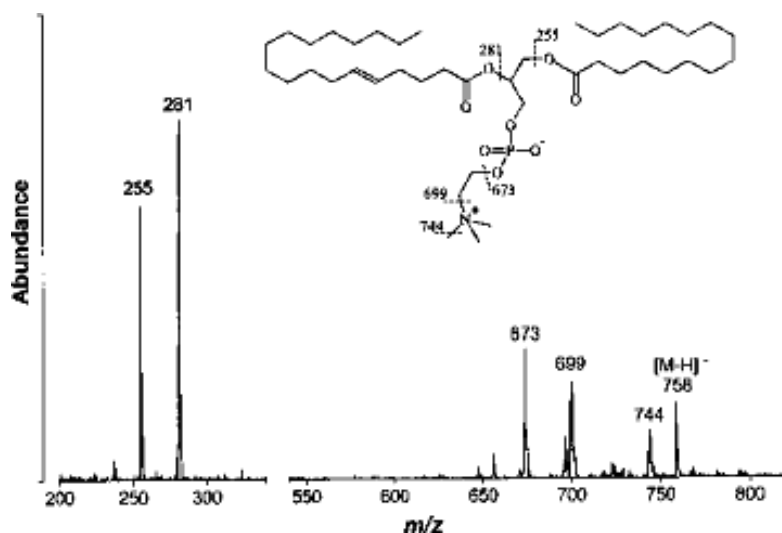
Οι φασματοσκοπικές τεχνικές είναι χρήσιμα εργαλεία για την πιστοποίηση της δομής των λιποειδών. Βασίζονται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων και εφαρμόζονται συνήθως σε καθαρά κλάσματα λιποειδών, με σκοπό την τελική απόδειξη/επιβεβαίωση της δομής τους.

7.5.4.1. Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV-Vis)

Το φάσμα απορρόφησης συγκεκριμένου λιποειδούς εμφανίζει χαρακτηριστική μορφή που οφείλεται στη χημική του δομή του (βλέπε κεφάλαιο 1). Χημικές ομάδες με μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, όπως καρβονύλιο και οι συζυγιστικοί διπλοί δεσμοί, απορροφούν ισχυρά σε αυτή τη περιοχή του φάσματος σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος ($\lambda_{\max}$). Η σύγκριση με φάσματα γνωστών ενώσεων μπορεί να αποτελέσει στοιχείο πιστοποίησης της δομής των λιποειδών.

7.5.4.2. Φασματοσκοπία μάζας (MS)

Η φασματοσκοπία μάζας είναι χρήσιμη τεχνική για την πιστοποίηση της δομής των λιποειδών. Βασίζεται στη δημιουργία ιόντων (θετικών ή αρνητικών) του λιποειδούς και την είσοδο τους σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η διαδρομή που ακολουθούν μέσα σε αυτό το πεδίο εξαρτάται από το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους (m/z), ο οποίος μπορεί να μετρηθεί και να μας δώσει το MB της ένωσης. Επιπλέον η εφαρμογή συγκεκριμένου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ιονισμένων θραυσμάτων από το μόριο του λιποειδούς που είναι χαρακτηριστικά της δομής του. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που απαιτείται (Σχήμα 7.8)



Σχήμα 7.8. Χαρακτηριστικό φάσμα αρνητικών ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης

7.5.4.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η τεχνική του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στηρίζεται γενικά στην καταγραφή των μαγνητικών ιδιοτήτων συγκεκριμένων ατομικών πυρήνων. Οι μαγνητικές ιδιότητες των ατομικών πυρήνων επηρεάζονται από το χημικό περιβάλλον αυτών και την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που τους περιβάλλει και είναι επομένως χαρακτηριστικές της δομής των λιπιδίων. Μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι απαιτούνται σχετικά μεγάλες ποσότητες καθαρού λιπιδίου.

8.1 Εισαγωγή

Οι υδατάνθρακες είναι μια από τις τέσσερις κύριες τάξεις βιομορίων και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό οργανικής ύλης επάνω στη γη. Δομικά είναι πολυυδρόξυ- κετόνες ή αλδεΐδες ή πολυμερή αυτών. Επιπλέον, υπάρχουν παράγωγα αυτών που περιέχουν N, S ή P. Υπάρχουν τρεις κύριες τάξεις υδατανθράκων ανάλογα τον αριθμό των μονοσακχαριτών που περιέχουν και αυτές είναι: α) οι μονοσακχαρίτες, β) οι ολιγοσακχαρίτες ($2 \leq \text{μονοσακχαρίτες} < 20$) και γ) πολυσακχαρίτες ($20 \leq \text{μονοσακχαρίτες}$). Οι πολυσακχαρίτες χωρίζονται περαιτέρω σε ομο- ή ετερο- ανάλογα εάν περιέχουν ένα ή περισσότερα είδη μονοσακχαριτών αντίστοιχα. Η ένωση των μονοσακχαριτών γίνεται με γλυκοζιτικούς δεσμούς οι οποίοι σχηματίζονται με συμπύκνωση α- ή β-υδροξυλίων του ανωμερικού C ενός σακχάρου με υδροξύλια των C-2, 3, 4, 5 ή 6 ενός δευτέρου σακχάρου.

Οι υδατάνθρακες έχουν σημαντικές δράσεις. Χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας, ως καύσιμα και ως μεταβολικά ενδιάμεσα. Επιπλέον τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο ως μόρια αναγνώρισης. Η γλυκοβιολογία μελετάει τη δομή και τη λειτουργία μορίων που συνδέονται με υδατάνθρακες και αποτελεί ένα ενεργό κομμάτι στη σύγχρονη έρευνα της βιοχημείας. Σήμερα είναι σαφές ότι ειδικοί ολιγοσακχαρίτες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, την αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου, την ανάπτυξη των ιστών καθώς και στα εξωκυτταρικά μηνύματα. Για αυτό το λόγο η μελέτη των υδατανθράκων τα τελευταία χρόνια έχει γνωρίσει ειδικότερη ανάπτυξη.

Η ανάλυση των υδατανθράκων είναι πολύπλοκη διαδικασία γιατί υπάρχουν πολλές και διαφορετικές διακλαδώσεις στο μόριο τους. Περιλαμβάνει την υδρόλυση και το διαχωρισμό τους από τα άλλα βιομόρια (πρωτεΐνες, λιποειδή, νουκλεϊνικά οξέα) στα οποία είναι συνδεδεμένοι, και στη συνέχεια τη σταδιακή αποικοδόμηση τους με ειδικά αντιδραστήρια τα οποία βοηθάνε στον προσδιορισμό της θέσης των χημικών δεσμών ή στη στερεοχημεία του μορίου. Η πιστοποίηση της δομής των υδατανθράκων περιλαμβάνει στο τελικό της στάδιο τις φασματοσκοπικές μεθόδους ανάλυσης (MS, NMR).

8.2 Μέθοδοι παραλαβής υδατανθράκων

Η απομόνωση των υδατανθράκων βασίζεται στη διαφορά διαλυτότητας που εμφανίζουν σε σχέση με τα άλλα βιομόρια. Ένα μεγάλο μέρος των υδατανθράκων, με εξαίρεση τα γλυκολιποειδή και τους δομικούς υδατάνθρακες (κυτταρίνη), είναι αδιάλυτοι σε οργανικούς διαλύτες και ευδιάλυτοι στο νερό. Επίσης, σε χαμηλό pH, οι υδατάνθρακες είναι διαλυτοί, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα τα οποία, κάτω από τις συνθήκες αυτές, καταβυθίζονται. Επίσης, η θέρμανση ή η προσθήκη οργανικών διαλυτών (χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη 25:1, v/v) μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση τους από το δείγμα των υδατανθράκων.

Η διαδικασία παραλαβής των υδατανθράκων αρχικά περιλαμβάνει την αποδέσμευση τους από τις άλλες τάξεις βιομορίων (γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, γλυκολιποειδή) στις οποίες είναι συνδεδεμένοι με χημικούς δεσμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών ενζύμων, τις γλυκοζιδάσες, οι οποίες υδρολύουν εκλεκτικά, είτε O- είτε N- γλυκοζιτικούς

δεσμούς καθώς και με τη χρήση λιπασών που απομακρύνουν το λιποειδικό τμήμα του μορίου. Τα νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να απομακρυνθούν και με χρησιμοποίηση ενζύμων αποικοδόμησης του DNA και του RNA.

Μετά την απομάκρυνση των άλλων βιομορίων, οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες καθιζάνουν με την προσθήκη πολικών οργανικών διαλυτών (αιθανόλης ή ακετόνης) και ψύξη.

8.3 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού υδατανθράκων

8.3.1 Χημικές μέθοδοι

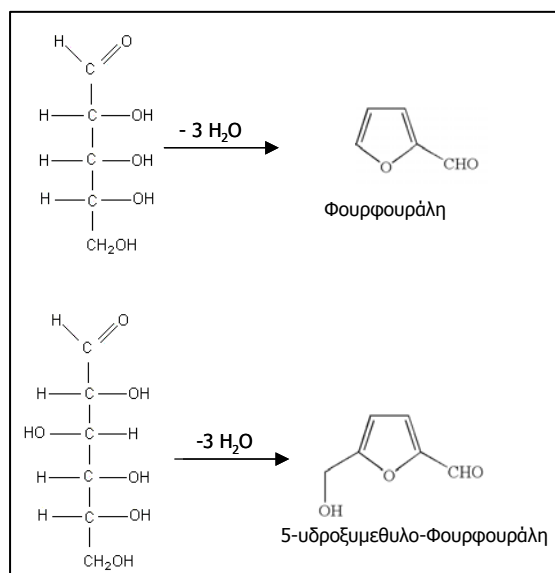
Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου που με την καρβόνυλο- ομάδα του υδατάνθρακα δίνει έγχρωμο προϊόν το οποίο και φωτομετρείται. Η έλλειψη εξειδίκευσης σε αυτές τις μεθόδους οφείλεται στο ότι πολλοί μονοσακχαρίτες έχουν παρόμοια δομή και επομένως συνήθως υπολογίζονται τα ολικά σάκχαρα σε ένα δείγμα. Οι πολυσακχαρίτες αρχικά πρέπει να υδρολυθούν σε μονοσακχαρίτες και μετά να ακολουθήσει ο ποσοτικός προσδιορισμός τους.

8.3.1.1 Αναγωγικές αντιδράσεις

Οι περισσότερες χημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των σακχάρων βασίζονται στις αναγωγικές τους ιδιότητες. Οι υδατάνθρακες, οι οποίοι έχουν μια δυνητικά ελεύθερη αλδεϋδο- ή κετο- ομάδα, βρίσκονται σε διάλυμα σε ισορροπία με τη μορφή της ενόλης. Η ομάδα της ημιακετάλης ή «ανάγουσα ομάδα» είναι πολύ δραστική σε διαλύματα αραιών αλκάλων και δίνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι πολύπλοκες και μη στοιχειομετρικές. Παρ'όλα αυτά εάν οι συνθήκες ελέγχονται (θερμοκρασία, συγκέντρωση αλκάλειος, συγκέντρωση οξειδωτικού μέσου και χρόνος), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική ανάλυση σακχάρων. Ως οξειδωτικά μέσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες ενώσεις. Τα πιο διαδεδομένα είναι τα ιόντα Cu^{2+} και το σιδηρικού ανιόν $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Ο Cu^{2+} ανάγεται σε Cu^+ και στη συνέχεια με θέρμανση δίνει Cu_2O που έχει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Το σιδηρι(III)κυανιούχο ιόν με θέρμανση στους 100 °C μετατρέπεται σε σιδηρο(II)κυανιούχο ιόν και μετράται η απορρόφηση στα 237 nm, η οποία είναι ανάλογη των σακχάρων που οξειδώθηκαν. Η ύπαρξη πρωτεϊνών και συγκεκριμένα τα αμινοξέα τυροσίνη και θρυπτοφάνη μπορούν να παρεμποδίσουν τον παραπάνω προσδιορισμό. Για αυτό το λόγο καλό είναι να πραγματοποιείται τυφλός προσδιορισμός με θέρμανση στους 40 °C αντί στους 100 °C όπου τα ανάγοντα σάκχαρα σε αντίθεση με τα αμινοξέα μένουν άθικτα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για να προσδιορίζονται οι υδατάνθρακες στις γλυκοπρωτεΐνες.

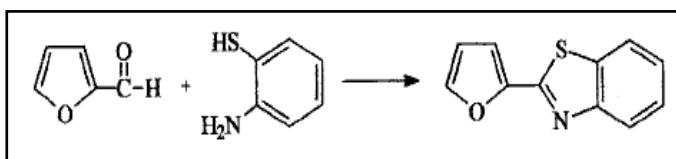
8.3.1.2 Αντιδράσεις με οξύ και φαινόλη

Τα ολικά σάκχαρα μπορούν να προσδιοριστούν με προσθήκη πυκνού θειικού οξέος όπου οι εξόζες και οι πεντόζες σχηματίζουν 5-υδροξυμεθυλοφουρφυράλη και φουρφυράλη, αντίστοιχα, που με φαινόλη δίνουν έγχρωμη ένωση που απορροφά στα 490 nm. Η προσθήκη του πυκνού θειικού οξέος έχει παράλληλα σαν αποτέλεσμα και την υδρόλυση τυχόν παραγώγων των μονοσακχάρων, (π.χ. των γλυκολιποειδών). Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται σάκχαρα σε ποσότητα μg.



Σχήμα 8.1. Αφυδάτωση εξοζών και πεντοζών παρουσία πυκνού οξέος.

Εναλλακτικά οι παραγόμενες φουρφουράλες μπορούν να αντιδράσουν με 2-αμινοθειοφαινόλη προς σχηματισμό του φθορίζοντος προϊόντος 2-(2-φουρυλ)βενζοθειαζόλης και παρόμοιων προϊόντων. Ο φθορισμός μετράται στα 411 nm με μήκος κύματος διέγερσης τα 361 nm. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται σάκχαρα μεταξύ 0,05–0,6 μg .



Σχήμα 8.2. Αντίδραση φουρφουράλης με 2-αμινοθειοφαινόλη

8.3.1.3 Αντιδράσεις με αμίνες

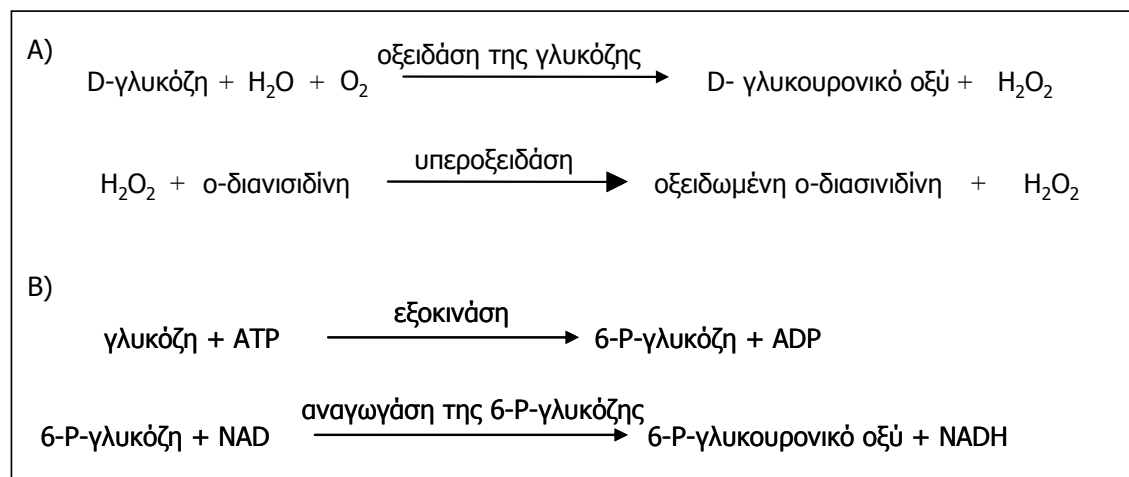
Ο προσδιορισμός των σακχάρων μπορεί να γίνει και με τη χρήση διαφόρων αμινών όπως η ανιλίνη, το 2-αμινοδιφαινύλιο και η ο-τολουϊδίνη, οι οποίες αντιδρούν με τα σάκχαρα σε θερμό αλκαλικό περιβάλλον προς σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων (βάσεις Schiff). Επειδή οι άλλες αμίνες είναι καρκινογόνες συνήθως χρησιμοποιείται η ο-τολουϊδίνη. Οι εξόζες δίνουν προϊόν που απορρόφα στα 630 nm και οι πεντόζες στα 480 nm.

8.3.2 Ενζυμικές μέθοδοι

Οι ενζυμικές αντιδράσεις έχουν το πλεονέκτημα της μεγάλης εξειδίκευσης με αποτέλεσμα να μπορούν να προσδιορίσουν συγκεκριμένο είδος μονοσακχαρίτη. Ο προσδιορισμός συγκεκριμένα της γλυκόζης μπορεί να γίνει με τη μέθοδο της εξοκινάσης και τη μέθοδο της οξειδάσης της γλυκόζης (Σχήμα 8.3). Η μέθοδος της οξειδάσης περιλαμβάνει την οξειδωση της D-γλυκόζης με χρήση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης. Το παραγόμενο H_2O_2 με τη δράση του ενζύμου υπεροξειδάση και παρουσία ο-διανισιδίνης δίνει έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 510 nm. Στην περίπτωση της εξοκινάσης, η γλυκόζη παρουσία αυτού του

ενζύμου και ATP μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκόζη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφογλυκόζης και NAD σε 6-φωσφο-γλυκουρονικό οξύ και NADH. Το ποσό του NADH είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της γλυκόζης και υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 340 nm.

Αντίστοιχες ενζυμικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον προσδιορισμό της γαλακτόζης και της φρουκτόζης οι οποίες είναι δυο εξόζες που συναντώνται συχνά σε πολυσακχαρίτες.



Σχήμα 8.3. Μέθοδοι ενζυμικού προσδιορισμού γλυκόζης

8.4 Μέθοδοι διαχωρισμού υδατανθράκων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μίγματος υδατανθράκων στα επιμέρους συστατικά του είναι παρόμοιοι με αυτές που αναπτύχθηκαν προηγουμένως και στις άλλες τάξεις των βιομορίων.

8.4.1. Διαχωρισμός βάσει της διαλυτότητας

Οι υδατάνθρακες μπορούν να διαχωριστούν αρχικά βάση της διαλυτότητας τους. Οι μονο- και oligo- σακχαρίτες διαλύονται σε αλκοολικά διαλύματα σε αντίθεση με τους πολυσακχαρίτες και τις διαιτητικές ίνες που είναι αδιάλυτες σε αυτά.

8.4.2. Χρωματογραφία

Τα μίγματα των υδατανθράκων μπορούν να διαχωριστούν με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

8.4.2.1 Χρωματογραφία χάρτου και TLC

Οι υδατάνθρακες μπορούν να διαχωριστούν τόσο με χρωματογραφία χάρτου όσο και με TLC χρησιμοποιώντας ως στατική φάση silica gel ή κυτταρίνη. Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται είναι μίγμα οργανικών διαλυτών ανάλογα με το είδος των υδατανθράκων που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σε στατική φάση silica gel και κινητή

φάση η n-βουτανόλη:οξικό οξύ:νερό 2:1:1 v/v/v μπορούν να διαχωριστούν οι μονο- από τους δι-σακχαρίτες, ενώ με κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα:αιθανόλη:πυριμιδίνη:οξικό οξύ:νερό 70:10:10:10:10 v/v/v/v/v μπορούν να διαχωριστούν οι εξόζες από τις πεντόζες. Η απόσταση που θα διανύσει ένας υδατάνθρακας εξαρτάται από τον αριθμό των μονοσακχαρικών μονάδων με τα μικρότερα μόρια να διανύουν μεγαλύτερη απόσταση. Οι πεντόζες δίνουν μικρότερες τιμές R_f από ότι οι εξόζες. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια τα οποία δίνουν χαρακτηριστικό χρώμα τα οποία μπορεί να έχουν εξειδίκευση για συγκεκριμένη κατηγορία υδατανθράκων.

8.4.2.2. Χρωματογραφία στήλης

Ιονανταλλαγής: Τη στατική φάση αποτελεί ρητίνη ιονανταλλαγής (βλέπε παράγραφο 4.4.2). Στην κατιοανταλλαγή συνήθως είναι ρητίνη με ελεύθερες καρβοξυλομάδες ή σουλφονυλομάδες ενώ στη ανιονταλλαγή ρητίνη με ελεύθερες ή υποκατεστημένες αμινο-ομάδες. Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διαφορετική δέσμευση των σακχάρων στις ομάδες της ρητίνης.

Μοριακής διήθησης: Η τεχνική αυτή χωρίζει τους υδατάνθρακες με βάση το μέγεθός τους (βλέπε παράγραφο 4.4.3). Η έκλουση των υδατανθράκων από τη στήλη γίνεται κατά σειρά μειούμενου μεγέθους. Με την τεχνική αυτή μπορούν να διαχωριστούν πολυσακχαρίτες που διαφέρουν στον αριθμό των μονοσακχαρικών υπομονάδων.

Χρωματογραφία συγγένειας: Η ύπαρξη ειδικών πρωτεϊνικών μορίων (λεκτίνες) που δεσμεύονται εκλεκτικά σε υδατάνθρακες κάνει δυνατό το διαχωρισμό των υδατανθράκων με χρωματογραφία συγγένειας (βλέπε παράγραφο 4.4.4). Συγκεκριμένα, οι λεκτίνες δεσμεύονται με ομοιοπολικό δεσμό σε αδρανές αδιάλυτο πολυμερές υλικό το οποίο αποτελεί τη στατική φάση της χρωματογραφίας. Οι υδατάνθρακες που αναγνωρίζουν τις συγκεκριμένες λεκτίνες δεσμεύονται στη στατική φάση και διαχωρίζονται από τους υπόλοιπους υδατάνθρακες. Η χρήση στη συνέχεια ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος οδηγεί στην αποδέσμευση και έκλουση τους.

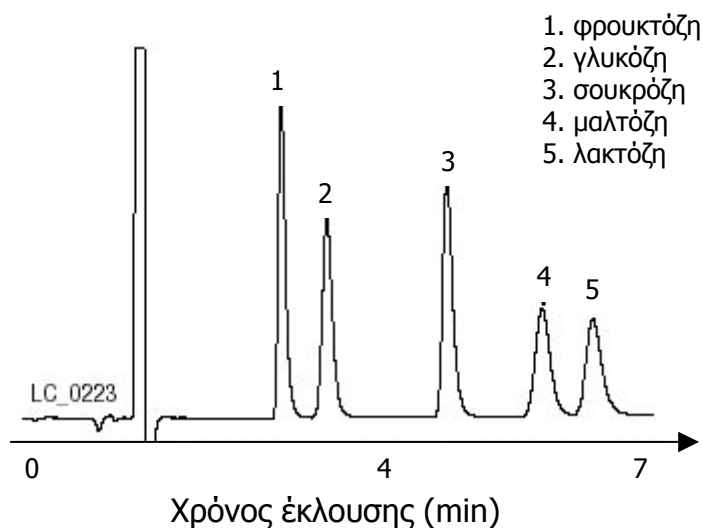
8.4.2.3. Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία είναι χρήσιμη μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων ειδικά όταν αυτοί βρίσκονται σε μικρές ποσότητες. Η τεχνική αυτή είναι δυνατό να διαχωρήσει υδατάνθρακες με πολύ όμοιες δομές. Οι υδατάνθρακες πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα, τα οποία συνήθως είναι τα μεθυλο- ή τα ακετυλο- ή τα τριμεθυλοσιλυλο- παράγωγα.

8.4.2.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η HPLC χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό των σακχάρων. Πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής έναντι της αέριας χρωματογραφίας είναι ότι οι υδατάνθρακες δε χρειάζεται να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα και ότι δεν είναι καταστρεπτική για το δείγμα. Ανάλογα με την επιλογή της στατικής φάσης ο διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί, είτε με βάση την κατανομή, είτε με βάση το φορτίο των υδατανθράκων. Στη χρωματογραφία

κατανομής χρησιμοποιείται συνήθως αντιστρόφου φάσης στατική φάση (άπολη) και ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται ακετονιτρίλιο:νερό σε διάφορες αναλογίες. Στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής χρησιμοποιούνται, είτε ανιονικές, είτε κατιονικές ρητίνες παρόμοιες με αυτές που αναφέρθηκαν στη χρωματογραφία στήλης.



Σχήμα 8.4 Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα HPLC σε στήλη με αμινομάδες και κινητή φάση ακετονιτρίλιο:νερό 75:25 v/v.

8.5. Χαρακτηρισμός υδατανθράκων

Ο χαρακτηρισμός της δομής των υδατανθράκων περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του αριθμού και της φύσης των μονοσχαριτών που περιέχει, τον αριθμό των πιθανών διακλαδώσεων καθώς και το είδος τόσο των γλυκοζιτικών όσο και των δεσμών των υποκαταστατών.

8.5.1. Πολωσιμετρία

Πολωσιμετρία ονομάζεται η μέτρηση του μεγέθους και της φοράς της στροφής του επίπεδα πολωμένου φωτός που προκαλείται από ένα διάλυμα ασύμμετρων μορίων. Τα περισσότερα σάκχαρα αποτελούν ασύμμετρα μόρια και επομένως μπορούν να στρέψουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός και επομένως να προσδιοριστούν με την τεχνική αυτή. Όταν το επίπεδο του πολωμένου φωτός περάσει μέσα από ένα διάλυμα ενός σακχάρου η γωνία κατά την οποία θα στραφεί εξαρτάται από τη φύση της ένωσης και είναι ανάλογη του αριθμού των ασύμμετρων μορίων της. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για το χαρακτηρισμό μονο- ή δι- σακχαριτών.

8.5.2. Προσδιορισμός του τελικού σακχάρου

Ο προσδιορισμός της δομής των σακχάρων απαιτεί τον προσδιορισμό του τελικού σακχάρου που είναι το ανάγον σάκχαρο. Ο πιο απλός τρόπος για τον προσδιορισμό του είναι η αναγωγή του σακχάρου με NaBH_4 ακολουθούμενη από την ολική υδρόλυση του

πολυσακχαρίτη. Μόνο το ανάγων σάκχαρο μετατρέπεται στην αντίστοιχη αλκοόλη που μπορεί μετά να προσδιοριστεί με αέρια χρωματογραφία ή χρωματογραφία χάρτου.

8.5.3. Προσδιορισμός της θέσης του γλυκοζιτικού δεσμού

Στην περίπτωση των γραμμικών πολυσακχαριτών (π.χ. αμυλόζη) η θέση του γλυκοζιτικού δεσμού μπορεί να προσδιοριστεί με κατεργασία τους με μεθυλοϊωδίδιο (CH_3I) σε αλκαλικό περιβάλλον. Σε αυτές τις συνθήκες τα ελεύθερα υδροξύλια μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον. Η μετέπειτα υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί σε μονοσακχαρίτες όπου στη θέση των αρχικών γλυκοζιτικών δεσμών έχουν ελεύθερα υδροξύλια. Στη συνέχεια με χρωματογραφικές τεχνικές ταυτοποιούνται τα μεθυλιωμένα σάκχαρα.

8.5.4. Οξείδωση με υπερϊωδικό οξύ

Η οξείδωση με υπερϊωδικό οξύ είναι χρήσιμη στη μελέτη δομής των υδατανθράκων. Το υπερϊωδικό οξύ διασπά εκλεκτικά το δεσμό μεταξύ γειτονικών ατόμων άνθρακα που έχουν ελεύθερα γειτονικά υδροξύλια, καρβονύλια ή αμίνες ή συνδυασμός αυτών. Επιπλέον, οξειδώνει τους άνθρακες στους οποίους διασπά το δεσμό τους. Έτσι, από τον άνθρακα της αλκοόλης προκύπτει αλδεΐδη ενώ από τον άνθρακα της αλδεΐδης προκύπτει οξύ. Τα προϊόντα διάσπασης που προκύπτουν μπορεί να αντιδράσουν με διάφορες ενώσεις και να δώσουν έγχρωμα προϊόντα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων μπορεί να γίνει με φωτομέτρηση των εγχρώμων προϊόντων ή με μέτρηση του καταναλωθέντος υπερϊωδικού οξέος. Αντίθετα, εάν ένα από τα γειτονικά άτομα άνθρακα είναι δεσμευμένα με δεσμό ακετάλης ή αιθέρα δεν πραγματοποιείται οξείδωση ή διάσπαση των γειτονικών ατόμων άνθρακα. Η ανάλυση επομένως των προϊόντων δίνει πληροφορίες για τον αριθμό και τη θέση των δομών που είναι ευαίσθητες στην οξείδωση.

8.5.5. Αντίδραση με ιώδιο

Μερικοί ομοπολυσακχαρίτες σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με τη προσθήκη ιωδίου, τα οποία οφείλονται στον εγκλεισμό του ιωδίου στην έλικα του μορίου. Η προσθήκη επομένως ιωδίου μπορεί να δώσει ποιοτικά αποτελέσματα όσο αφορά την ύπαρξη χαρακτηριστικών ομοπολυσακχαριτών αφού το άμυλο δίνει μπλε χρώμα, το γλυκογόνο και οι δεξτρίνες δίνουν κόκκινο χρώμα και η κυτταρίνη δε δίνει καθόλου χρώμα.

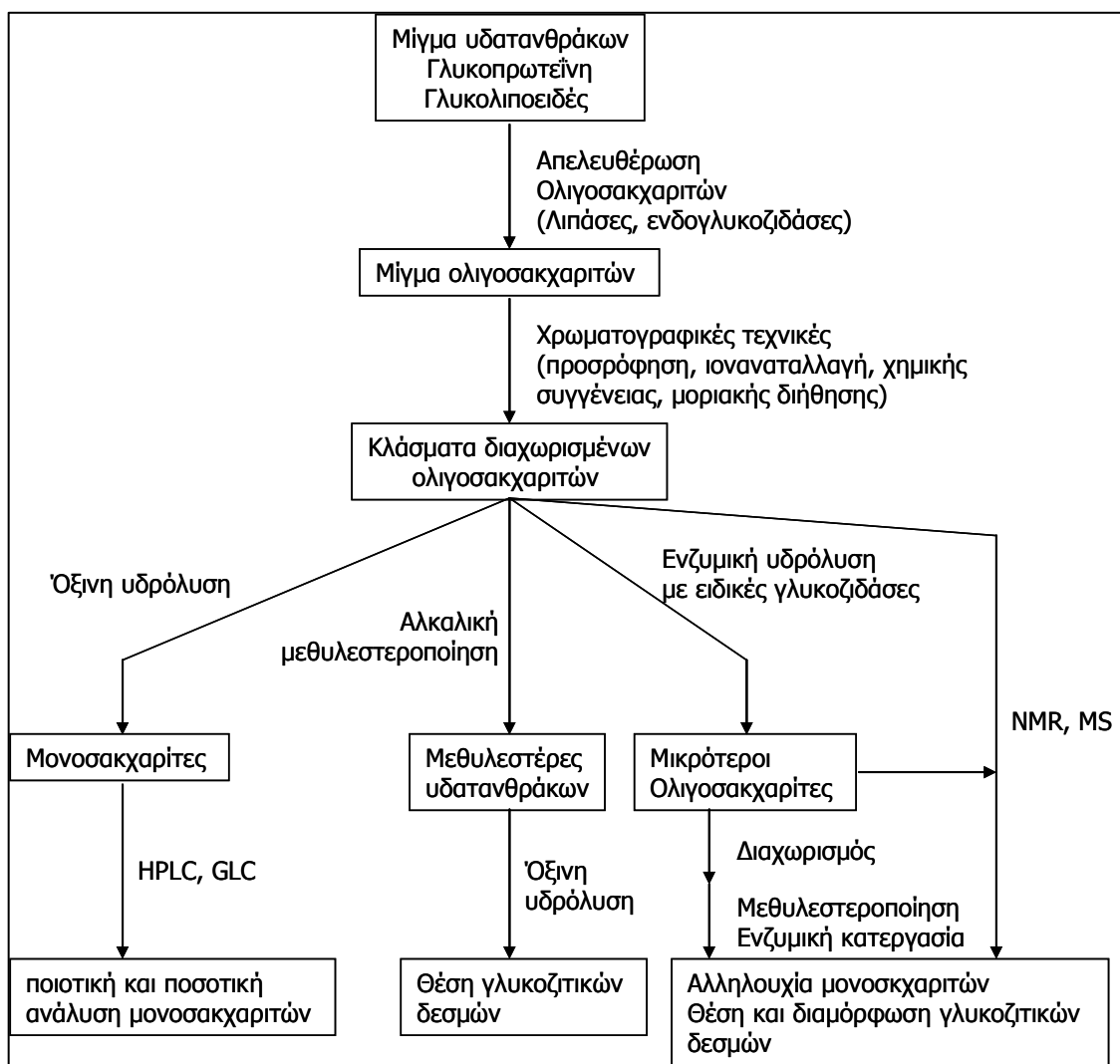
8.5.6. Προσδιορισμός του είδους του γλυκοζιτικού δεσμού και της αλληλουχίας των σακχάρων

Η χρήση ενζύμων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της δομής των υδατανθράκων. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία υδrolυτικών ενζύμων που διασπούν γλυκοζιτικούς δεσμούς (γλυκοζιδάσες). Η επιλογή γίνεται έχοντας υπόψη τη φύση του γλυκοζιτικού δεσμού που πιθανόν υπάρχει στο προς εξέταση δείγμα. Συγκεκριμένα υπάρχουν ένζυμα που υδrolύουν εκλεκτικά α ή β γλυκοζιτικούς δεσμούς ή ακόμα και δεσμούς μεταξύ συγκεκριμένων θέσεων π.χ. α(1->4). Η ανάλυση στη συνέχεια των προϊόντων που παράγονται από την ενζυμική διεργασία μας δίνει πληροφορίες για τη δομή του υδατάνθρακα.

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των μονοσακχαριτών καθώς και των διακλαδώσεων χρησιμοποιούνται εξωγλυκοζιδάσες γνωστής εξειδίκευσης οι οποίες αφαιρούν ένα προς ένα τους μονοσακχαρίτες από το μη ανάγον άκρο του ολιγοσακχαρίτη. Η εξειδίκευση των ενζύμων συχνά οδηγεί στην ταυτοποίηση της στεreoχημείας και των διακλαδώσεων. Πολυσακχαρίτες ή μεγάλοι ολιγοσακχαρίτες κατεργάζονται αρχικά με χημικό τρόπο ή με ενδογλυκοζιδάσες ώστε να παραχθούν μικρότεροι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι μπορούν να αναλυθούν πιο εύκολα.

8.5.7. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Χρήσιμα εργαλεία της ανάλυσης των υδατανθράκων είναι η φασματοσκοπία μάζας (MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (NMR). Με το MS μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος όλης της αλυσίδας του υδατάνθρακα. Η δημιουργία θραυσμάτων, που συνήθως οφείλεται σε σπάσιμο των γλυκοζυτικών δεσμών, οδηγεί ύστερα από κατάλληλο συνδυασμό των μαζών τους στην εύρεση της αλληλουχίας των μονάδων στον υδατάνθρακα. Η ανάλυση με NMR μπορεί να δώσει πληροφορίες για την αλληλουχία, την θέση των διακλαδώσεων και τον ανωμερικό άνθρακα.



Σχήμα 8.5. Συνοπτική περιγραφή της ανάλυσης των υδατανθράκων

ΜΕΡΟΣ Γ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

Εργαστηριακές ασκήσεις φασματοφωτομετρίας

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 1

Εκμάθηση λειτουργίας φασματοφωτομέτρου και λήψη φάσματος απορρόφησης διαλύματος π-νιτροφαινόλης

Σκοπός

Σκοπός της πρώτης εργαστηριακής άσκησης είναι η εκμάθηση της λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου και η λήψη του φάσματος απορρόφησης διαλυμάτων π-νιτροφαινόλης διαφορετικής συγκέντρωσης. Από τα ληφθέντα φάσματα υπολογίζεται το μέγιστο μήκος κύματος $\lambda_{\max}$ και η αντίστοιχη μοριακή απορροφητικότητα $\epsilon_{\max}$ της π-νιτροφαινόλης σε αλκαλικό διάλυμα.

Αρχή μεθόδου

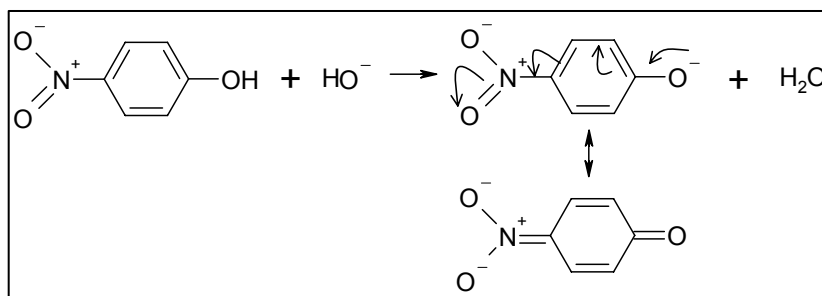
Εκμάθηση λειτουργίας φασματοφωτομέτρου

Το φασματοφωτόμετρο Novaspec II (Σχήμα 2), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τις εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας Ι και ΙΙ είναι ένα ψηφιακό, φορητό φασματοφωτόμετρο ορατού. Μπορεί να μετρήσει τόσο απορρόφηση, όσο και διαπερατότητα και δέχεται πλαστικές ή γυάλινες κυψελίδες διατομής 1 cm.

Λήψη φασμάτων απορρόφησης διαλυμάτων π-νιτροφαινόλης

Κάθε έγχρωμη ένωση, ανάλογα με τη φύση της, δίνει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο ορατό. Από το φάσμα αυτό προσδιορίζεται το $\lambda_{\max}$ και το $\epsilon_{\max}$ βάση του οποίου μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών ομάδων αλλά όχι ολόκληρου του μορίου.

Για την εκμάθηση της φασματοφωτομετρίας, στο πλαίσιο του εργαστηρίου, έχει επιλεγεί σαν απορροφούσα ουσία η π-νιτροφαινόλη, η οποία είναι μια αρωματική ένωση. Σε αλκαλικό περιβάλλον δίνει ανιόν το οποίο σταθεροποιείται μέσω συντονισμού και απορροφά ισχυρά στην περιοχή των 400 nm (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Δομές συντονισμού του ανιόντος της π-νιτροφαινόλης σε αλκαλικό περιβάλλον.

Υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες μεγάλοι (3), δοκιμαστικοί σωλήνες μικροί (1), σιφώνια (2), πλαστικές κυψελίδες διατομής 1 cm (4), ποτήρι ζέσεως
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φασματοφωτόμετρο

Αντιδραστήρια

- Καυστικό νάτριο
- π-νιτροφαινόλη

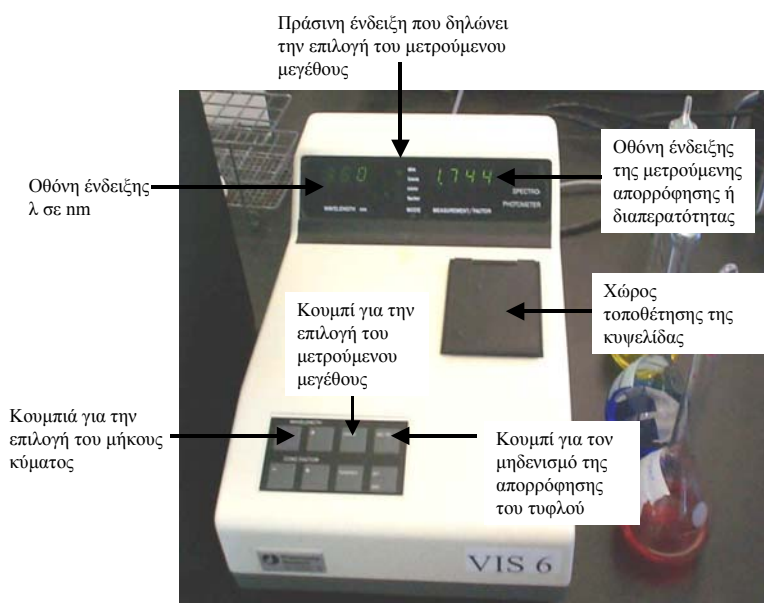
Διαλύματα

1. Διάλυμα NaOH 0,02 N : Διαλύονται 0,8 g NaOH σε 1000 mL απιονισμένο νερό
2. Διαλύματα π-νιτροφαινόλης 120 μM: 0,00167 g π-νιτροφαινόλης διαλύονται σε 100 mL διαλύματος NaOH 0,02 N.

Πορεία

Εκμάθηση λειτουργίας φασματοφωτομέτρου

1. Άνοιγμα του φασματοφωτομέτρου (Σχήμα 2) από το διακόπτη στο πίσω μέρος του οργάνου και παραμονή για 1-3 λεπτά ώστε τα ηλεκτρονικά του μέρη να σταθεροποιήσουν τη λειτουργία τους
2. Εάν επιθυμείται η μέτρηση της απορρόφησης ρυθμίζεται το όργανο από το κουμπί «mode» ώστε να ανάβει η πράσινη ένδειξη δίπλα στο Abs
3. Ρυθμίζεται το επιθυμητό μήκος κύματος με τα κουμπιά « + » « - »
4. Στις κυψελίδες προστίθεται το τυφλό διάλυμα ή τα διαλύματα των προς μέτρηση δειγμάτων. Η κυψελίδα γεμίζεται κατά τα 2/3 με προσοχή έτσι ώστε να μην πέσουν υγρά στη θέση τοποθέτησης της κυψελίδας. Η τοποθέτηση της κυψελίδας στην ειδική θέση γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η ακτινοβολία να διέρχεται από τις λείες επιφάνειες
5. Τοποθετείται η κυψελίδα του τυφλού στη θέση του οργάνου και με το κουμπί « set ref » μηδενίζεται η απορρόφηση του
6. Τοποθετείται η κυψελίδα του δείγματος και σημειώνεται η απορρόφηση
7. Εάν επιθυμείται η μέτρηση της διαπερατότητας ρυθμίζεται το όργανο από το κουμπί «mode» ώστε να ανάβει η πράσινη ένδειξη δίπλα στο trans και επαναλαμβάνονται τα βήματα 3, 4 και 5



Σχήμα 2. Το φασματοφωτόμετρο Novaspec II

Λήψη φασμάτων απορρόφησης διαλυμάτων π-νιτροφαινόλης

1. Σε 3 μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται τα διαλύματα π-νιτροφαινόλης (p-NP) συγκέντρωσης 20, 40 και 60 μM σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Σ_1 (20 μM p-NP)	Σ_2 (40 μM p-NP)	Σ_3 (60 μM p-NP)
p-NP (120 μM)	1 mL	2 mL	3 mL
NaOH (0,02 N)	5 mL	4 mL	3 mL

2. Αναδεύονται τα διαλύματα σε vortex
3. Ανοίγεται το φωτόμετρο από το διακόπτη στο πίσω μέρος του οργάνου και παραμένει σε αναμονή για 1-3 λεπτά
4. Ρυθμίζεται το όργανο ώστε να δείχνει την απορρόφηση
5. Ρυθμίζεται το μήκος κύματος στα 340 nm
6. Τοποθετούνται σε κυψελίδες το διάλυμα NaOH 0,02N (τυφλό) και το διάλυμα Σ_1
7. Τοποθετείται η κυψελίδα με το διάλυμα NaOH 0,02 N στο φασματοφωτόμετρο και μηδενίζεται η απορρόφηση. Τοποθετείται στη συνέχεια η κυψελίδα με το Σ_1 στο φωτόμετρο και σημειώνεται η απορρόφηση.
8. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία των βημάτων 6 και 7 στα 360, 380, 400, 420, 440 και 460 nm
9. Στην περιοχή του μήκους κύματος που παρατηρήθηκε η μέγιστη απορρόφηση ($\lambda_{\text{max}} \pm 20$ nm) από την παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνονται τα στάδια 6 και 7 ανά 5 nm
10. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία των βημάτων 6 έως 9 στα με τα διαλύματα Σ_2 και Σ_3

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Παραθέστε σε πίνακα τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων για όλες τις συγκεντρώσεις της π-νιτροφαινόλης
2. Κατασκευάστε το διάγραμμα $A=f(\lambda)$ για όλες τις συγκεντρώσεις π-νιτροφαινόλης
3. Υπολογίστε τις τιμές T από τις τιμές A με βάση τον τύπο $A=2-\log (\%T)$ και παραθέστε αυτές σε πίνακα
4. Κατασκευάστε το διάγραμμα $T=f(\lambda)$ για όλες τις συγκεντρώσεις π-νιτροφαινόλης
5. Με βάση το διάγραμμα $A=f(\lambda)$ δηλώστε το $\lambda_{\max}$ της π-νιτροφαινόλης για όλες τις συγκεντρώσεις αυτής
6. Υπολογίστε το $\epsilon_{\max}$ της π-νιτροφαινόλης από τον τύπο $A=\epsilon bC$ για όλες τις συγκεντρώσεις της
7. Συγκρίνετε τις τιμές $\lambda_{\max}$ και $\epsilon_{\max}$ που υπολογίστηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις π-νιτροφαινόλης. Σχολιάστε

Ερωτήσεις - Ασκήσεις

1. Γιατί απαιτείται ο μηδενισμός με το τυφλό σε κάθε μήκος κύματος;
2. Υπολογίστε τη συγκέντρωση ενός διαλύματος π-νιτροφαινόλης που έχει $A=0,532$ στα 400 nm
3. Με βάση το $\epsilon_{\max}$ της π-νιτροφαινόλης που βρήκατε μπορείτε να υπολογίσετε της συγκέντρωση ενός υδατικού διαλύματος π-νιτροφαινόλης που έδωσε απορρόφηση $A=0,242$;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 2

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος π-νιτροφαινόλης

Σκοπός

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης άγνωστου διαλύματος π-νιτροφαινόλης με τη βοήθεια της φασματοφωτομετρίας ορατού και με χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Αρχή μεθόδου

Σύμφωνα με το νόμο των Lambert-Beer ($A=εbC$) όταν μονοχρωματική ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα διάλυμα η απορρόφηση της ακτινοβολίας από αυτό είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του. Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς $A=f(C)$ με χρήση πρότυπων διαλυμάτων π-νιτροφαινόλης επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης άγνωστου διαλύματος π-νιτροφαινόλης με βάση την τιμή της απορρόφησης του (βλέπε παράγραφο 1.7.2).

Υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες μικροί (3), δοκιμαστικοί σωλήνες μεγάλοι (8), μικρό ποτήρι ζέσεως (1), σιφώνια (4), πλαστικές κυψελίδες διατομής 1 cm (7)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φασματοφωτόμετρο

Αντιδραστήρια

- Καυστικό νάτριο
- π-νιτροφαινόλη

Διαλύματα

1. Διάλυμα NaOH 0,02 N : Διαλύονται 0,8 g NaOH σε 1000 mL απιονισμένο νερό
2. Διαλύματα π-νιτροφαινόλης 120 μM: 0,00167 g π-νιτροφαινόλης διαλύονται σε 100 mL διαλύματος NaOH 0,02 N
3. Δύο πυκνά διαλύματα π-νιτροφαινόλης άγνωστης συγκέντρωσης

Πορεία

1. Σε 4 μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα π-νιτροφαινόλης (p-NP) συγκέντρωσης 10, 30, 50 και 60 μM σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

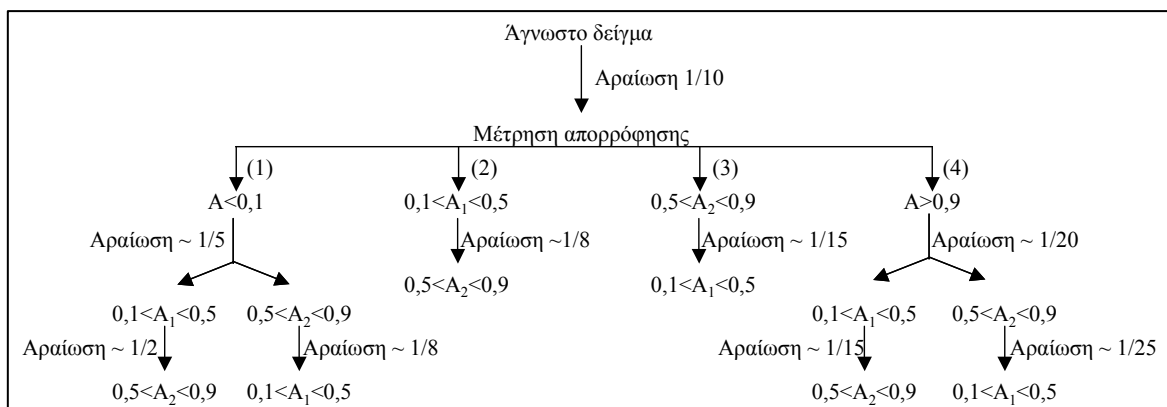
	Σ_1 (10 μM p-NP)	Σ_2 (30 μM p-NP)	Σ_3 (50 μM p-NP)	Σ_4 (60 μM p-NP)
p-NP (120 μM)	0,5 mL	1,5 mL	2,5 mL	3 mL
NaOH (0,02N)	5,5 mL	4,5 mL	3,5 mL	3 mL

2. Πραγματοποιείται αραιώση 1/10 των άγνωστων διαλυμάτων. Δηλαδή σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 1 mL του εκάστοτε άγνωστου διαλύματος και 9 mL διαλύματος NaOH 0,02 N
3. Αναδεύονται τα διαλύματα σε vortex
4. Ανοίγεται το φασματοφωτόμετρο και ρυθμίζεται έτσι ώστε να δείχνει απορρόφηση (βλέπε εργαστηριακή άσκηση 1)
5. Ρυθμίζεται το μήκος κύματος στα 400 nm
6. Τοποθετούνται σε κυψελίδες το διάλυμα NaOH 0,02 N (τυφλό) και τα πρότυπα διαλύματα Σ_1 , Σ_2 , Σ_3 και Σ_4 καθώς και τα άγνωστα δείγματα
7. Τοποθετείται η κυψελίδα με το διάλυμα NaOH 0,02 N στο φασματοφωτόμετρο και μηδενίζεται η απορρόφηση
8. Τοποθετούνται διαδοχικά οι κυψελίδες των διαλυμάτων Σ_1 , Σ_2 , Σ_3 , Σ_4 και των αραιωμένων (1/10) αγνώστων διαλυμάτων στο φασματοφωτόμετρο και σημειώνεται η απορρόφηση
9. Ανάλογα με την απορρόφηση που δείχνουν τα αραιωμένα (1/10) άγνωστα διαλύματα πραγματοποιούνται διαδοχικά κατάλληλες αραιώσεις έτσι ώστε η μία αραιώση να δίνει απορρόφηση στην περιοχή από 0,1-0,5 και η άλλη αραιώση στην περιοχή 0,5-0,9 (Σχήμα 2)

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Παρατίθενται σε πίνακα τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων για όλες τις συγκεντρώσεις π-νιτροφαινόλης
2. Κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς $A=f(C)$ όπου C οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων της π-νιτροφαινόλης και A οι αντίστοιχες απορροφήσεις τους
3. Παρατίθενται σε πίνακα οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στα άγνωστα διαλύματα με τις αντίστοιχες τιμές απορροφήσεων που λήφθηκαν
4. Από τις τιμές των απορροφήσεων υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των αραιωμένων διαλυμάτων με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς
5. Με βάση το νόμο της αραιώσης $C_{\text{αρχ}} V_{\text{αρχ}} = C_{\text{τελ}} V_{\text{τελ}}$ υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των αρχικών πυκνών διαλυμάτων
6. Για κάθε άγνωστο διάλυμα υπολογίζεται η % απόκλιση των συγκεντρώσεων του πυκνού διαλύματος με τον τύπο

$$\% a = (C_{\text{μεγαλύτερη}} - C_{\text{μικρότερη}}) / C_{\text{μεγαλύτερη}}$$
7. Για κάθε άγνωστο διάλυμα υπολογίζεται ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων του πυκνού διαλύματος
8. Υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων διαλυμάτων με βάση την τιμή ϵ_{max} της π-νιτροφαινόλης που βρέθηκε στην εργαστηριακή άσκηση 1. Συγκρίνετε τις τιμές αυτές με αυτές που υπολογίσατε από την πρότυπη καμπύλη. Σχολιάστε



Σχήμα 1. Διάγραμμα ενδεικτικών αραιώσεων πυκνού διαλύματος π-νιτροφαινόλης με σκοπό να επιτευχθούν δυο τιμές απορροφήσεων $0,1 < A_1 < 0,5$ και $0,5 < A_2 < 0,9$.

Ερωτήσεις – Ασκήσεις

1. Γιατί επιλέχθηκε το μήκος κύματος 400 nm για τον ποσοτικό προσδιορισμό της π-νιτροφαινόλης;
2. Τι σφάλμα θα προκύψει εάν αντί για διάλυμα NaOH 0,02 N χρησιμοποιηθεί νερό για την αραιώση του αγνώστου διαλύματος;

Εργαστηριακές ασκήσεις πρωτεϊνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 3

Απομόνωση μυοσίνης από μυς μοσχαριού

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργαστηριακής άσκησης είναι, αφενός η εκχύλιση μυοσίνης από μυς μοσχαριού (κιμάς μοσχαρίσιος), αφετέρου ένας αρχικός καθαρισμός της, από τις άλλες πρωτεΐνες του μυ, βάση της διαλυτότητας της.

Αρχή μεθόδου

Η μυοσίνη είναι μια σφαιρίνη, ευδιάλυτη σε αραιά διαλύματα ουδέτερων αλάτων αλλά δυσδιάλυτη στο νερό. Το φαινόμενο της αύξησης της διαλυτότητας μίας πρωτεΐνης σε αραιά διαλύματα αλάτων ονομάζεται εναλάτωση (salting in) και οφείλεται στην παρεμπόδιση των ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων από τα ιόντα των αλάτων. Βάση αυτών η μυοσίνη εκχυλίζεται από σκελετικούς μυς μοσχαριού με αραιό διάλυμα χλωριούχου καλίου με τη βοήθεια ομογενοποιητή και στη συνέχεια καθιζάνει από το εκχύλισμα με μείωση της συγκέντρωσης του χλωριούχου καλίου στο διάλυμα (και άρα μείωση της ιονικής ισχύος του) προσθέτοντας απεσταγμένο νερό. Με αυτό το τρόπο διαχωρίζεται από άλλες πρωτεΐνες που είναι ευδιάλυτες σε αραιά διαλύματα αλάτων.

Υλικά

- Μεγάλο ποτήρι ζέσεως, ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, χωνί, πλαστικός σωλήνας των 15 mL, πλαστικοί σωλήνες των 50 mL (2), διηθητικό χαρτί, γυάλινη ράβδος
- Φυγόκεντρος
- Ομογενοποιητής
- Αναλυτικός ζυγός

Αντιδραστήρια

- Μοσχαρίσιος κιμάς καλά αλεσμένος με όσο το δυνατόν λιγότερο λίπος
- Χλωριούχο κάλιο

Διαλύματα

- Διάλυμα KCl 0,5 M: Διαλύονται 37,275 g KCl σε 1 L απεσταγμένο νερό

Πορεία

1. Ζυγίζονται 3 g μοσχαρίσιου κιμά σε πλαστικό σωλήνα των 50 mL
2. Στο σωλήνα προστίθενται 10 mL διαλύματος KCl 0,5 M
3. Το μίγμα ομογενοποιείται αρχικά με γυάλινη ράβδο και στη συνέχεια με τη βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή

4. Το εναιώρημα που προκύπτει διηθείται από πτυχωτό ηθμό για να απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια ιστού. Το διήθημα συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως
5. Στο διαυγές διήθημα προστίθενται 80 mL παγωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αφήνεται στο ψυκτικό θάλαμο για 1 h ώστε να καταβυθιστεί η μυοσίνη
6. Κατά τη διάρκεια της παραμονής του διαλύματος μυοσίνης στο ψυκτικό θάλαμο, προζυγίζονται δύο πλαστικοί σωλήνες των 50 mL
7. Μετά από 1 h το ίζημα που έχει καταβυθιστεί αναδιασπείρεται προσεκτικά στο ποτήρι και μοιράζεται σε δύο πλαστικούς σωλήνες των 50 mL. Οι δύο σωλήνες πρέπει να έχουν ακριβώς τον ίδιο όγκο εναιωρήματος
8. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 min. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο απορρίπτεται και οι σωλήνες ζυγίζονται ξανά
9. Το ίζημα του κάθε σωλήνα αναδιαλύεται σε 5 mL KCl 0,5 M
10. Το περιεχόμενο των δύο σωλήνων ενώνεται σε ένα σωλήνα. Το διάλυμα αυτό αποτελεί και το τελικό διάλυμα μυοσίνης που προέκυψε από την εκχύλιση του κιμά και έχει θεωρητικά καθαρότητα ~ 80-90%

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Σχολιάστε την αναγκαιότητα κάθε σταδίου κατά την απομόνωση μυοσίνης από μυς μοσχαριού
2. Υπολογίστε την ποσότητα του ιζήματος που προέκυψε καθώς και τη συγκέντρωση του στο τελικό διάλυμα μυοσίνης

Ερωτήσεις – Ασκήσεις

1. Τι αποτέλεσμα θα είχε η προσθήκη διαλύματος KCl 5 M αντί για απεσταγμένο νερό στο στάδιο 5 της πορείας απομόνωσης της μυοσίνης ;
2. Υπολογίστε τα rcf στα οποία πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντρωση. Η ακτίνα της κεφαλής είναι $r=10$ cm

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 4

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργαστηριακής άσκησης είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης σε ένα άγνωστο διάλυμα με τη μέθοδο Lowry. Ως άγνωστο διάλυμα θα χρησιμοποιηθεί το διάλυμα μυοσίνης που έχει παρασκευαστεί στην άσκηση 3

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Lowry εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης και συνδυάζει τις αρχές δύο άλλων μεθόδων, της μεθόδου διουρίας και της αντίδραση των αρωματικών αμινοξέων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Αρχικά, στο διάλυμα της πρωτεΐνης προστίθεται αλκαλικό διάλυμα Cu^{2+} , το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών δίνοντας ελαφρύ ιώδες χρώμα (βλέπε παραγράφους 6.3.2, 6.3.3). Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, οπότε προκαλείται ελεγχόμενη αναγωγή των μολυβδαινικών και βολφραμικών ιόντων, που περιέχονται σε αυτό με σύγχρονη ανάπτυξη του χρώματος που τελικά φωτομετρείται. Η αναγωγή των ιόντων γίνεται από το σύμπλοκο Cu^{2+} και αρωματικών αμινοξέων, που περιέχονται στις πρωτεΐνες. Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι γνωστός, αλλά θεωρείται ότι σχηματίζεται ένα οξειδωμένο έγχρωμο σύμπλοκο χαλκού, με απροσδιόριστο αριθμό οξείδωσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιώντας αλβουμίνη βόειου ορού ως πρότυπο. Η μέθοδος Lowry είναι ευαίσθητη και μπορεί να προσδιορίσει συγκεντρώσεις πρωτεΐνης από 10 έως 60 $\mu\text{g/mL}$.

Υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες μικροί (10), ρύγχι για τις αυτόματες πιπέτες, μικρό ποτήρι ζέσεως, κυψελίδες φωτομέτρου (4)
- Φασματοφωτόμετρο
- Κυκλοαναδευτήρας
- Αυτόματες πιπέτες

Αντιδραστήρια

- Αλβουμίνη βοείου ορού (bovine serum albumin, BSA)
- Ανθρακικό νάτριο
- Καυστικό νάτριο
- Ένυδρος θειικός χαλκός
- Τρυγικό καλιονάτριο

Διαλύματα

- Διάλυμα BSA 1 mg/mL: Διαλύονται 50 mg BSA σε 50 mL απιονισμένο νερό
- Άγνωστο διάλυμα μυοσίνης (βλέπε εργαστηριακή άσκηση 3)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu 1 N: Λαμβάνεται έτοιμο από το εμπόριο
- NaOH 0,1 N: Διαλύονται 4 g NaOH σε 1 L απιονισμένο νερό
- 2% κ.β. Na_2CO_3 σε 0,1 N NaOH (Διάλυμα Α): Διαλύονται 20 g Na_2CO_3 σε 1 L NaOH 0,1 N
- Τρυγικό καλιονάτριο 1% κ.β.: Διαλύεται ένα 1 g τρυγικό καλιονάτριο σε 100 mL απιονισμένο νερό
- 0,5% κ.β. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1% κ.β. τρυγικό καλιονάτριο (Διάλυμα Β): Διαλύονται 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 100 mL διαλύματος τρυγικού καλιονατρίου 1% κ.β. Το τρυγικό καλιονάτριο εμποδίζει το χαλκό να καταβυθιστεί σαν ίζημα $\text{Cu}(\text{OH})_2$ με το αλκαλικό διάλυμα Na_2CO_3
- Διάλυμα Γ: Διάλυμα Α + Διάλυμα Β σε αναλογία 50:1, v/v

Πορεία

1. Το διάλυμα μυοσίνης βγαίνει από το ψυγείο έτσι ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται ισχυρά έτσι ώστε να γίνει ομοιογενές.
2. Αριθμούνται 7 μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες, Τ (για τυφλό), Σ1-Σ4 (για τα πρότυπα διαλύματα) και Δ1-Δ2 για τα άγνωστα διαλύματα
3. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα.

	Τυφλό	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	Δ1	Δ2
H_2O (μL)	600	550	500	450	400	400	200
BSA (1mg/mL) (μL)	-	50	100	150	200	-	-
Άγνωστο διάλυμα μυοσίνης (μL)	-	-	-	-	-	50	100
Διάλυμα Γ (μL)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Παραμονή 10 min σε $\Theta_{\text{δωμ.}}$							
Folin-Ciocalteu (μL)	300	300	300	300	300	300	300
Παραμονή 30 min σε $\Theta_{\text{δωμ.}}$							
Φωτομέτρηση στα 750 nm							

4. Τα διαλύματα φωτομετρούνται στα 750 nm μηδενίζοντας με το τυφλό διάλυμα. Καταγράφονται οι απορροφήσεις στο τετράδιο.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Κατασκευάστε πίνακα με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που βάλατε σε κάθε σωλήνα και εξηγήστε την αναγκαιότητα κάθε σταδίου
2. Υπολογίστε τη ποσότητα BSA (σε μg) που περιείχε κάθε πρότυπο διάλυμα
3. Από τις τιμές των απορροφήσεων των προτύπων διαλυμάτων και τις αντίστοιχες ποσότητες της BSA κατασκευάστε καμπύλη αναφοράς $A=f(\mu\text{g BSA})$
4. Από τη καμπύλη αναφοράς υπολογίστε τη τιμή πρωτεΐνης (σε μg) που περιείχαν οι σωλήνες Δ1 και Δ2
5. Υπολογίστε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο αρχικό διάλυμα της μυοσίνης
6. Υπολογίστε τη περιεκτικότητα της πρωτεΐνης στο αρχικό ίζημα της πρωτεΐνης που προέκυψε στην άσκηση 3

Ερωτήσεις – Ασκήσεις

1. Τι σφάλμα θα προκύψει στο προσδιορισμό της πρωτεΐνης αν δεν είχε προστεθεί τρυγικό καλιονάτριο στο διάλυμα του θειϊκού χαλκού;
2. Αν προσδιορίζατε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του άγνωστου διαλύματος σας χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα ένα διάλυμα λυσοζύμης $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, η συγκέντρωση αυτή θα ήταν η ίδια ή διαφορετική με αυτή που προσδιορίσατε στο πείραμα σας; Γιατί;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 5

Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις

Σκοπός

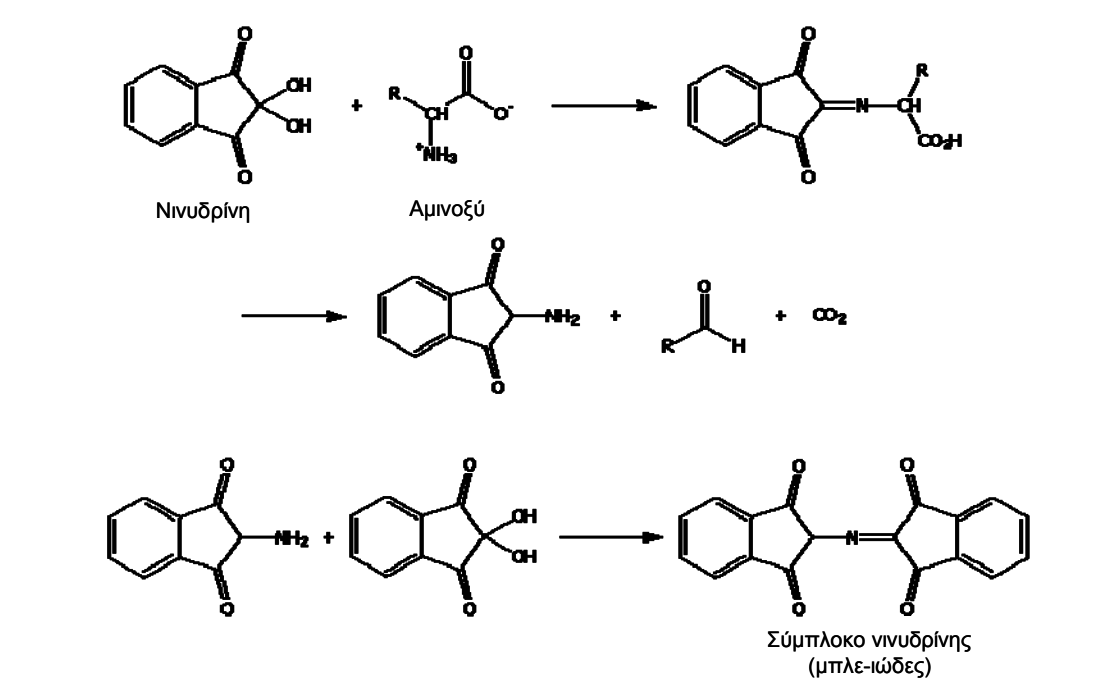
Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι να αποδειχτεί, με χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις των πρωτεϊνών, ότι α) το διάλυμα μυοσίνης που παρασκευάστηκε στην εργαστηριακή άσκηση 3 περιέχει όντως πρωτεΐνη και β) να προσδιοριστούν κάποια δομικά χαρακτηριστικά της μυοσίνης. Για την καλύτερη εξαγωγή συμπερασμάτων, οι ίδιες αντιδράσεις θα διεξαχθούν και σε πρότυπα διαλύματα άλλων πρωτεϊνών, αμινοξέων και υδατανθράκων και τα αποτελέσματα θα συγκριθούν μεταξύ τους.

Αρχή μεθόδου

Οι χημικές αντιδράσεις που θα διεξαχθούν σε αυτή την άσκηση είναι η αντίδραση νινυδρίνης, η αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης και η αντίδραση σουλφυδρυλομάδων με το αντιδραστήριο Ellman.

Αντίδραση νινυδρίνης

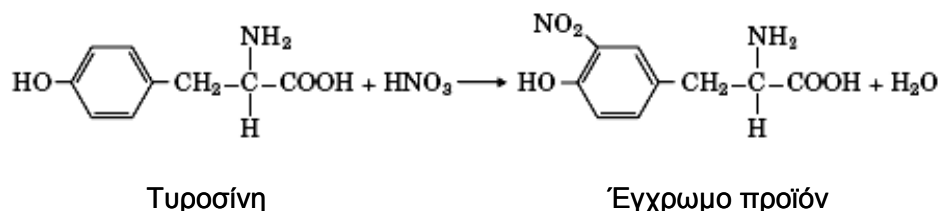
Η νινυδρίνη μπορεί να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων και των πρωτεϊνών και να προκύψει ένα σύμπλοκο με έντονο μπλε-ιώδες χρώμα.



Σχήμα 1. Αντίδραση νινυδρίνης με ελεύθερες $-NH_2$ αμινοξέων και πρωτεϊνών

Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης

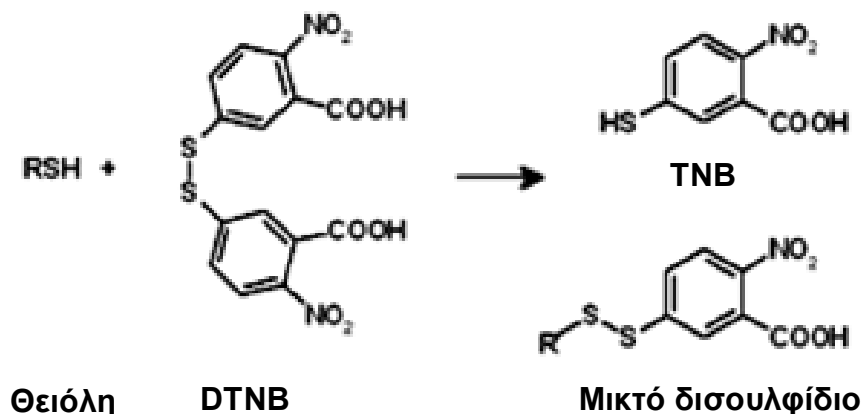
Η αντίδραση αυτή είναι χαρακτηριστική πρωτεϊνών που διαθέτουν φαινολικούς δακτυλίους. Το πυκνό νιτρικό οξύ αντιδρά με τους φαινολικούς δακτυλίους δίνοντας μία αρωματική νιτροένωση με χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Αύξηση του pH σε αυτό το σημείο θα αυξήσει την ένταση του χρώματος προς το πορτοκαλί.



Σχήμα 2. Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης

Αντίδραση ελεύθερων θειοαλκοολικών ομάδων (-SH) με το αντιδραστήριο Ellman

Το 5-5'-διθειο-δις(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB ή αντιδραστήριο Ellman) ένα δισουλφίδιο, το οποίο αντιδρά με τις ελεύθερες θειοαλκοολικές ομάδες των καταλοίπων κυστεΐνης των πρωτεϊνών. Από την αντίδραση προκύπτει ένα μικτό δισουλφίδιο της πρωτεΐνης καθώς και το θειονιτροβενζοϊκό ανιόν (TNB). Το DTNB απορροφά ελάχιστα σε σχέση με το ανιόν του TNB που απορροφά ισχυρά στα 412 nm δίνοντας έντονο κίτρινο χρώμα σε ελαφρά αλκαλικό pH.



Σχήμα 3. Αντίδραση DTNB με ελεύθερες θειοαλκοολικές ομάδες

Υλικά

- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL (20), πιπέτες pasteur (5), ρύγχι αυτομάτων πιπετών
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

- Αυτόματη πιπέτα

Αντιδραστήρια

- Αλβουμίνη βοείου ορού (bovine serum albumin, BSA)
- Λυσοζύμη
- Νινυδρίνη
- Γλυκίνη
- Τυροσίνη
- Δεξτράνη
- Χλωριούχο νάτριο
- Καυστικό νάτριο
- Ακετόνη
- τρις-υδροξυαμινομεθάνιο (Tris)
- 5-5'-διθειο-δις(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) [(5-5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), DTNB]

Διαλύματα

- Διάλυμα γλυκίνης 2% κ.β: Διαλύονται 2 g γλυκίνης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα τυροσίνης 1% κ.β σε ακετόνη: Διαλύεται 1 g τυροσίνης σε 100 mL ακετόνης
- Διάλυμα BSA 2% κ.β.: Διαλύονται 2 g BSA σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα λυσοζύμης 2% κ.β.: Διαλύονται 2 g λυσοζύμης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα NaCl 0,9% κ.β. (φυσιολογικός ορός): Διαλύονται 0,9 g NaCl σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα δεξτράνης 3% κ.β. σε φυσιολογικό ορό: Διαλύονται 3 g δεξτράνης σε 100 mL φυσιολογικό ορό
- Διάλυμα νινυδρίνης 3% κ.β. σε ακετόνη: Διαλύονται 3 g νινυδρίνης σε 100 mL ακετόνης
- Διάλυμα μυοσίνης παρασκευασμένο από μυς μοσχαριού (εργαστηριακή άσκηση 3)
- Πυκνό νιτρικό οξύ (>90%)
- NaOH 5 N: Διαλύονται 20 g NaOH σε 100 mL απιονισμένο νερό.
- Μερκαπτοαιθανόλη 0,04% κ.ο.: Διαλύονται 6 μL μερκαπτοαιθανόλης σε 15 mL απιονισμένο νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 100 mM-pH 8,0: Διαλύονται 1,21 g τρις-υδροξυαμινομεθάνιο σε 90 mL απιονισμένο νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 8,0, μεταφέρεται το διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη και ρυθμίζεται ο όγκος στα 100 mL
- DTNB 5 mM: Διαλύονται 0,1982 g DTNB σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris 100 mM-pH 8,0

Πορεία

Αντίδραση νινυδρίνης

1. Σε 5 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (οι όγκοι δίνονται σε mL):

	1	2	3	4	5
Γλυκίνη 2%	125	-	-	-	-
Τυροσίνη 1%	-	125	-	-	-
Δεξτράνη 3%	-	-	125	-	-
BSA 2%	-	-	-	125	-
Διάλυμα μυοσίνης	-	-	-	-	500
H ₂ O	375	375	375	375	-
Διάλυμα νινυδρίνης 3%	100	100	100	100	100

- Μετά τη προσθήκη της νινυδρίνης το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται καλά σε vortex, θερμαίνεται σε υδρόλουτρο των 100 °C για 1 min και παρατηρείται το χρώμα στους σωλήνες

Αντίδραση Ξανθοπρωτεΐνης

- Σε 6 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (οι όγκοι δίνονται σε mL):

	1	2	3	4	5	6
Γλυκίνη 2%	500	-	-	-	-	-
Τυροσίνη 1%	-	500	-	-	-	-
Δεξτράνη 3%	-	-	500	-	-	-
BSA 2%	-	-	-	500	-	-
Λυσοζύμη 2%	-	-	-	-	500	-
Διάλυμα μυοσίνης	-	-	-	-	-	500
Πυκνό νιτρικό οξύ*	3 σγ	3 σγ	3 σγ	3 σγ	3 σγ	3 σγ

* Η προσθήκη του νιτρικού οξέος γίνεται στον απαγωγό

- Μετά τη προσθήκη του πυκνού νιτρικού οξέος το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται καλά σε vortex και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο των 60 °C για 5 min και παρατηρείται το χρώμα στους σωλήνες.
- Μετά από ψύξη, στους σωλήνες προστίθεται στάγδην NaOH 5 N και παρατηρείται το χρώμα

Αντίδραση ελεύθερων θειοαλκοολικών ομάδων (-SH) με το αντιδραστήριο Ellman

- Σε 5 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (οι όγκοι δίνονται σε mL):
- Μετά τη προσθήκη και του διαλύματος DTNB το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται καλά σε vortex και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- Μετά το τέλος της επώασης παρατηρείται το χρώμα στους σωλήνες.

	1	2	3	4	5
Γλυκίνη 2%	500	-	-	-	-
Μερκαπτοαιθανόλη 0,04%	-	500	-	-	-
BSA 2%	-	-	500	-	-
Λυσοζύμη 2%	-	-	-	500	-
Διάλυμα μυοσίνης	-	-	-	-	500
Tris 100 mM-pH 8,0	220	220	220	220	220
DTNB 5 mM	100	100	100	100	100

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Κατασκευάστε πίνακες με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που βάλατε σε κάθε σωλήνα και περιγράψτε τη πορεία του πειράματος
2. Καταγράψτε τις παρατηρήσεις σας για κάθε σωλήνα μετά το τέλος της κάθε αντίδρασης (εμφάνιση ή όχι χρώματος στο σωλήνα, ένταση χρώματος, άλλα φαινόμενα)
3. Με βάση τις δομές των ενώσεων που έχετε σε κάθε σωλήνα σχολιάστε τις παρατηρήσεις σας
4. Μετά από αυτή τη σειρά πειραμάτων πιστοποιείται η ύπαρξη πρωτεΐνης στο διάλυμα της μυοσίνης ;
5. Τι συμπεράσματα μπορούν να βγουν για τη σχετική αναλογία κυστεϊνών στο μόριο της λυσοζύμης και της BSA, βάση του χρώματος που προκύπτει από την αντίδραση αυτών των πρωτεϊνών με το DTNB ;

Εργαστηριακή άσκηση 6

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Σκοπός

Σκοπός της άσκησης είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS μίγματος προτύπων πρωτεϊνών καθώς και των διαλυμάτων που προκύπτουν από τα διάφορα στάδια απομονώσης της μυοσίνης (εργαστηριακή άσκηση 3). Απώτερος σκοπός είναι να αξιολογηθεί η πορεία απομόνωσης και παράλληλα να προσδιοριστεί το MB πρωτεϊνών συγκεκριμένων ζωνών.

Αρχή μεθόδου

Στην SDS-PAGE πριν το ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους αποδιατάσσονται και αποκτούν σταθερό λόγο αρνητικού φορτίου προς μάζα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η σχετική μετακίνηση των αποδιατεταγμένων αλυσίδων να εξαρτάται μόνο από το σχετικό τους μέγεθος και την ικανότητα τους να διαπεράσουν τους πόρους της πηκτής. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους (logMB) της πρωτεΐνης. Η ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες πρωτεϊνών γνωστού MB έχει σαν αποτέλεσμα την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μεταξύ του logMB και της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας από την οποία μπορεί να βρεθεί το MB μίας πρωτεΐνης.

Υλικά

- Ποτήρια ζέσεως, γυάλινα σιφώνια
- Γυάλινες πλάκες
- Διαχωριστικές ταινίες (spacers) για τη ρύθμιση του πάχους της πηκτής
- Κτένα (comb) για το σχηματισμό των θέσεων του δείγματος στη πηκτή
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος

Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδιο
- N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο
- τρις-υδροξυαμινομεθάνιο (Tris)
- Δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)
- Υπερθειικό αμμώνιο
- Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED)
- Γλυκερόλη
- 2-μερκαπτοαιθανόλη
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης
- Γλυκίνη

- Coomassie Brilliant Blue R-250
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ

Διαλύματα

1. Διάλυμα ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (30% T, 2,67% C)
2. Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-υδροξυαμινομεθανίου (Tris-HCl) 1,5 M, pH 8,8: Διαλύονται 18,15 g Tris σε 90 mL απεσταγμένο νερό μέσα σε ποτήρι ζέσεως. Ρυθμίζεται το pH στο 8,8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
3. Ρυθμιστικό διάλυμα τρις-υδροξυαμινομεθανίου (Tris-HCl) 0,5 M, pH 6,8: Παρασκευάζεται με παρόμοιο τρόπο με το ρυθμιστικό διάλυμα 2
4. Διάλυμα δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) 10% κ.β.: Διαλύονται 10 g SDS σε 100 mL απεσταγμένου νερού
5. Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου 10% κ.β.: Διαλύονται 10 g υπερθειικού αμμωνίου σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα παρασκευάζεται την ημέρα του πειράματος.
6. Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer) που περιέχει Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, γλυκερόλη 10% κ.β., SDS 2% κ.β., 2-μερκαπτοαιθανόλη 5% κ.ο., κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,002 κ.β.: Διαλύονται 0,756 g Tris, 10 g γλυκερόλης, 2 g SDS, 5g 2-μερκαπτοαιθανόλης και 0,002 g κυανούν της βρωμοφαινόλης σε 90 mL απεσταγμένο νερό μέσα σε ποτήρι ζέσεως. Ρυθμίζεται το pH στο 6,8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
7. 5x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που περιέχει Tris-HCl 25 mM pH 8,3, γλυκίνη 192 mM και SDS 0,1 % w/v: Διαλύονται 3,02 g Tris, 14,413 g γλυκίνης και 1 g SDS σε 900 mL απεσταγμένο νερό μέσα σε ποτήρι ζέσεως. Ρυθμίζεται το pH στο 6,8 και συμπληρώνεται ο όγκος στα 1000 mL σε ογκομετρική φιάλη του 1 L
8. Μίγμα πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας
9. Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% w/v, μεθανόλη 40% v/v και οξικό οξύ 10% v/v: Διαλύονται 0,25g Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 mL μεθανόλης και 10 mL οξικό οξύ σε 100 mL απεσταγμένο νερό.
10. Διάλυμα αποχρωματισμού που περιέχει μεθανόλη 40% κ.ο. και οξικό οξύ 10% κ.ο.: Διαλύονται 40 mL μεθανόλης και 10 mL οξικό οξύ σε 100 mL απεσταγμένο νερό
11. Διάλυμα διατήρησης που περιέχει οξικό οξύ 1% κ.ο., οξικό νάτριο 5% κ.β. και γλυκερόλη 10% κ.ο.: Διαλύονται 1 mL οξικό οξύ, 5 g οξικό νάτριο και 10 mL γλυκερόλης σε 100 mL απεσταγμένο νερό.

Πορεία

Συναρμολόγηση του sandwich της πηκτής

1. Ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες τοποθετούνται ειδικές διαχωριστικές ταινίες με σκοπό να ρυθμιστεί το πάχος της πηκτής που θα δημιουργηθεί ανάμεσα τους
2. Στη συνέχεια, ανάμεσα στις δύο πλάκες τοποθετείται ειδική κτένα και σημειώνεται γραμμή 1 cm κάτω από το άκρο των δοντιών της κτένας. Η γραμμή αυτή καθορίζει τη στάθμη μέχρι την οποία θα ανέλθει η πηκτή διαχωρισμού

Παρασκευή της πηκτής

1. Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού, η οποία θα έχει 12% μονομερές ακρυλαμίδιο και 0,375 M Tris-HCl pH 8,8. Για το σκοπό αυτό σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται 20 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (30% T, 2,67% C) με 12,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,5 mL διαλύματος SDS 10% και 16,75 mL νερό
2. Το διάλυμα του μονομερούς απαερώνεται για 15 τουλάχιστον λεπτά ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο
3. Στη συνέχεια, προστίθενται 500 μ L διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% και 50 μ L TEMED
4. Αμέσως μετά την προσθήκη του TEMED, το μίγμα τοποθετείται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των πλακών
5. Το μίγμα καλύπτεται με ισοβουτανόλη κορεσμένη σε νερό και αφήνεται να πολυμεριστεί για 1h
6. Στη συνέχεια, αποχύνεται η ισοβουτανόλη και εκπλένεται η επιφάνεια της πηκτής, που πλέον έχει σχηματιστεί, με νερό
7. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβαση, η οποία αποτελείται από 4% μονομερές ακρυλαμίδιο και 0,125 M Tris-HCl pH 6,8. Για το σκοπό αυτό σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται 1,3 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (30% T, 2,67% C) με 2,5 mL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,5 M pH 8,8, 100 μ L διαλύματος SDS 10% κ.β. και 6,1 mL νερό
8. Το διάλυμα του μονομερούς απαερώνεται για 15 τουλάχιστον λεπτά
9. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μ L διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10% και 10 μ L TEMED
10. Αμέσως μετά την προσθήκη του TEMED, το μίγμα τοποθετείται στο χώρο πάνω από τη πηκτή διαχωρισμού μέχρι η στάθμη καλύψει τα δόντια της κτένας
11. Η πηκτή επιστοίβαση αφήνεται να πολυμεριστεί για 45 min και στη συνέχεια απομακρύνεται η κτένα και εκπλένονται τα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί με νερό

Προετοιμασία δειγμάτων

1. Τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος σε αναλογία περίπου 1:4 και 1:20, αντίστοιχα
2. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95 °C για 4 min

Συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης

1. Το sandwich της πηκτής προσαρμόζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε η εξωτερική πλάκα να αποτελεί τη μια πλευρά της άνω μονάδας ηλεκτροφόρησης
2. Η εσωτερική πλάκα έρχεται σε επαφή με τη συσκευή μέσω μίας ελαστικής λωρίδας, ώστε να μην υπάρχουν διαρροές του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης

Τοποθέτηση των δειγμάτων

1. Παρασκευάζονται αρχικά 1,2 L ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης
2. Τα 700 mL τοποθετούνται στην άνω μονάδα της συσκευής και ελέγχεται αν υπάρχουν διαρροές
3. Τοποθετείται το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα στην κάτω μονάδα της συσκευής.
4. Τοποθετούνται στις θέσεις της πηκτής 100 μL από τα δείγματα και 25 μL από το διάλυμα του μίγματος των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους

Ηλεκτροφόρηση

1. Συνδέεται το ηλεκτρόδιο της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο (-) και το ηλεκτρόδιο της κάτω μονάδας με την άνοδο (+) της συσκευής παροχής του ηλεκτρικού ρεύματος
2. Ρυθμίζεται η τάση στο μέγιστο (999 V), η ισχύς επίσης στο μέγιστο (250 W) και η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή ένταση ρεύματος, που είναι 25 mA για την πηκτή επιστοίβασης και 35 mA για την πηκτή διαχωρισμού
3. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί $\sim 3\text{h}$ και παρακολουθείται με την χρωστική

Εμφάνιση πρωτεϊνών

1. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέονται τα ηλεκτρόδια από τους πόλους και απομακρύνεται η πηκτή από τη συσκευή
2. Διαχωρίζονται οι δύο πλάκες με προσοχή, αποκολλάται η πηκτή και τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής για 45 min υπό ανακίνηση
3. Γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου της πηκτής με δύο διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού για ~ 2 ώρες (για κάθε έκπλυση) υπό ανακίνηση
4. Τέλος, τοποθετείται η πηκτή στο διάλυμα της διατήρησης για 1 ώρα, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί ο αποχρωματισμός της και να διατηρηθεί σε καλή κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Να υπολογιστεί η σχετική κινητικότητα των δεικτών μοριακής μάζας και να κατασκευαστεί η καμπύλη $\log(\text{MB})$ σε συνάρτηση με την σχετική κινητικότητα
2. Από την καμπύλη που κατασκευάσατε να υπολογιστούν τα MB των ζωνών που θα σας υποδειχτούν
3. Να σχολιαστεί η μορφή των ηλεκτροφορημάτων από τα διάφορα στάδια απομόνωσης της μυοσίνης

Εργαστηριακές ασκήσεις λιποειδών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 7

Εκχύλιση λιποειδών από αβγό κατά Bligh-Dyer

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργαστηριακής άσκησης είναι η παραλαβή του συνόλου των λιποειδών (ουδετέρων και πολικών) από κρόκο αυγού.

Αρχή της μεθόδου

Τα λιποειδή διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών ενός βιολογικού δείγματος, καθώς και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, αμινοξέων ή σακχάρων. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος στο διφασικό $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v), στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται μόνο τα λιποειδή ενώ στην υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του βιολογικού δείγματος.

Υλικά

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, γυάλινο χωνί, διηθητικό χαρτί, κωνική φιάλη, γυάλινος μεγάλος σωλήνας
- Διαχωριστική χοάνη
- Σιφώνι

Αντιδραστήρια

- Αβγό
- Χλωροφόρμιο αναλυτικής καθαρότητας
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Πορεία

1. Αποχωρίζεται το ασπράδι από τον κρόκο του αυγού με διαδοχικές μεταγγίσεις και μεταφέρεται ο κρόκος σε κωνική φιάλη
2. Στην κωνική φιάλη προστίθενται 10 mL χλωροφόρμιο, 20 mL μεθανόλης και 8 mL H_2O ώστε να προκύψει μονοφασικό σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) και αναδεύονται ισχυρά
3. Το μίγμα διηθείται από ηθμό για να απομακρυνθούν τα δυσδιάλυτα κομμάτια. Το διήθημα συλλέγεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και καταγράφεται ο όγκος του
4. Μεταφέρεται το διήθημα σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται κατάλληλες ποσότητες από χλωροφόρμιο και νερό ώστε να προκύψει το διφασικό σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v)

5. Μετά από ισχυρή ανάδευση, το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δυο φάσεων
6. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης προζυγίζεται ένας γυάλινος σωλήνας
7. Παραλαμβάνεται η χλωροφορμική (κάτω) φάση στο προζυγισμένο γυάλινο σωλήνα
8. Αφήνεται το δείγμα για εξάτμιση ώστε να απομακρυνθεί το χλωροφόρμιο μέχρι την επόμενη εργαστηριακή άσκηση

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Κατασκευάστε το διάγραμμα της πορείας εκχύλισης
2. Σχολιάστε την αναγκαιότητα κάθε σταδίου

Ερωτήσεις

1. Γιατί είναι απαραίτητη η δημιουργία, αρχικά, μονοφασικού συστήματος κατά την εκχύλιση των λιποειδών;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 8

Διαχωρισμός ουδετέρων-πολικών λιποειδών με κατανομή κατ'αντιρροή

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι ο διαχωρισμός των ολικών λιποειδών από κρόκο αυγού, τα οποία απομονώθηκαν στην εργαστηριακή άσκηση 7, σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των πολικών και ουδετέρων λιποειδών σε οργανικούς διαλύτες. Τα ολικά λιποειδή διαχωρίζονται σε προεξισορροπημένο διφασικό σύστημα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθανόλης 87%. Στο σύστημα αυτό τα πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης και τα ουδέτερα λιποειδή στην φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Για τον ποσοτικό διαχωρισμό (ποσοστό >97%) των δυο τάξεων, η πορεία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 8 φορές.

Υλικά

- Μεγάλοι δοκιμαστικοί σωλήνες (5), γυάλινες πιπέτες Pauster (2)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αντιδραστήρια

- Πετρελαϊκός αιθέρας προεξισορροπημένος με 87% κ.ο. αιθανόλη και αιθανόλη 87% κ.ο. προεξισορροπημένη με πετρελαϊκό αιθέρα: Ίσοι όγκοι πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης 87% κ.ο. μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη και αναδεύονται ισχυρά. Λαμβάνονται χωριστά η πάνω (πετρελαϊκός αιθέρας προεξισορροπημένος με αιθανόλη 87% κ.ο.) και η κάτω φάση (αιθανόλη 87% κ.ο. προεξισορροπημένη με πετρελαϊκό αιθέρα).

Πορεία

1. Ζυγίζεται ο σωλήνας με τα ολικά λιποειδή του κρόκου αυγού από την προηγούμενη εργαστηριακή άσκηση
2. Στο σωλήνα προστίθενται 4,5 mL πετρελαϊκού αιθέρα προεξισορροπημένου με αιθανόλη 87% κ.ο. (σωλήνας 1) και αναδεύεται ισχυρά σε vortex
3. Προζυγίζονται δυο μεγάλοι σωλήνες (σωλήνας 2 και 3)
4. Στο σωλήνα 1 προστίθενται 1,5 mL αιθανόλης 87% κ.ο. προεξισορροπημένης με πετρελαϊκό αιθέρα και αναδεύεται ισχυρά σε vortex
5. Μετά από την εξισορρόπηση των δυο φάσεων, παραλαμβάνεται με πιπέτα pasteur η αιθανολική (κάτω) φάση, η οποία και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει επίσης 4,5 mL πετρελαϊκού αιθέρα (σωλήνας 2)

6. Ακολουθεί νέα ανάδευση και μετά από την εξισορρόπηση των δυο φάσεων παραλαβή της αιθανολικής φάσης του δεύτερου σωλήνα σε τρίτο σωλήνα (σωλήνας 3)
7. Στη συνέχεια, προστίθεται και πάλι στο σωλήνα 1, 1.5 mL αιθανόλης 87% κ.ο. και ακολουθείται η ίδια διαδικασία.
8. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία συνολικά 8 φορές
9. Μετά το πέρας της διαδικασίας μεταφέρεται με απόχυση το περιεχόμενο του σωλήνα 1 στο σωλήνα 2. Ο σωλήνας 2 (φάση του πετρελαϊκού αιθέρα, 2x4,5 mL) περιέχει το σύνολο των ουδετέρων λιποειδών
10. Ο σωλήνας 3 (αιθανολική φάση, 8x1.5 mL) περιέχει το σύνολο των πολικών λιποειδών
11. Αφήνονται οι σωλήνες ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης μέχρι την επόμενη εργαστηριακή άσκηση

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Υπολογίστε την ποσότητα των ολικών λιποειδών που εκχυλίστηκαν από τον κρόκο αβγού
2. Σχολιάστε την αναγκαιότητα κάθε σταδίου της κατανομής κατ'αντιρροή

Ερωτήσεις

1. Γιατί είναι απαραίτητη η προεξισορρόπηση των διαλυτών ;
2. Εάν ο διαχωρισμός γινόταν με χρήση 9 mL πετρελαϊκού αιθέρα και 12 mL αιθανόλης μία φορά το αποτέλεσμα θα ήταν το ίδιο; Εξηγήστε

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 9

Προσδιορισμός λιποειδικού φωσφόρου

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι ο προσδιορισμός του λιποειδικού φωσφόρου στα κλάσματα ουδετέρων και πολικών λιποειδών, τα οποία προέκυψαν από την κατανομή κατ'άντιρροή στην εργαστηριακή άσκηση 8. Σκοπός του προσδιορισμού είναι, αφ'ενός να βρεθεί η ποσότητα των φωσφολιποειδών στο κρόκο του αυγού αλλά και να αξιολογηθεί ο διαχωρισμός σε ουδέτερα και πολικά λιποειδή.

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός λιποειδικού φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση παρουσία υπερχλωρικού οξέος. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου, σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο που ανάγεται προς κυανούν του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Ως αναγωγικό αντιδραστήριο χρησιμοποιείται το αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ (ANSA).

Υλικά

- Σωλήνες μεγάλοι (10) (πλυμένοι με χρωμοθειικό οξύ, επειδή τα απορρυπαντικά περιέχουν φωσφορικά άλατα και αφήνουν φωσφορικά υπολείμματα στα τοιχώματά των σωλήνων), σιφώνια, ποτήρια ζέσεως, κυψελίδες (4), ρύγχη πιπετών
- Αυτόματες πιπέτες
- Αμμόλουτρο 170-180°C
- Υδρόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο

Αντιδραστήρια

- Μολυβδαινικό αμμώνιο
- Όξινο θειώδες νάτριο
- Θειώδες νάτριο
- 1,2,4-αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο

Διαλύματα

- Υπερχλωρικό οξύ 72% κ.β.
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4% κ.β.: Διαλύονται 0,4 g μολυβδαινικού αμμωνίου σε 100 mL νερού

- Διάλυμα ANSA : Διαλύονται 30 g NaHSO₃ και 6 g Na₂SO₃ σε 250 mL νερό. Προστίθεται 0,5 g 1,2,4-αμινοναφθολοσουλφονικού οξέος. Αν σε 3 ώρες σχηματιστεί ίζημα, το διάλυμα διηθείται, φυλάσσεται δε σε ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση επί ένα μήνα μετά την ημέρα παρασκευής του.
- Αντιδραστήριο ANSA : Παρασκευάζεται πριν από τον προσδιορισμό με ανάμιξη 4 mL διαλύματος ANSA και 6 mL νερού.
- Πρότυπο διάλυμα φωσφόρου (KH₂PO₄), 4 μg P/mL: 1,7575 mg KH₂PO₄ διαλύονται σε 100 mL νερού. Το KH₂PO₄ ξηραίνεται στους 105 °C για 1 ώρα πριν ζυγιστεί.
- Μίγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης (1:1, v/v)

Πορεία

1. Ζυγίζονται οι σωλήνες με τα πολικά και ουδέτερα λιποειδή του αυγού από την προηγούμενη εργαστηριακή άσκηση.
2. Στους σωλήνες προστίθενται 10 mL χλωροφόρμιο και αναδεύονται ισχυρά
3. Σε δύο καινούργιους μεγάλους σωλήνες, που σηματοδοτούνται PL1/10 και NL 1/10, προστίθενται 100 μL από τα PL και NL, αντίστοιχα και 10 mL χλωροφόρμιο
4. Αριθμούνται 7 μεγάλοι δοκιμαστικοί σωλήνες T (για τυφλό), Σ1-Σ4 (για τα πρότυπα διαλύματα), PL για το δείγμα των πολικών λιποειδών και NL για το δείγμα των ουδετέρων λιποειδών
5. Τοποθετούνται 50 μl από τα πολικά λιποειδή (PL 1/50) και από ουδέτερα λιποειδή (NL 1/50) στους αντίστοιχους σωλήνες και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου.
6. Σε όλους τους σωλήνες προστίθενται 0,5 mL HClO₄ 72% και οι σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο 170-180°C για 1 ώρα.
7. Μετά την καύση, τα δείγματα ψύχονται και προστίθενται στον καθένα τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα
8. Μετά από ισχυρή ανάδευση, οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο στους 100°C για 10 λεπτά.
9. Αφήνονται για 20 λεπτά να ψυχθούν και φωτομετρούνται στα 820 nm.

	Τυφλό	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	PL 1/10	NL 1/10
HClO ₄ 72% (μL)	500	500	500	500	500	50	50
Τοποθέτηση σε αμμόλουτρο 170-180°C για 1 ώρα							
H ₂ O (μL)	1000	800	600	400	200	1000	1000
KH ₂ PO ₄ , 4μg P/mL (μL)	-	200	400	600	800	-	-
Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4%	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
ANSA	500	500	500	500	500	500	500
Υδρόλουτρο 100°C για 10 min.							
Φωτομέτρηση στα 820 nm							

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Υπολογίστε την ποσότητα των πολικών και ουδετέρων λιποειδών που εκχυλίστηκαν
2. Κατασκευάστε πίνακα με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που βάλατε σε κάθε σωλήνα και τις τιμές των απορροφήσεων
3. Κατασκευάστε την καμπύλη αναφοράς $A=f(\mu\text{g P})$
4. Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίστε την ποσότητα (σε μg) φωσφόρου στα δείγματα των πολικών και ουδετέρων λιποειδών
5. Υπολογίστε τη συγκέντρωση φωσφόρου στα αρχικά δείγματα των πολικών και ουδετέρων λιποειδών

Ερωτήσεις

1. Γιατί προστίθεται το HClO_4 72% στον προσδιορισμό φωσφόρου;
2. Τι σφάλμα θα προκύψει εάν δεν πλυθούν οι σωλήνες των δειγμάτων με χρωμοθειϊκό οξύ;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 10

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) λιποειδών

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι ο διαχωρισμός του κλάσματος των πολικών και των ουδέτερων λιποειδών από κρόκο αβγού (εργαστηριακή άσκηση 8) στις επιμέρους τάξεις των λιποειδών με TLC.

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός μίγματος λιποειδών στη χρωματογραφία TLC, όταν η στατική φάση είναι πηκτή πυριτικού, οφείλεται στη διαφορετική προσρόφηση του κάθε λιποειδούς στην πηκτή. Η πηκτή πυριτικού είναι πολική στατική φάση με αποτέλεσμα καθώς ανεβαίνει η κινητή φάση τα πολικά λιποειδή να δεσμεύονται πιο ισχυρά σε αυτή και να καθυστερούν να ανέβουν. Αντίθετα τα ουδέτερα λιποειδή δεν δεσμεύονται ισχυρά στη στατική φάση και παρασύρονται από την κινητή φάση ανεβαίνοντας πιο ψηλά (βλέπε παράγραφο 4.3).

Υλικά

- Ποτήρια ζέσεως, πιπέτες pasteur
- Γυάλινοι θάλαμοι χρωματογραφίας
- Θάλαμος ιωδίου
- Γυάλινες πλάκες 20x20 cm
- Ειδική πλαστική βάση επίστρωσης πλακών
- Συσκευή Desaga για την επίστρωση των πλακών

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, διαιθυλαιθέρας, πετρελαϊκός αιθέρας)
- Οξικό οξύ
- Ιώδιο
- Silica gel G

Διαλύματα

- Πρότυπο διάλυμα λιποειδών αυγού 1% κ.β
- Διάλυμα ελαίου σε χλωροφόρμιο 1% κ.β.

Πορεία

Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών

1. Στην ειδική βάση για την επίστρωση των πλακών τοποθετούνται 5 καθαρές γυάλινες πλάκες
2. Ρυθμίζεται στην ειδική συσκευή Desaga το πάχος επίστρωσης στα 0.5 mm και τοποθετείται πάνω στην πρώτη πλάκα
3. Σε γυάλινο δοχείο ζυγίζονται 60 g silica gel G
4. Στο γυάλινο δοχείο προστίθενται 120 mL νερού και ανακινείται ισχυρά για 2 λεπτά ώστε να δημιουργηθεί η πυριτική πηκτή
5. Αμέσως μετά τα 2 λεπτά η πηκτή επιστρώνεται με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής Desaga στις γυάλινες πλάκες
6. Όταν οι πλάκες στεγνώσουν, ενεργοποιούνται με θέρμανση στους 110°C για 1 ώρα

Προετοιμασία των θαλάμων χρωματογραφίας

1. Επισημαίνονται δυο θάλαμοι ανάπτυξης ως PL - NL και καλύπτονται εσωτερικά με διηθητικό χαρτί
2. Σε ένα ποτήρι τοποθετούνται 70 mL πετρελαϊκού αιθέρα, 30 mL διαιθυλαιθέρα και 1 mL οξικού οξέος, ώστε να προκύψει σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκός αιθέρας:διαιθυλαιθέρας:οξικό οξύ (70:30:1, v/v/v) (σύστημα ανάπτυξης NL)
3. Σε ένα ποτήρι τοποθετούνται 65 mL χλωροφόρμιο, 35 mL μεθανόλης και 6 mL νερό, ώστε να προκύψει σύστημα ανάπτυξης χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:35:6, v/v/v) (σύστημα ανάπτυξης PL)
4. Αφού αναδευτούν τα μίγματα των διαλυτών αποχύνονται στους αντίστοιχους θαλάμους ανάπτυξης διαβρέχοντας το διηθητικό χαρτί
5. Πάνω στους θαλάμους τοποθετείται το ειδικό κάλυμμα και αφήνονται για περίπου 1 ώρα ώστε να κορεσθούν με τους ατμούς της κινητής φάσης

Τοποθέτηση των δειγμάτων και ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων

1. Δυο πλάκες επισημαίνονται ως PL - NL και χωρίζονται με τη βοήθεια ειδικού χάρακα σε ισοπαχείς ζώνες
2. Τα δείγματα τοποθετούνται και στις δυο πλάκες με μορφή κηλίδας ~2 cm από το κάτω μέρος της πλάκας προσέχοντας να μην καταστραφεί η πηκτή
3. Στις πλάκες τοποθετούνται επίσης τα πρότυπα διαλύματα λιποειδών
4. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης των δειγμάτων από τη στατική φάση τοποθετούνται οι πλάκες στους αντίστοιχους θαλάμους ανάπτυξης
5. Κατά την ανάπτυξη παρακολουθείται η μετακίνηση της κινητής φάσης πάνω στη στατική
6. Όταν φθάσει η κινητή φάση στο πάνω μέρος της πλάκας απομακρύνεται η πλάκα από το θάλαμο και τοποθετείται στον απαγωγό για να εξατμιστούν οι διαλύτες

Εμφάνιση των χρωματογραφημάτων

1. Όταν οι πλάκες στεγνώσουν τοποθετούνται σε θάλαμο που έχει κορεσθεί με ατμούς ιωδίου
2. Όταν εμφανιστούν οι κηλίδες των ενώσεων απομακρύνεται οι πλάκες από το θάλαμο ιωδίου και σημειώνονται στο πίσω μέρος με μαρκαδόρο οι κηλίδες

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Υπολογίστε τα R_f των κηλίδων στα πρότυπα διαλύματα λιποειδών
2. Υπολογίστε τα R_f των κηλίδων στο δείγμα των ουδετέρων και πολικών λιποειδών
3. Συγκρίνεται τα R_f των κηλίδων στα δείγματα με τα R_f των κηλίδων στα πρότυπα διαλύματα και ταυτοποιήστε τις κηλίδες των δειγμάτων
4. Σχολιάστε την σχετική θέση των λιποειδών στη πλάκα με βάση τις χημικές τους δομές

Ερωτήσεις - Ασκήσεις

1. Τι θα συμβεί στο χρωματογραφικό διαχωρισμό εάν δεν ενεργοποιηθούν οι πλάκες ;
2. Πως θα μεταβληθεί η σχετική θέση των ενώσεων, σε σχέση με το πείραμα σας, εάν στο διαχωρισμό των πολικών λιποειδών το σύστημα ανάπτυξης μεταβληθεί σε χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (85:15:6, v/v/v);

Εργαστηριακές ασκήσεις υδατανθράκων

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 11

Ενζυμική και χημική υδρόλυση υδατανθράκων

Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργαστηριακής άσκησης είναι η ανάλυση υδατανθράκων. Για αυτό το λόγο θα πραγματοποιηθεί υδρόλυση δισακχαριτών με ενζυμικό και χημικό τρόπο και τα προϊόντα υδρόλυσης θα αναλυθούν στην επόμενη εργαστηριακή άσκηση.

Αρχή της μεθόδου

Στην συγκεκριμένη άσκηση θα πραγματοποιηθεί υδρόλυση πρότυπων ενώσεων υδατανθράκων με ενζυμικό και χημικό τρόπο. Η ενζυμική υδρόλυση θα πραγματοποιηθεί με το ένζυμο α-γλυκοζιδάση το οποίο υδρολύει εκλεκτικά α(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ μορίων γλυκόζης. Η χημική υδρόλυση θα πραγματοποιηθεί σε όξινο περιβάλλον με θέρμανση και έχει ως αποτέλεσμα τη μη εκλεκτική υδρόλυση όλων των γλυκοζιτικών δεσμών των μορίων.

Υλικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες μικροί (5), σιφώνι, αυτόματες πιπέτες, ρύγχοι πιπετών
- Υδρόλουτρο
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αντιδραστήρια

- Υδροχλώριο
- α-γλυκοζιδάση (40-80 units/mg πρωτεΐνης)
- Μαλτόζη
- Σακχαρόζη
- Κελλοβιόζη
- Λακτόζη

Διαλύματα

- Διάλυμα μαλτόζης 0,5% κ.β: Διαλύονται 0,5 g μαλτόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα λακτόζης 0,5% κ.β: Διαλύονται 0,5 g λακτόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα σακχαρόζης 0,5% κ.β: Διαλύονται 0,5 g σακχαρόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα κελλοβιόζης 0,5% κ.β: Διαλύονται 0,5 g κελλοβιόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα HCl 0,5 M: Αναμιγνύονται 5 mL πυκνό HCl (37% κ.ο.) με 100 mL απιονισμένο νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,1M pH 4,0: Διαλύονται 5,1 g οξικού οξέος και 2,05 g οξικού νατρίου σε νερό. Ρυθμίζεται το pH σε 4,0 και ο όγκος στο 1 L με ογκομετρική φιάλη
- Υδατικό διάλυμα α-γλυκοζιδάσης (40-80 units/mg πρωτεΐνης)

Πορεία

Ενζυμική υδρόλυση

1. Σε 4 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (οι όγκοι δίνονται σε mL):

	1	2	3	4
Μαλτόζη 0,5%	100	-	-	-
Λακτόζη 0,5%	-	100	-	-
Κελλοβιόζη 0,5%	-	-	100	-
Σακχαρόζη 0,5%	-	-	-	100
Ρυθμιστικό διάλυμα	200	200	200	200
Διάλυμα α-γλυκοζιδάσης	50	50	50	450
Θέρμανση 37°C, 20 min				

2. Προστίθεται 1 mL βουτανόλης και ύστερα από έντονη ανάδευση η στιβάδα της βουτανόλης μεταφέρεται σε άλλο σωλήνα. Επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά η ίδια διαδικασία
3. Αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης μέχρι την επόμενη εργαστηριακή άσκηση

Χημική υδρόλυση

1. Σε 4 μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται τα αντιδραστήρια με τη σειρά που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (οι όγκοι δίνονται σε mL):

	1	2	3	4
Μαλτόζη 0,5%	100	-	-	-
Λακτόζη 0,5%	-	100	-	-
Κελλοβιόζη 0,5%	-	-	100	-
Σουκρόζη 0,5%	-	-	-	100
Διάλυμα HCl 0,5M	1000	1000	1000	1000
Θέρμανση 100°C, 30 λεπτά				

2. Μετά την επώαση γίνεται εξουδετέρωση με NaOH 0,5 N, η οποία παρακολουθείται με pHμετρικό χαρτί.
3. Ακολουθούνται τα στάδια 2,3 της ενζυμικής υδρόλυσης

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Σχολιάστε την αναγκαιότητα κάθε σταδίου
2. Εξηγήστε με βάση τη δομή των δισακχαριτών ποια περιμένετε να είναι τα προϊόντα υδρόλυσης από την ενζυμική και χημική υδρόλυση

Ερωτήσεις

1. Τα προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης θα άλλαζαν εάν χρησιμοποιούσατε β-γλυκοζιδάση. Εξηγήστε

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 12

Χρωματογραφικός διαχωρισμός υδατανθράκων

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης άσκησης είναι ο διαχωρισμός των προϊόντων υδρόλυσης των υδατανθράκων που προέκυψαν από την εργαστηριακή άσκηση 11 και η ταυτοποίηση της δομής τους με TLC και συγχρωματογράφιση με πρότυπα διαλύματα μονοσακχαριτών.

Αρχή της μεθόδου

Ο διαχωρισμός μίγματος υδατανθράκων στην χρωματογραφία TLC, όταν η στατική φάση είναι πηκτή πυριτικού, οφείλεται στη διαφορετική προσρόφηση του κάθε υδατάνθρακα στην πηκτή (βλέπε παράγραφο 4.3). Οι πιο πολικοί υδατάνθρακες θα δεσμευτούν πιο ισχυρά στην πολική στατική φάση και θα μετακινηθούν λιγότερο.

Υλικά

- Ποτήρια ζέσεως
- Γυάλινοι θάλαμοι χρωματογραφίας
- Φούρνος
- Γυάλινες πλάκες 20x20 cm
- Silica gel G
- Συσκευή Desaga για την επίστρωση των πλακών
- Πιπνέτες Pasteur

Αντιδραστήρια

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (βουτανόλη, μεθανόλη)
- Οξικό οξύ

Διαλύματα

- Διάλυμα γαλακτόζης 0,5% κ.β.: Διαλύονται 0,5 g γαλακτόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό
- Διάλυμα γλυκόζης 0,5% κ.β.: Διαλύονται 0,5 g γλυκόζης σε 100 mL απιονισμένο νερό

Πορεία

Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών

7. Στην ειδική βάση για την επίστρωση των πλακών τοποθετούνται 5 καθαρές γυάλινες πλάκες
8. Ρυθμίζεται στην ειδική συσκευή Desaga το πάχος επίστρωσης στα 0.5 mm και τοποθετείται πάνω στην πρώτη πλάκα

9. Σε γυάλινο δοχείο ζυγίζονται 60 g silica gel G
10. Στο γυάλινο δοχείο προστίθενται 120 mL νερού και ανακινείται ισχυρά για 2 λεπτά ώστε να δημιουργηθεί η πυριτική πηκτή
11. Αμέσως μετά τα 2 λεπτά η πηκτή επιστρώνεται με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής Desaga στις γυάλινες πλάκες
12. Όταν οι πλάκες στεγνώσουν, ενεργοποιούνται με θέρμανση στους 110°C για 1 ώρα

Προετοιμασία των θαλάμων χρωματογραφίας

1. Ο θάλαμος χρωματογραφίας καλύπτεται εσωτερικά με διηθητικό χαρτί
2. Σε ένα ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 40 mL βουτανόλης, 20 mL νερό και 20 mL οξικό οξύ, ώστε να προκύψει σύστημα ανάπτυξης βουτανόλη:νερό:οξικό οξύ (2:1:1, v/v/v)
3. Αφού ανακατευτεί το μίγμα των διαλυτών αποχύνεται στο θάλαμο ανάπτυξης διαβρέχοντας το διηθητικό χαρτί
4. Πάνω στους θαλάμους τοποθετείται το ειδικό κάλυμμα και αφήνονται για περίπου 1 ώρα να ώστε να κορεσθούν με τους ατμούς των διαλυτών

Τοποθέτηση των δειγμάτων και ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων

1. Τα δείγματα (από την ενζυμική και χημική υδρόλυση) τοποθετούνται στη πλάκα με μορφή κηλίδας ~2 cm από το κάτω μέρος της πλάκας προσέχοντας να μην καταστραφεί η πηκτή
2. Στις πλάκες τοποθετούνται επίσης τα πρότυπα διαλύματα γαλακτόζης 0,5% κ.β. και γλυκόζης 0,5% κ.β.
3. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης των δειγμάτων από τη στατική φάση τοποθετούνται οι πλάκες στους αντιστοίχους θαλάμους ανάπτυξης
4. Κατά την ανάπτυξη παρακολουθείται η μετακίνηση της κινητής φάσης πάνω στη στατική (μέτωπο διαλύτη)
5. Όταν φθάσει η κινητή φάση στο πάνω μέρος της πλάκας απομακρύνεται η πλάκα από το θάλαμο και τοποθετείται στον απαγωγό για να εξατμιστούν οι διαλύτες

Εμφάνιση των χρωματογραφημάτων

1. Όταν οι πλάκες στεγνώσουν ψεκάζονται με διάλυμα θειικού οξέος 50% κ.ο. και τοποθετούνται σε φούρνο στους 180°C για περίπου 1h
2. Όταν εμφανιστούν οι κηλίδες των ενώσεων απομακρύνεται οι πλάκες από το φούρνο και σημειώνονται στο πίσω μέρος με μαρκαδόρο οι κηλίδες

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Σχολιασμός

1. Υπολογίστε τα R_f των κηλίδων στα αρχικά διαλύματα των πρότυπων υδατανθράκων
2. Υπολογίστε τα R_f των κηλίδων στα δείγμα μετά την ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων
3. Υπολογίστε τα R_f των κηλίδων στα δείγμα μετά την ενζυμική υδρόλυση των υδατανθράκων

4. Σχολιάστε την σχετική θέση των υδατανθράκων στη πλάκα με βάση τις χημικές δομές των ενώσεων
5. Για κάθε υδατάνθρακα συγκρίνεται τα R_f της αρχικής ένωσης με τα R_f μετά την ενζυμική και χημική υδρόλυση;
6. Τι συμπέρασμα προκύπτει για το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού στους αρχικούς υδατάνθρακες

Παράρτημα 1

Μονάδες μεγεθών βάση του διεθνούς συστήματος (SI)

Μέγεθος	Μονάδα	Σύντμηση
Μήκος	Μέτρο	m
Μάζα	Κιλογραμμάριο	kg
Ποσότητα συστατικού	Γραμμομόριο	mol
Όγκος	Λίτρο	L
Χρόνος	Δευτερόλεπτο	s
Θερμοκρασία	Κέλβιν	K
Ένταση ρεύματος	Αμπέρ	A

Προθέματα μονάδων

Όνομα	Σύντμηση	Παράγοντας πολλαπλασιασμού
femto	f	10^{-15}
pico	p	10^{-12}
nano	n	10^{-9}
micro	μ	10^{-6}
milli	m	10^{-3}
centi	c	10^{-2}
deci	d	10^{-1}
deca	da	10
kilo	k	10^3
mega	M	10^6
giga	G	10^9

Παράρτημα 2 Αυτόματες πιπέτες

Υπάρχουν δυο βασικά είδη αυτόματων πιπετών οι πιπέτες σταθερού όγκου, οι οποίες μεταγγίζουν σταθερό και δεδομένο όγκο, και οι πιπέτες στις οποίες υπάρχει δυνατότητα ρύθμισης του όγκου. Στο κάτω μέρος της πιπέτας εφαρμόζεται ειδικό αναλώσιμο ακροφύσιο (tip). Οι ρυθμιζόμενες πιπέτες συνήθως χωρίζονται σε αυτές που μπορούν να μεταγγίσουν όγκους από 0,1–10 μL και χρησιμοποιούν τα λευκά ακροφύσια, σε αυτές που μπορούν να μεταγγίσουν όγκους από 10–100 μL και χρησιμοποιούν τα κίτρινα ακροφύσια και σε αυτές που μπορούν να μεταγγίσουν όγκους από 100–1000 μL και χρησιμοποιούν τα μπλε ακροφύσια. Η βασική αρχή λειτουργίας κάθε πιπέτας είναι ίδια. Το στέλεχος εφαρμογής πίεσης έχει δυο σκάλες πίεσης, πιέζοντας το στέλεχος εφαρμογής στην πρώτη σκάλα αναρροφάτε το επιθυμητό υγρό και στη συνέχεια πιέζοντας στη δεύτερη σκάλα πίεσης μεταγγίζουμε το υγρό στον επιθυμητό σωλήνα. Παρόλαυτα υπάρχουν διάφοροι τύποι πιπετών και κάθε φορά θα πρέπει ο χρήστης να βεβαιωθεί ότι έχει καταλάβει τη λειτουργία της.



Σχήμα 1. Βασικά σημεία μιας χαρακτηριστικής αυτόματης πιπέτας

Παράρτημα 3

Έκφραση της συγκέντρωσης διαλυμάτων

Ο συνηθέστερος τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης μιας ένωσης σε διάλυμα στη βιοχημεία είναι η μοριακότητα (M), που εκφράζει τον αριθμό των γραμμομορίων της διαλυμένης ουσίας σε ένα λίτρο διαλύματος (mol/L). Άλλος τρόπος έκφρασης είναι η % κατά βάρος περιεκτικότητα, που εκφράζει τα g της διαλυμένης ουσίας σε 100 mL διαλύματος (%κ.β.).

Πολύ συχνά στο πλαίσιο των εργαστηριακών ασκήσεων βιοχημείας είναι χρήσιμο να αραιώνουμε τα αρχικά διαλύματα και να θέλουμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση των αραιωμένων διαλυμάτων ή να θέλουμε να υπολογίσουμε τον όγκο που θα χρησιμοποιήσουμε από ένα αρχικό διάλυμα για να φτιάξουμε ένα πιο αραιό διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Οι υπολογισμοί αυτοί γίνονται με τον νόμο της αραιώσης:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

C₁: η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος

V₁: ο όγκος του αρχικού διαλύματος

C₂: η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος

V₂: ο όγκος του τελικού διαλύματος

Παράρτημα 4
Μοριακά βάρη πρωτεϊνών

Πρωτεΐνη	Μοριακό Βάρος (Da)
Φωσφορυλάση-β	97.400
Βόειος αλβουμίνη ορού (BSA)	65.400
Αιμοσφαιρίνη βόειος	64.500
Αλβουμίνη λευκώματος αυγού	45.000
Ανθρακική ανυδράση	31.000
Αναστολέας της θρυψίνης	21.500
Μυοσφαιρίνη καρδίας αλόγου	16.900
Λυσοζύμη λευκώματος αυγού	14.600
Κυτόχρωμα c	13.000

Παράρτημα 5
Οι σημαντικότεροι διαλύτες κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας

Διαλύτης	Σημείο ζέσεως σε ατμοσφαιρική πίεση (°C)	Πυκνότητα (g/cm ³)
Εξάνιο	69	0,660
Βενζόλιο	80	0,877
Διαιθυλαιθέρας	35	0,714
Βουτανόλη	118	0,810
Χλωροφόρμιο	62	1,483
Ακετόνη	56	0,790
Μεθανόλη	65	0,791
Αιθανόλη	79	0,789
Οξικό οξύ	118	1,049
Νερό	100	1,000