

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Χημική αναλυτική τεχνική
διαχωρισμού ουσιών από μίγμα τους

*Είναι ένα σύνολο μεθόδων που επιτρέπει το **διαχωρισμό ενός μίγματος στα συστατικά του** τα οποία είναι δυνατόν να συνδέονται στενά μεταξύ τους.*

Ανακαλύφθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903)

Προσπάθησε να διαχωρίσει χρωστικές

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

- Εφαρμογές στη Χημεία και Άλλες Επιστήμες:
Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Επιστήμη Περιβάλλοντος,
Επιστήμη Τροφίμων, Γεωπονία
- Συνεχής βελτίωση των τεχνικών
- Σήμερα αποτελεί την καλύτερη τεχνική:
 - Διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μειγμάτων
 - Απομόνωσης ευπαθών ουσιών (έγχρωμων και άχρωμων)

ΣΚΟΠΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Αναλυτικός

Προσδιορισμός της
χημικής σύστασης
ενός δείγματος

Παρασκευαστικός

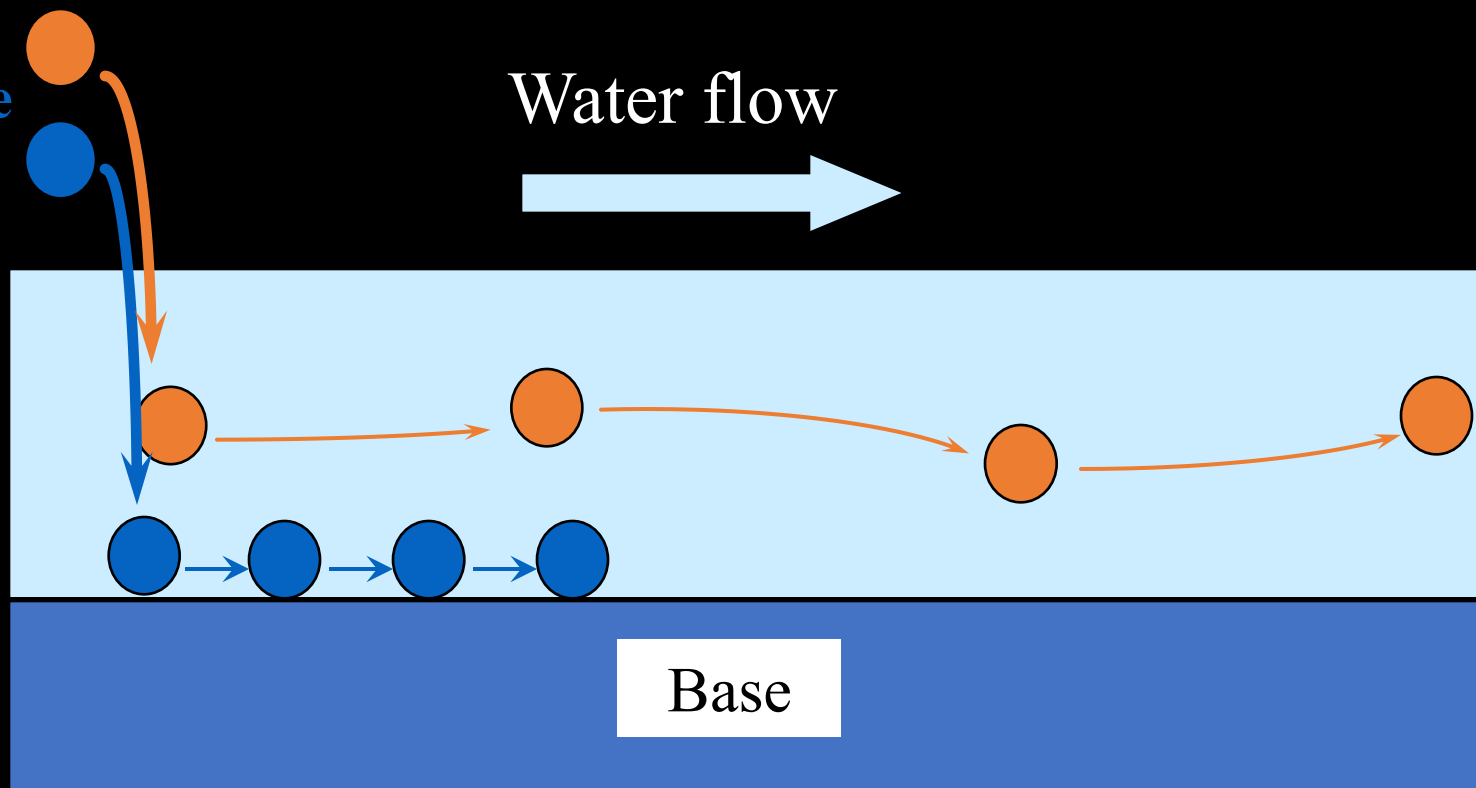
Απομόνωση επαρκών
ποσοτήτων συγκεκριμένου
δείγματος

- Τα συστατικά ενός μείγματος μεταφέρονται διαμέσου μιας στατικής φάσης με τη βοήθεια της ροής μίας κινητής φάσης.
- Διαχωρισμός συστατικών: βασίζεται στο **διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης** του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις.
- Ο διαφορετικός βαθμός αλληλεπίδρασης: οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του δείγματος π.χ. το μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα κλπ.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΙΑΖΕΙ ΜΕ ΤΗ ΡΟΗ ΕΝΟΣ ΠΟΤΑΜΟΥ!

Light leaf

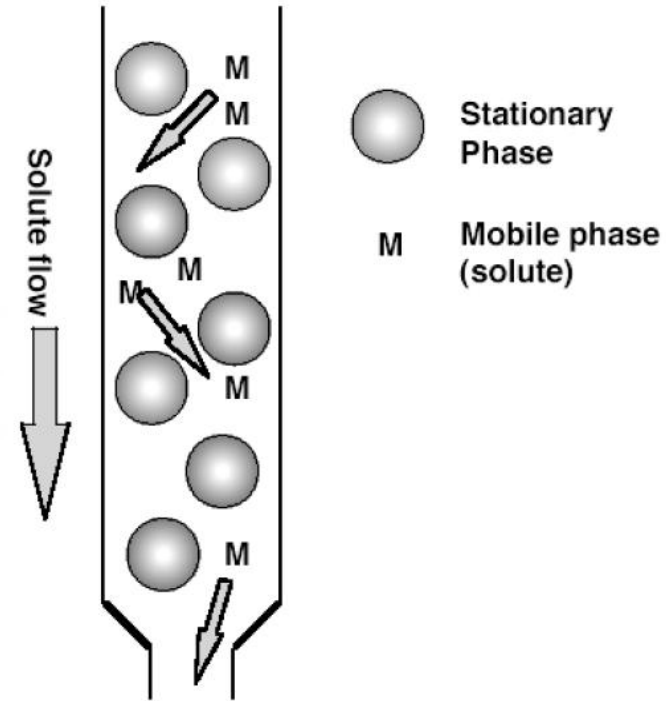
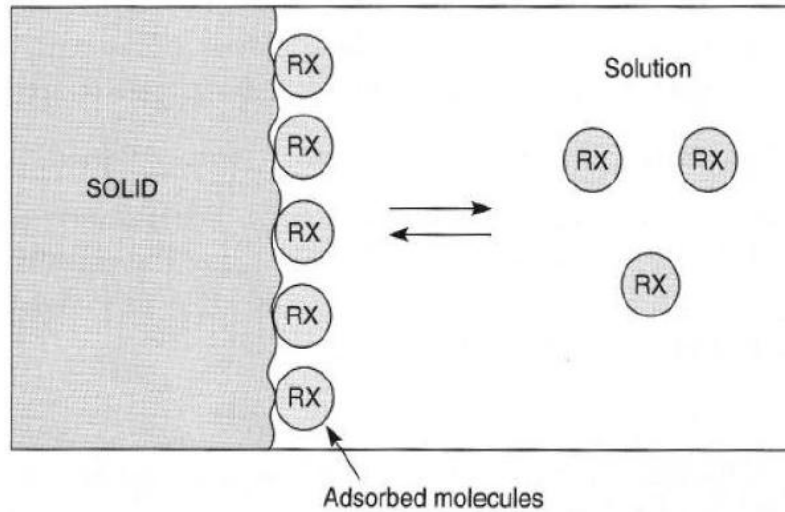
Heavy stone



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας **κινούμενης** και μια **στατικής** φάσης.

Διαχωρίζει ενώσεις με βάση την προσρόφηση τους στην επιφάνεια μη τροποποιημένων σωματιδίων



ΑΡΧΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

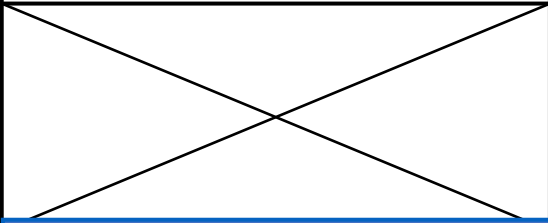
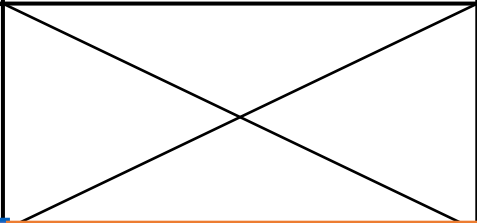


Διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική μετακίνηση των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μιας ακίνητης φάσης.

□ **Στατική (ακίνητη) φάση** μπορεί να είναι στερεή ή υγρή (ένα στερεό ή μια πηκτή).

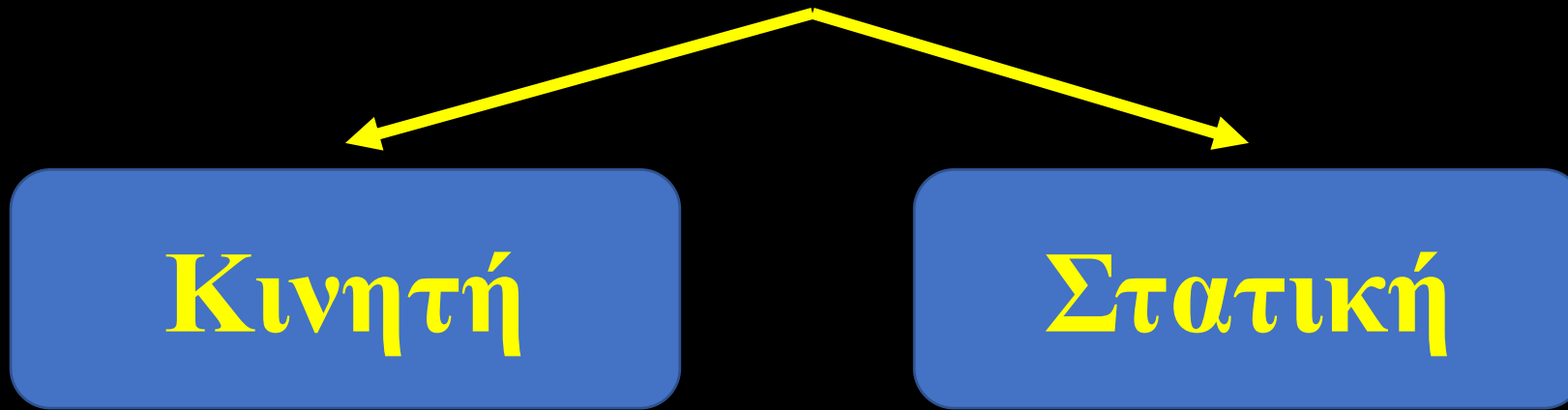
□ **Κινητή φάση** μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και ρέει δια μέσου της στατικής φάσης, μεταφέροντας και διαχωρίζοντας τα διάφορα συστατικά ενός μίγματος .

ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Κατάσταση της ύλης της κινητής και στατικής φάσης

		Κινητή φάση	
		Αέρια	Υγρή
Στατική Φάση			
	Υγρή	 <p>Αέριος Χρωματογραφία</p>	 <p>Υγρή χρωματογραφία</p>
	Στερεά		

ΦΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ



- Τα συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους - Εξέρχονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές
- Εφόσον στην έξοδο υπάρχει **σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού** => ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό

ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ – ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1. Δεν θα πρέπει να αντιδρά με τον διαλύτη έκλουσης ή με τα συστατικά του μίγματος που θα διαχωρισθεί,
2. Θα πρέπει να είναι σε σταθερή μορφή και τυποποιημένο για να έχουμε επαναλήψιμα αποτελέσματα.
3. Το μέγεθος των σωματιδίων - κόκκων πρέπει να είναι κατάλληλο

Συνήθως χρησιμοποιούνται **silica (SiO₂)**, **alumina (Al₂O₃)**,

Αλουμίνα (Al₂O₃)

Ενεργοποιημένος άνθρακας

Florisil (μίγμα SiO₂, MgO και Na₂SO₄)

Silica Gel (SiO₂)

Μαγνησία (MgO)

Ανθρακικό μαγνήσιο (MgCO₃)

Ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃)

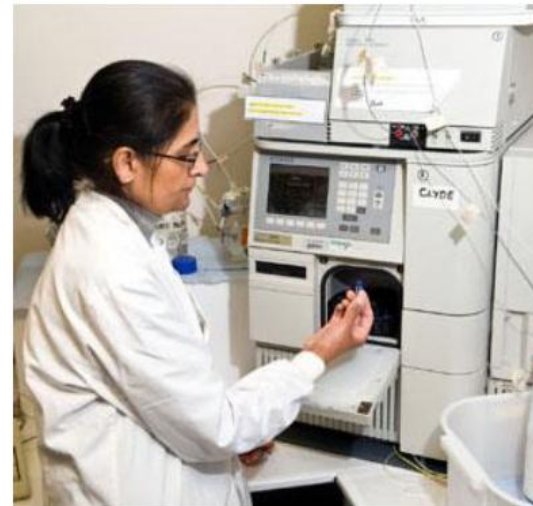
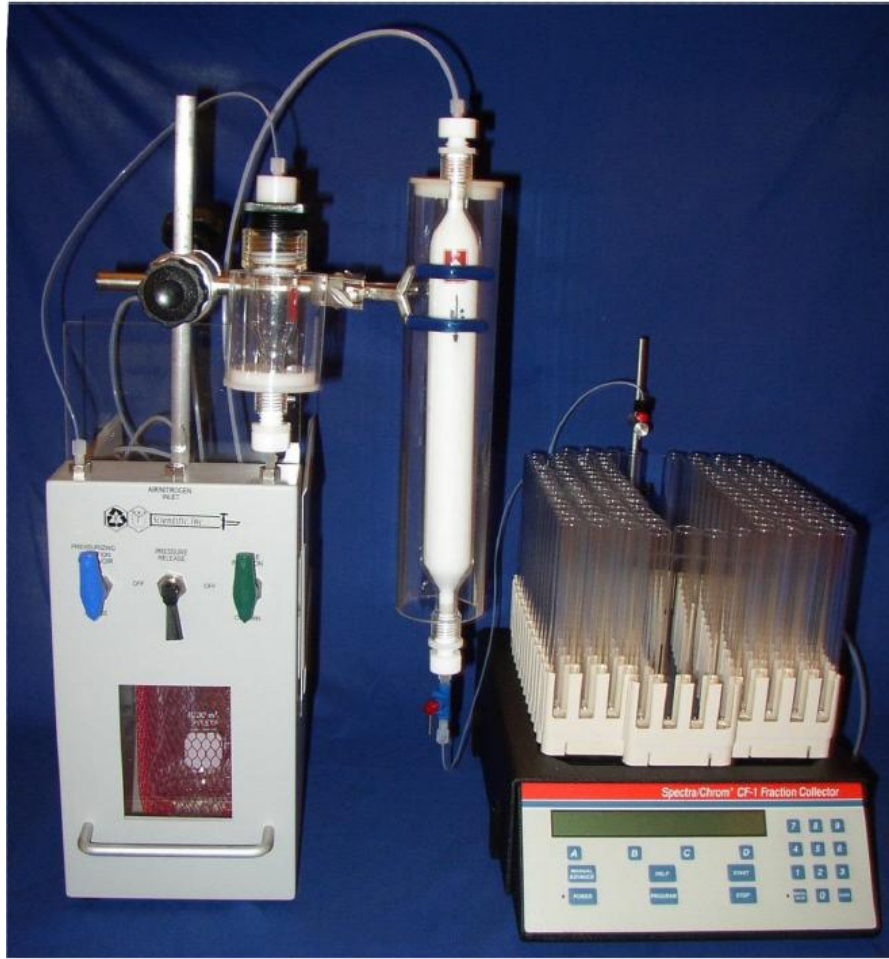
Ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃)

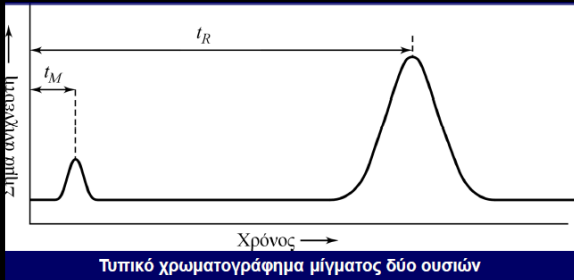
Τάλκης (MgO, SiO₂)

Ζάχαρη (C₁₂H₂₂O₁₁)

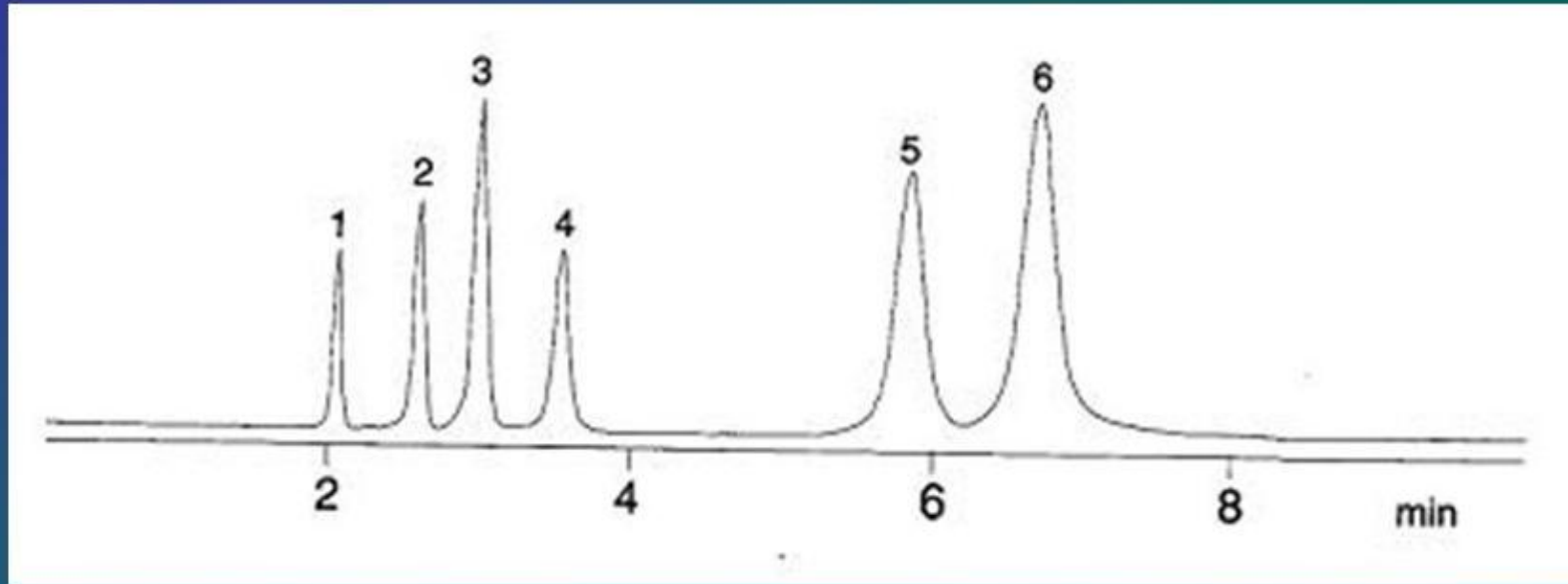
Κυτταρίνη







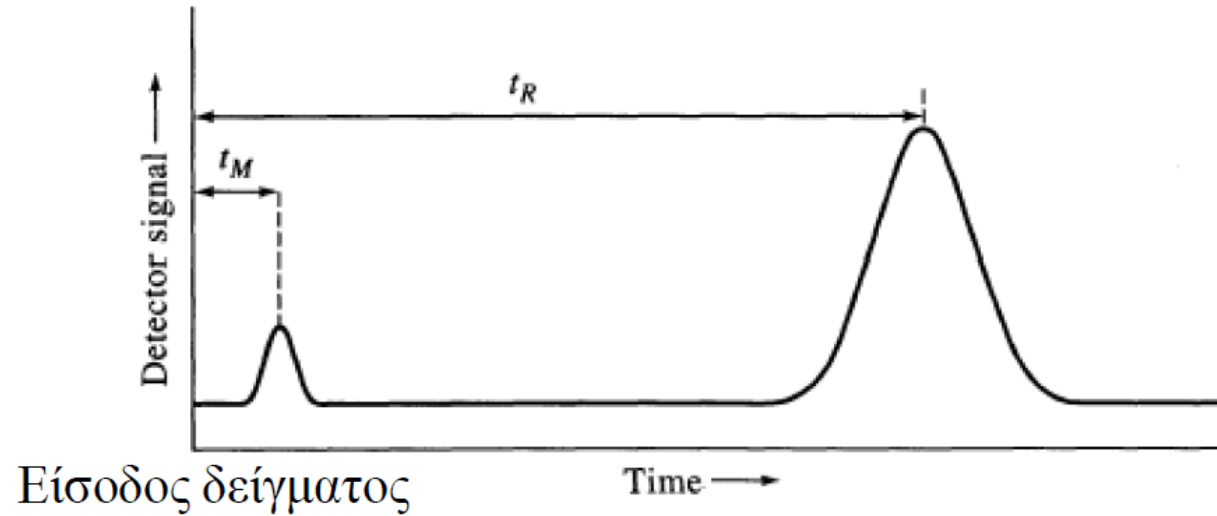
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ



**ΙΔΑΝΙΚΑ ΚΑΘΕ ΚΟΡΥΦΗ (1-6)
ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΕ ΕΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ**

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Χρωματογράφημα - Συγκέντρωση στον χρόνο



Όπου:

t_R = Χρόνος κατακράτησης,

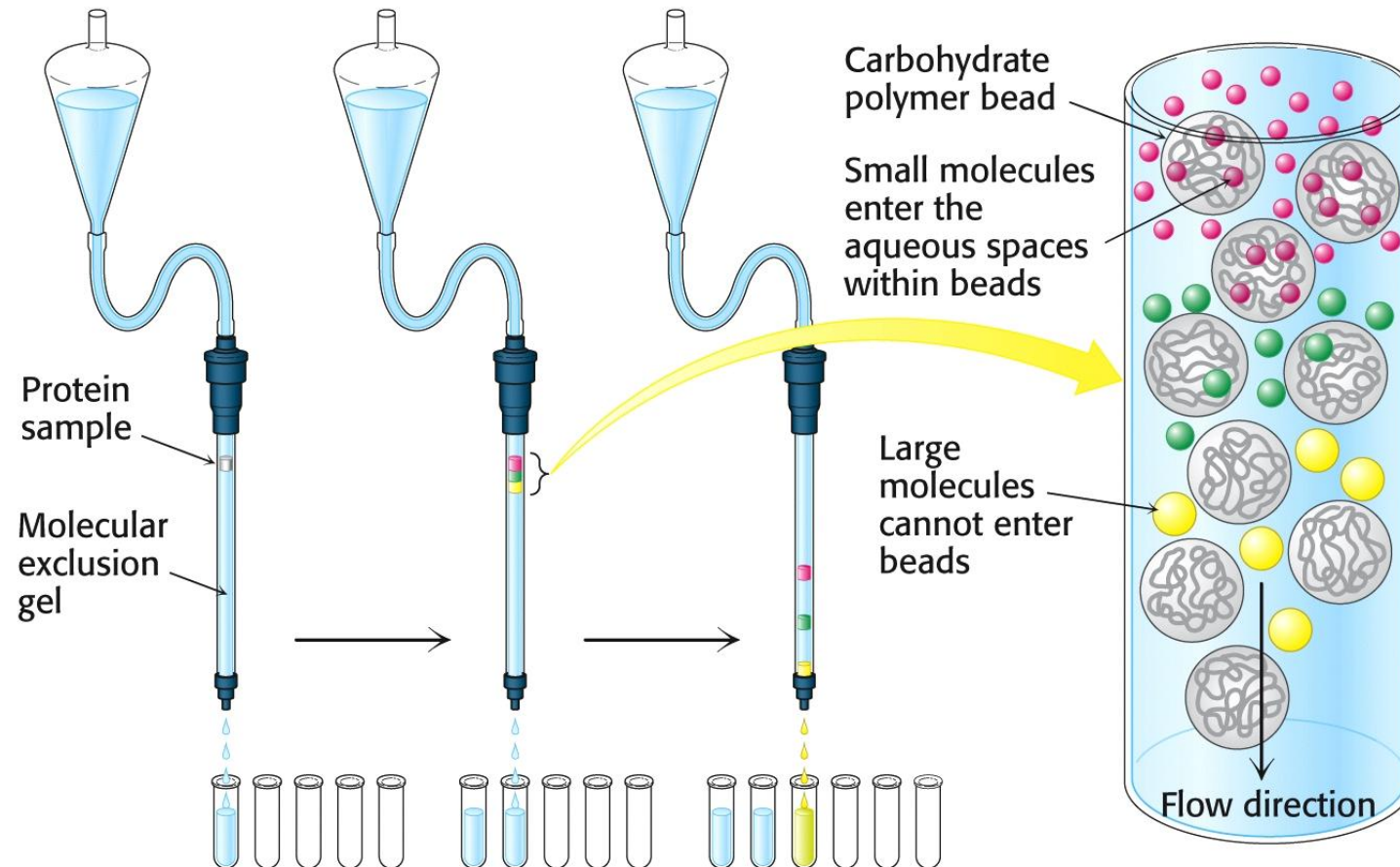
t_M = Νεκρός χρόνος και

$k' = (t_R - t_M)/t_M$ παράγων χωρητικότητας

Όταν το k' παίρνει τις τιμές από 2-10, ο διαχωρισμός είναι βέλτιστος

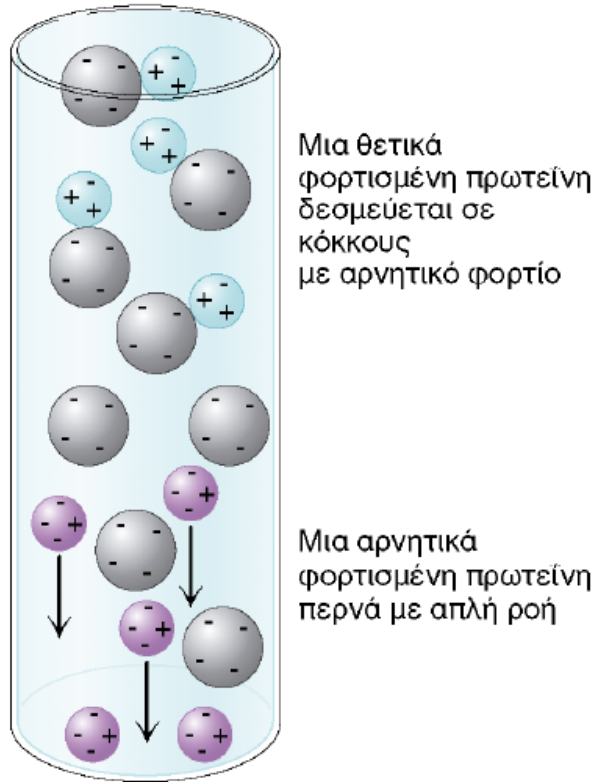
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΗ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΑΓΗΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΦΟΡΤΙΟ



ΕΙΚΟΝΑ 4.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του καθαρού φορτίου τους.

Θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένες ομάδες της στήλης

Όσο πιο πολλά θετικά φορτία έχουν
Τόσο πιο ισχυρά προσδένονται

Προσθήκη άλατος σε ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης

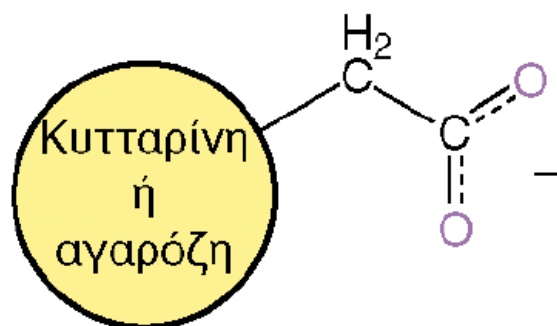


Συναγωνισμός θετικών φορτίων άλατος με τα θετικά φορτία της στήλης

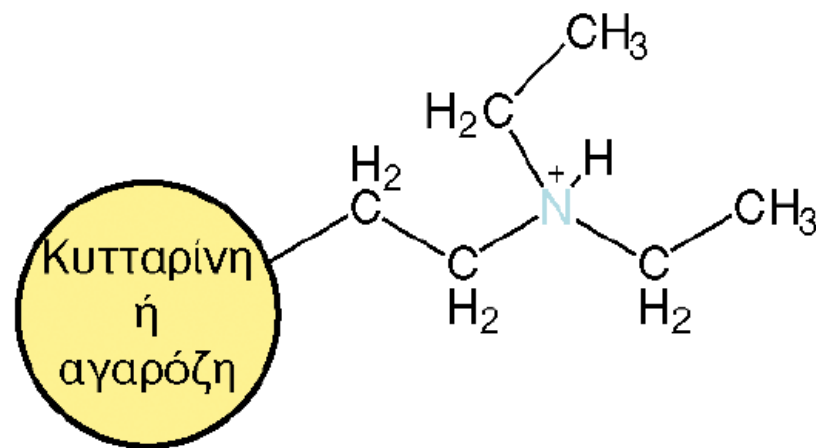


Απομάκρυνση της πρωτεΐνης από τη στήλη και απομόνωσή της

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΑΓΗΣ



Καρβοξυμεθυλική
(CM) ομάδα
(ιοντισμένη μορφή)



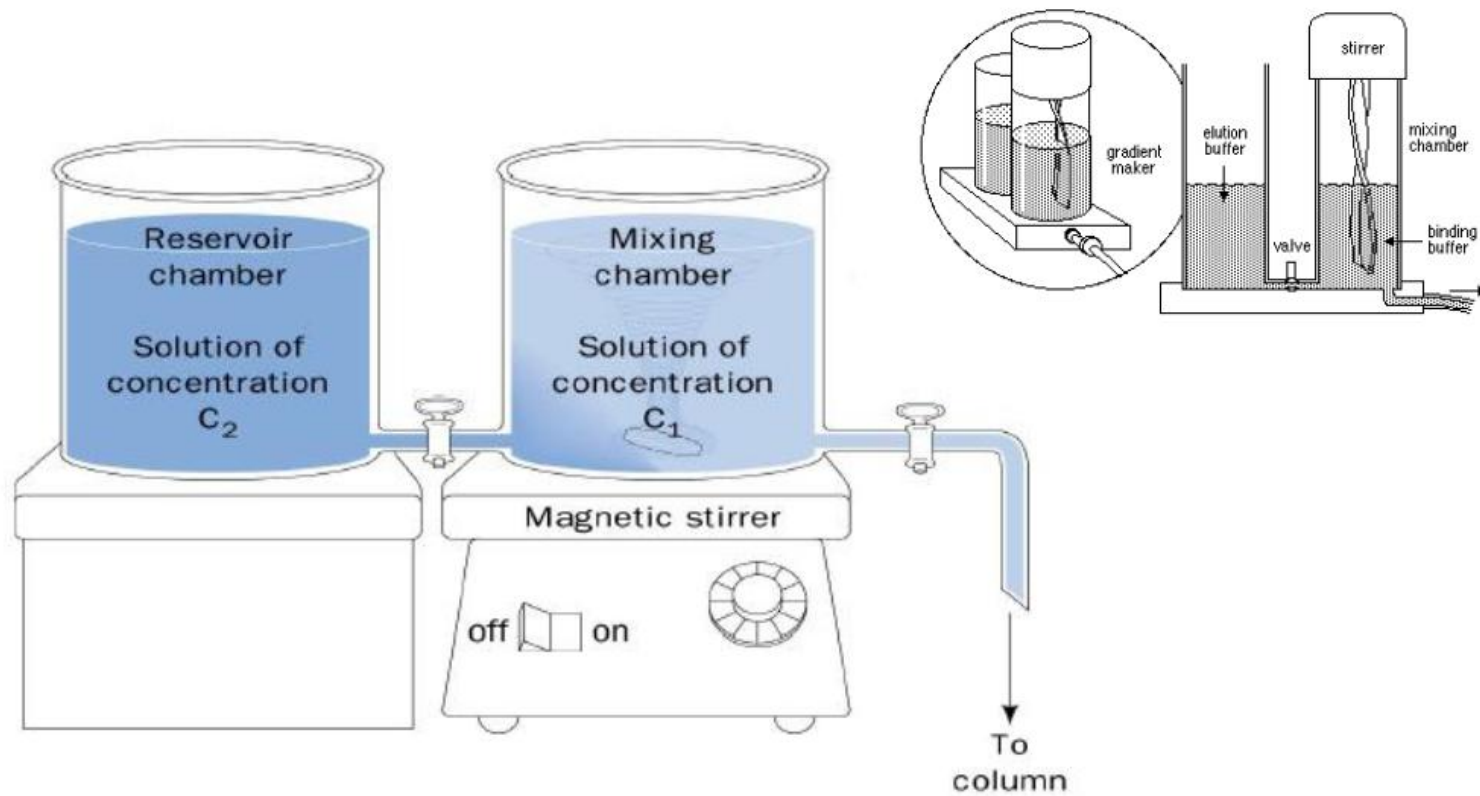
Διαιθυλο-αμινοαιθυλική
(DEAE) ομάδα
(πρωτονιωμένη μορφή)

ΚΑΤΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΤΗΛΗ

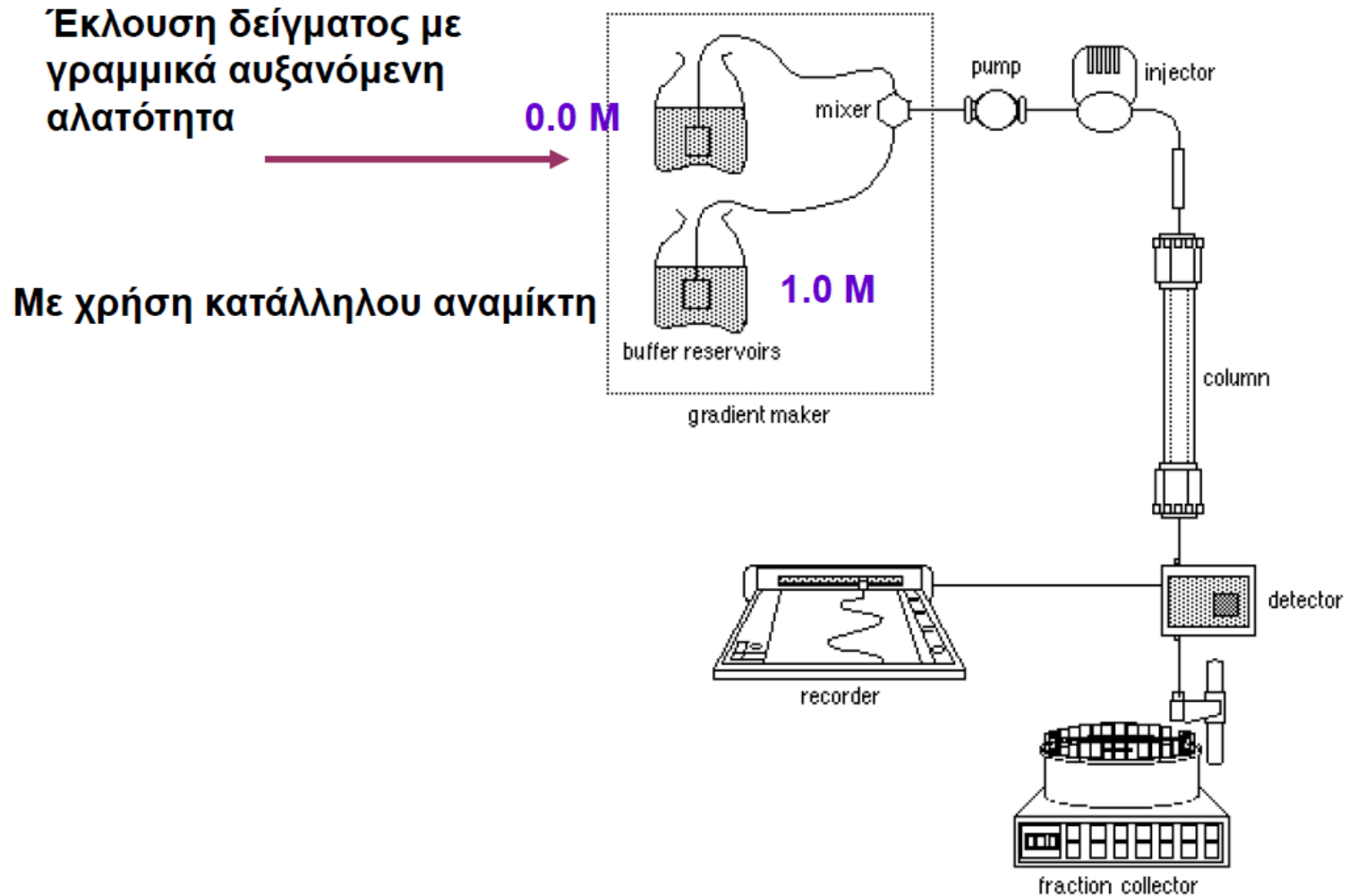
ΑΝΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΤΗΛΗ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

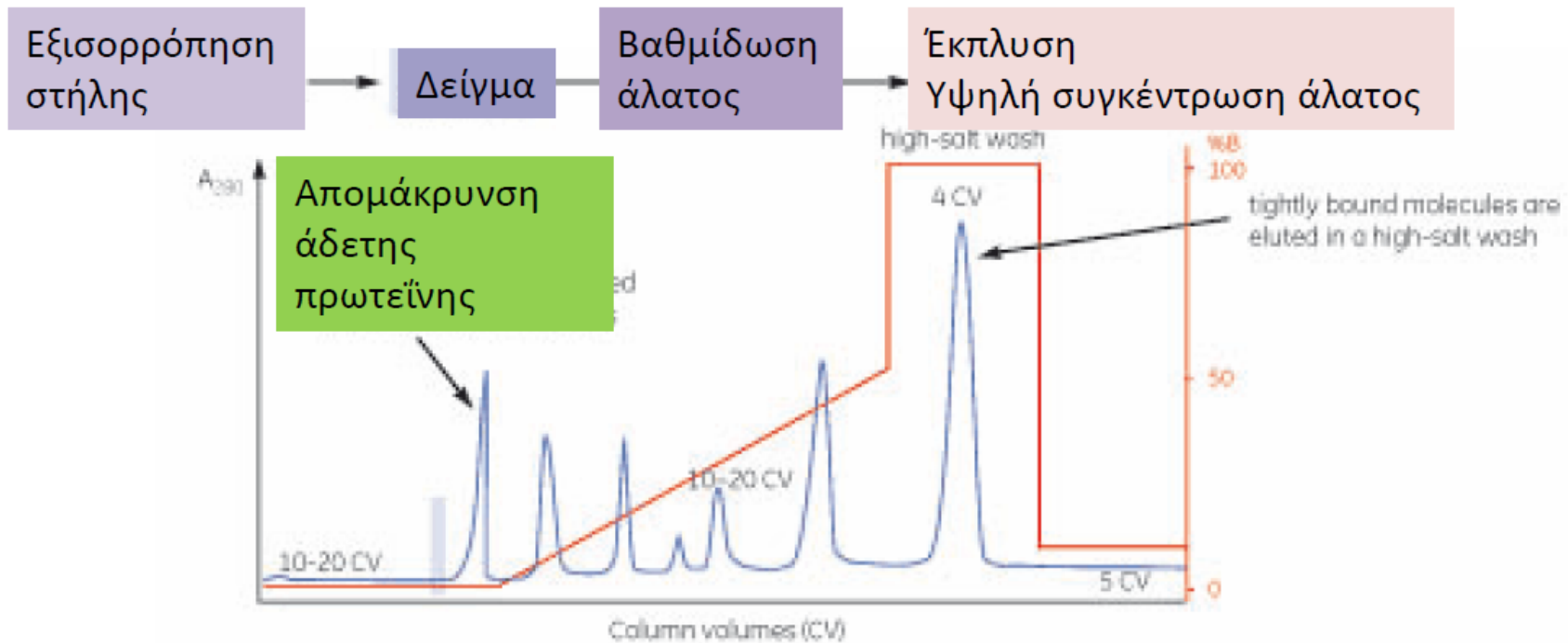
Μηχάνημα δημιουργίας μίγματος γραμμικά αυξανόμενης αλατότητας



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΓΙΑ ΕΙΔΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

ΑΝΤΙΓΟΝΟ – ΑΝΤΙΣΩΜΑ

ΕΝΖΥΜΟ – ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

ΟΡΜΟΝΗ - ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ - DNA

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

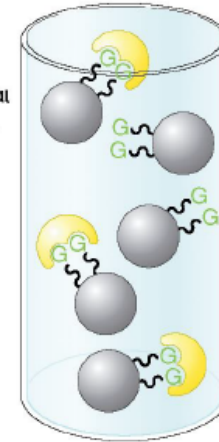
Ομοιοπολική σύνδεση παράγοντα X στη στήλη

Προσθήκη μίγματος πρωτεϊνών στη στήλη

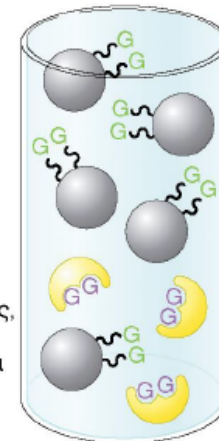
Έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες

Έκλυση της προσδεδεμένης πρωτεΐνης με υψηλή συγκέντρωση διαλυτής μορφής X ή υψηλή συγκέντρωση άλατος

Μια πρωτεΐνη που δεσμεύει γλυκόζη συνδέεται στην ομοιοπολικά συνδεδεμένη γλυκόζη (G) των κόκκων



Προσθήκη γλυκόζης (G)

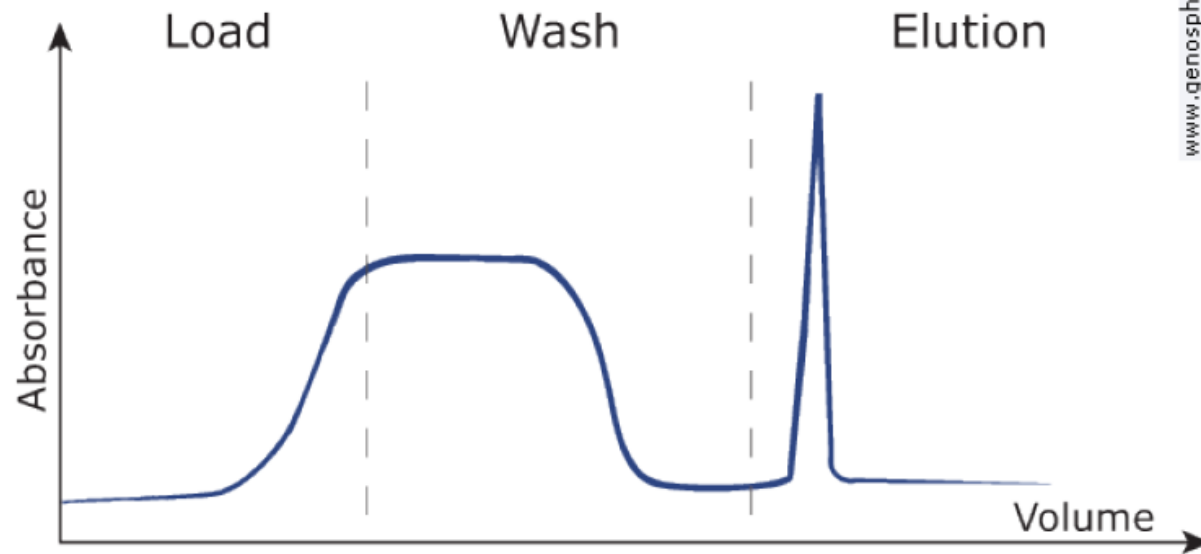


Προσθέτοντας διάλυμα γλυκόζης, η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από τη στερεά φάση

ΕΙΚΟΝΑ 4.5 Χρωματογραφία συγγένειας. Στο παράδειγμα η κοκκιναβαλίνη A (που φαίνεται κί-

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

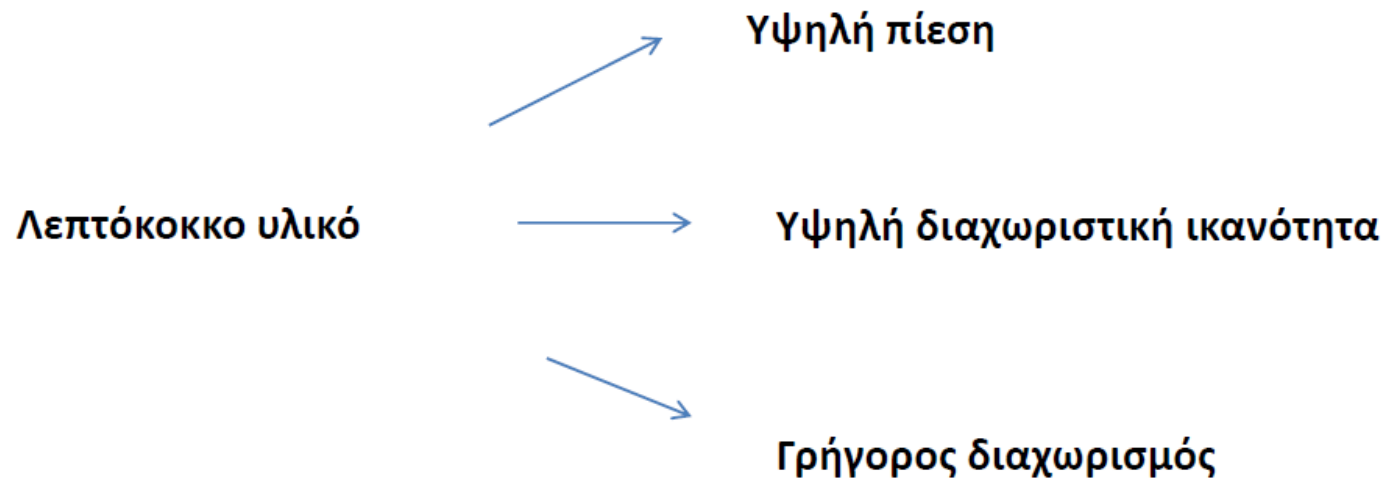
Affinity Chromatography Profile



ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

High pressure Liquid Chromatography

Χρωματογραφία υψηλής διαχωριστικής ικανότητας
Και υψηλής πίεσης



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ

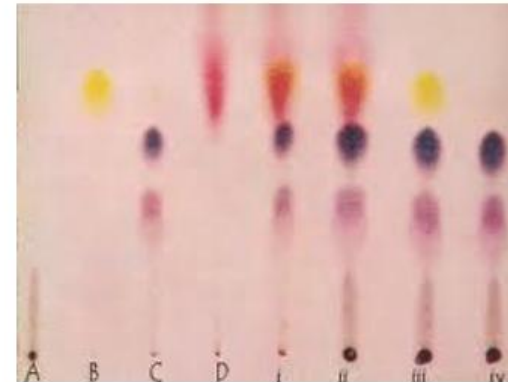
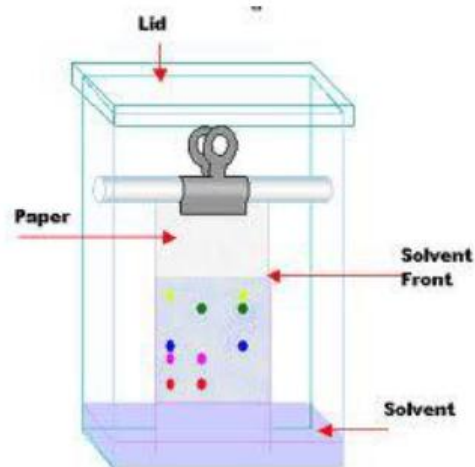
Τοποθέτηση μίας μικρής κηλίδας (σταγόνας) του προς εξέταση δείγματος πάνω σε μία λωρίδα χρωματογραφικού χάρτου κυτταρίνης ή οποία φέρει πολικές ομάδες.

Τοποθέτηση του χάρτου σε ένα δοχείο με μικρή ποσότητα υγρού στη βάση του. Το δοχείο διατηρείται κλειστό κατά την εκτέλεση της χρωματογραφίας.

Καθώς το υγρό ανεβαίνει κατά μήκος του χάρτου συναντά το προς εξέταση δείγμα το οποίο αρχίζει να κινείται μαζί με το υγρό.

Τα μη πολικά συστατικά του δείγματος μετακινούνται πιο γρήγορα.

Τα πολικά μόρια προσδένονται στην κυτταρίνη και δεν μετακινούνται γρήγορα



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ 2: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ

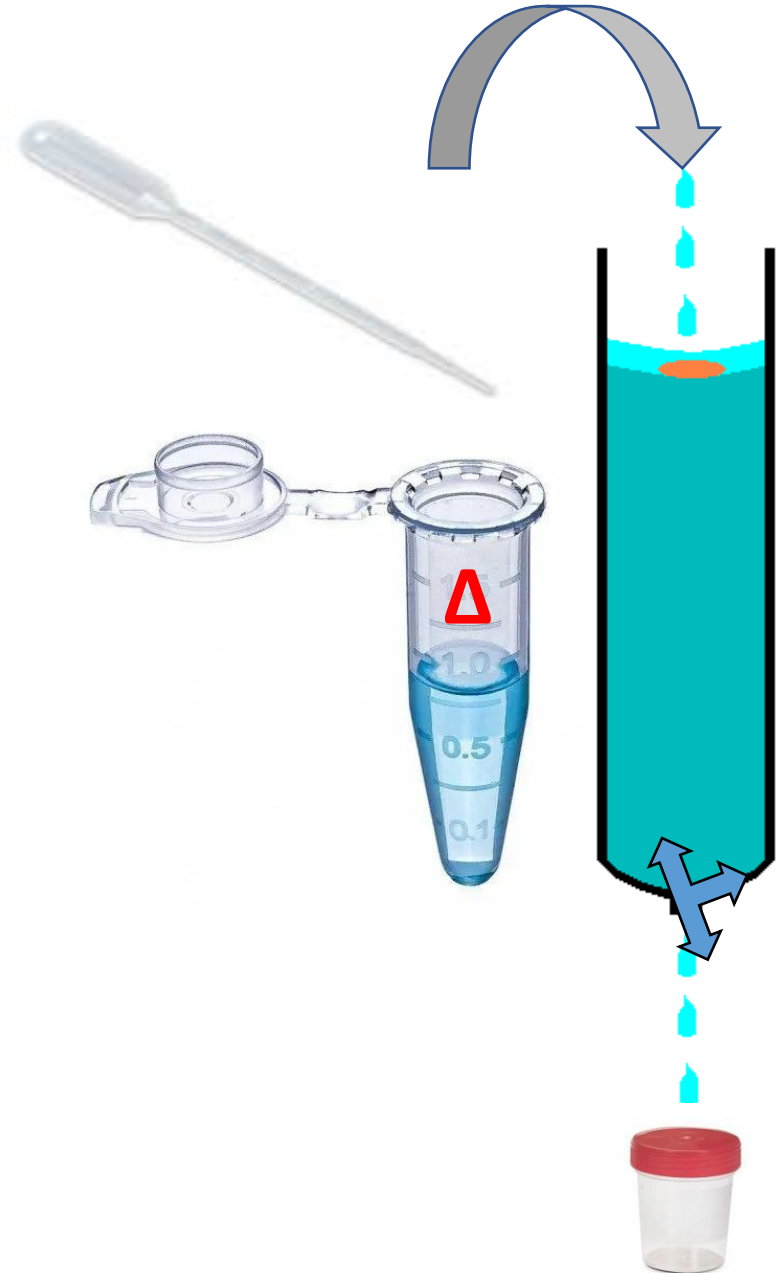
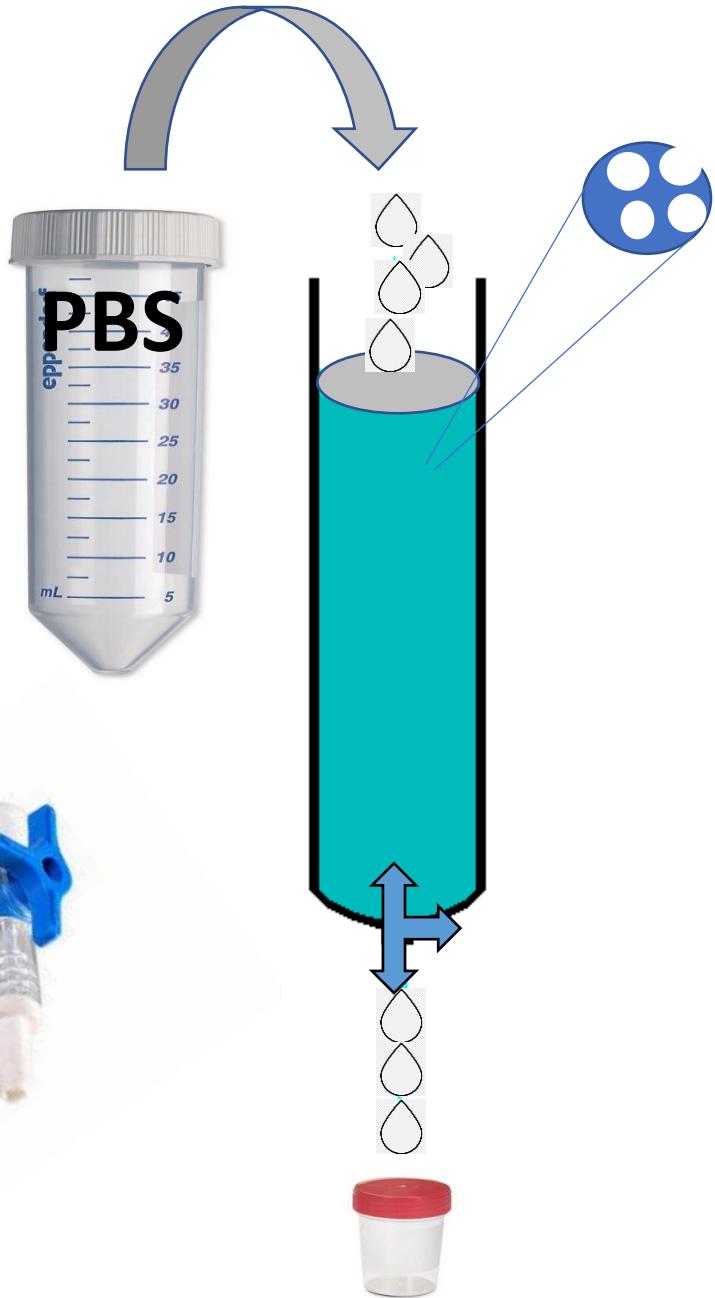
A. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ

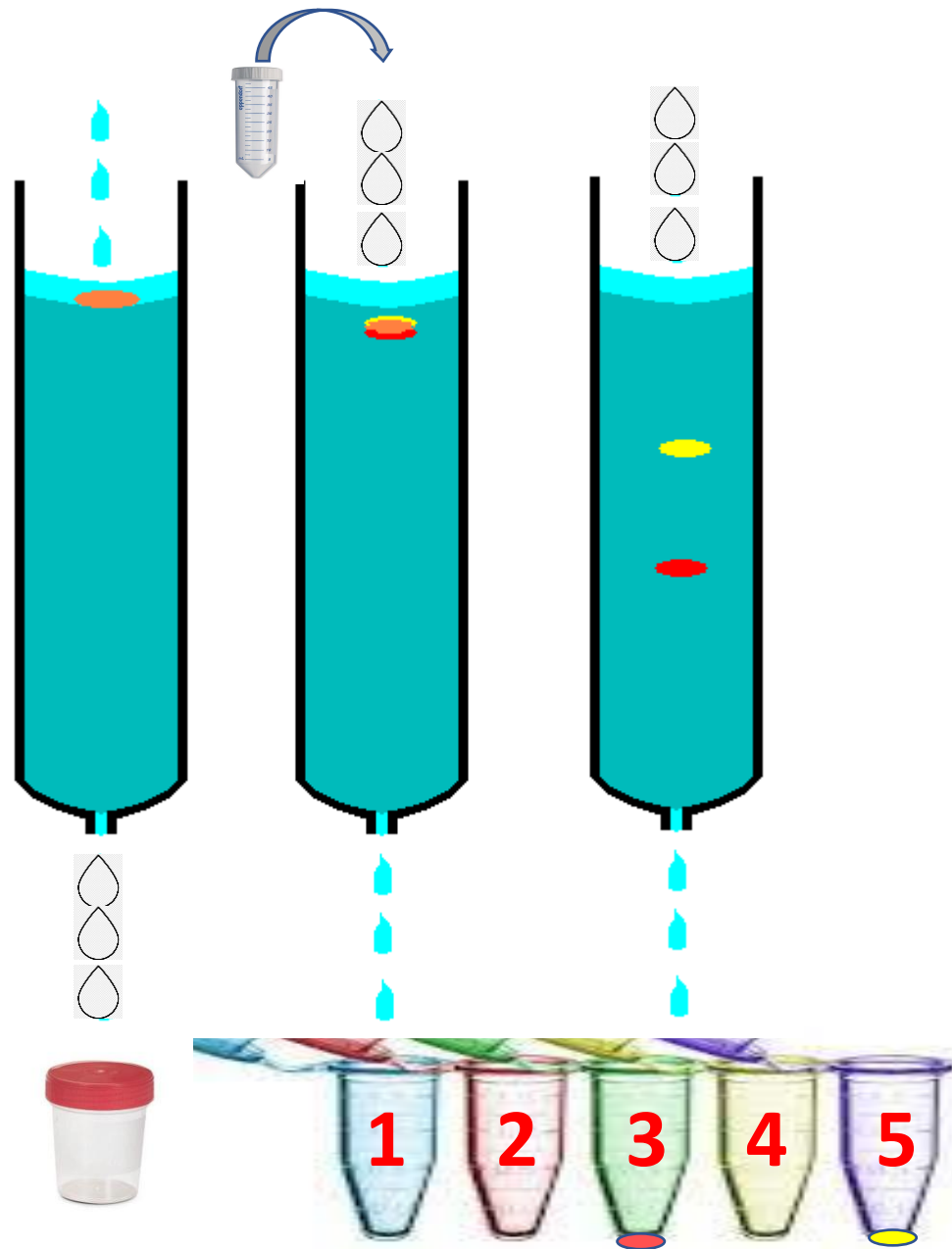
1. Πλένετε τη στήλη με το υλικό Sephadex G50 με PBS (2-3 όγκους στήλης~15 ml).
2. Ετοιμάζετε μια σειρά από δοκιμαστικούς σωλήνες τους οποίους και αριθμείτε (1→5).
3. Αφήνετε το διάλυμα να περάσει μέσα από την στήλη μέχρις ότου μείνει μια ελάχιστη ποσότητα στο πάνω μέρος της στήλης
4. Διακόπτετε τη ροή της στήλης (γυρίζουμε τη στρόφιγγα) και προσθέτετε προσεκτικά το δείγμα σας (Δ) που περιέχει τις υπό διαχωρισμό πρωτεΐνες σε PBS, ώστε να μην αναταραχθεί η επιφάνεια της στήλης.
5. Ανοίγετε τη στρόφιγγα και αφήνετε αργά-αργά να περάσει το διάλυμά μας μέσα στη στήλη.
6. Συλλέγετε κλάσματα του ίδιου όγκου (1 ml) στους σωλήνες.
7. *Μετά την έκλουση της στήλης και τη συλλογή των κλασμάτων τοποθετείτε στη στήλη διάλυμα 1M NaCl σε PBS για να ξεπλυθεί.*
8. Ακολουθεί **φωτομέτρηση** (μέρος B) για τον εντοπισμό των κλασμάτων-σωλήνων στους οποίους έχουν εκλουσθεί τα μόρια.

Προσοχή!



Πάντα
αφήνω υγρό
πάνω από τα
σφαιρίδια!!!





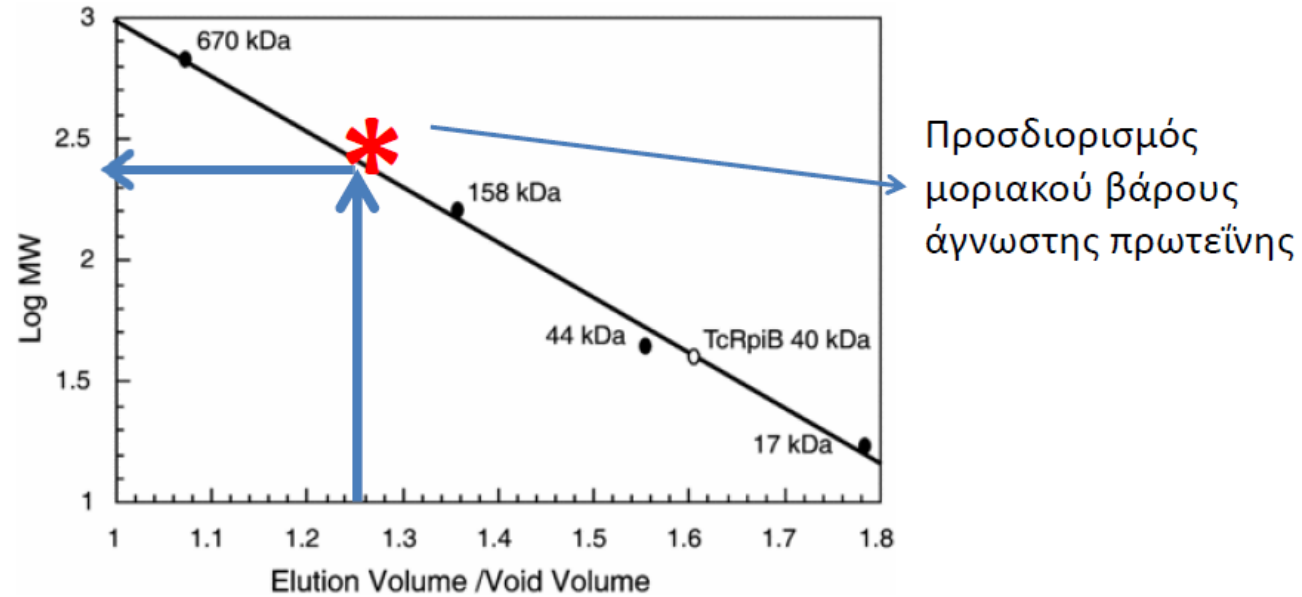
Β. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΛΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

1. Ανοίξτε το όργανο από τον διακόπτη παροχής τάσης (**ON/OFF**).
2. Επιλέξτε το επιθυμητό μήκος κύματος **280 nm** και μηδενίστε με το τυφλό (διάλυμα **PBS-ΓΙΑΤΙ???**).
3. Μετρήστε την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων
4. Εισάγουμε τα άγνωστα δείγματα και καταγράφουμε τις ενδείξεις του φωτόμετρου.

ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ! BSA

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΚΆΘΕ +ΔΕΙΓΜΑ!

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ



Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους χρωματογραφούνται με χρήση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

Καταγράφεται ο χρόνος και όγκος έκλουσης

Ο λογάριθμος των μοριακών βαρών είναι ανάλογος του όγκου έκλουσης / τον κενό όγκο.

Προσδιορισμός μοριακού βάρους άγνωστης πρωτεΐνης