



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

5^η Εργαστηριακή Άσκηση: Χρωματογραφία TLC

ΓΑΛΑΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ (ΧΗΜΙΚΟΣ PhD, Ε.ΔΙ.Π.) - ΔΙΟΝΥΣΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑ (ΒΙΟΛΟΓΟΣ PhD, Ε.ΔΙ.Π.)

The background features a vibrant, abstract composition of colorful splatters and dots in shades of cyan, blue, green, and purple. A dark grey horizontal bar spans across the middle of the image, containing the text. A thin green line is positioned below the text within the dark bar.

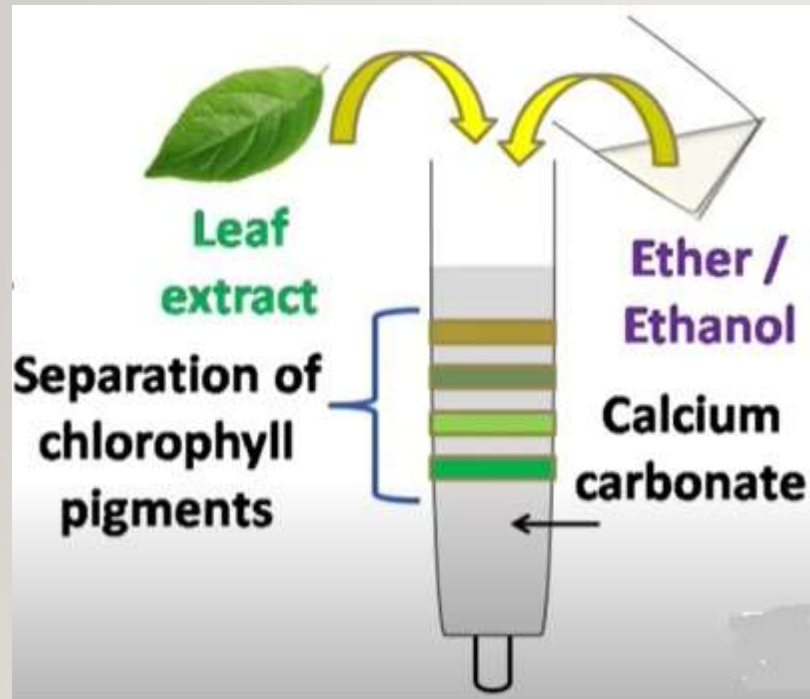
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ομάδα εργαστηριακών τεχνικών ανάλυσης που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον διαχωρισμό μείγματος χημικών ουσιών στα επιμέρους συστατικά του, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να αναλυθούν διεξοδικά.

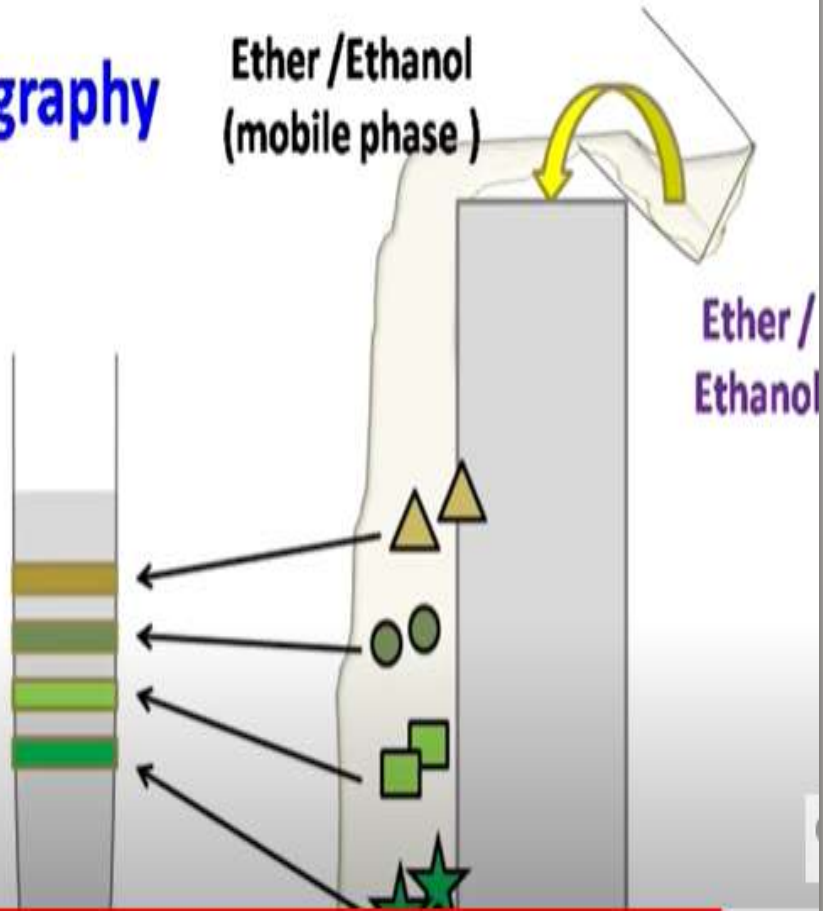
Υπάρχουν πολλές τεχνικές χρωματογραφίας π.χ. υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, χρωματογραφία ιονανταλλαγής, χρωματογραφία συγγένειας και άλλες. Όλες στηρίζονται στις ίδιες βασικές αρχές.

M.S. Tswett χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τη χρωματογραφία για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές



Chromatography

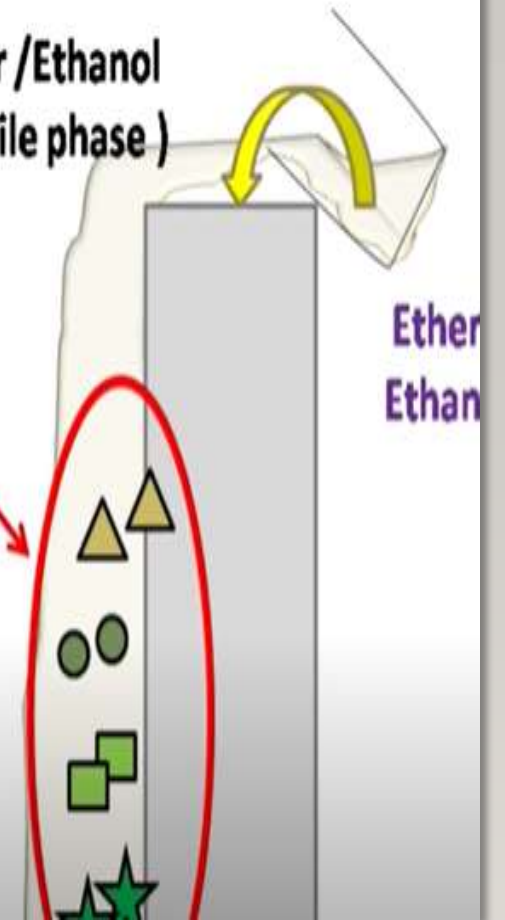
Ether / Ethanol
(mobile phase)



Chromatography

Ether / Ethanol
(mobile phase)

Separation occurs due to **differential partitioning** between the mobile and stationary phases



- Μεγάλη ποικιλία χρωματογραφικών μεθόδων είναι διαθέσιμη για το διαχωρισμό των αμινοξέων και άλλων βιολογικών μορίων και μακρομορίων.
- Όλες βασίζονται:
 - σε διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες, (ιδιαίτερα ιοντισμού και διαλυτότητας),
 - σε διαφορές στις ιδιότητες κατανομής (partition), (τάση να σχετίζονται με ένα διαλύτη ή φάση σε σχέση με άλλα),
 - σε διαχωρισμούς βάσει του ηλεκτρικού φορτίου (electrical charge).

Τα μόρια που πρόκειται να διαχωριστούν ρέουν μέσω «οχήματος», στο οποίο υπάρχουν δύο φάσεις.

Η μια φάση είναι ακίνητη και καλείται στατική και η άλλη ρέει και καλείται κινητή.

Οι δύο φάσεις είναι είτε στερεού-υγρού είτε υγρού-υγρού είτε αερίου-υγρού.

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΟΥΣΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ

Οι προς ανάλυση ουσίες, κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.

Όσες κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά, ενώ όσες συγκρατούνται ασθενέστερα κινούνται ταχύτερα.

Η μια φάση είναι πολική (υδρόφιλη) και η άλλη μη πολική (λιπόφιλη), οπότε τα προς ανάλυση συστατικά ανάλογα με την πολικότητά τους συγκρατούνται ισχυρότερα με τη μια ή την άλλη φάση.

Χρωματογραφία χάρτου (Paper chromatography CP)

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin layer Chromatography TLC)

Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography CC)

Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)

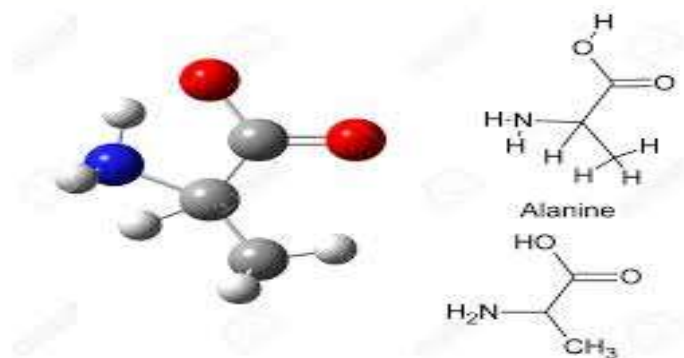
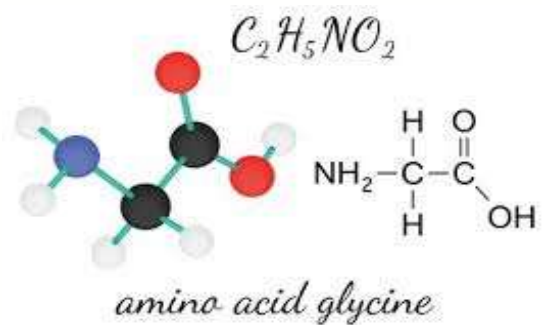
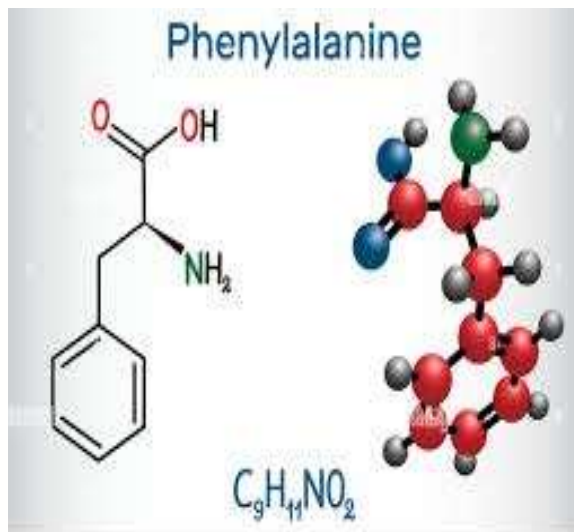
Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)

Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography GC)

Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography HPLC)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορεί να κατατάσσονται με βάση:

- ✓ Τη φύση της κινητής φάσης ή της στατικής φάσης
 - ❖ κινητή φάση (υγρή ή αέρια)
 - ❖ στατική φάση (στερεό ή υγρό επάνω σε στερεό υπόστρωμα)
- ✓ Το μηχανισμό διαχωρισμού
 - ❖ προσρόφηση
 - ❖ ιονανταλλαγή
 - ❖ κατανομή
 - ❖ μέγεθος μορίων
- ✓ Το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση
 - ❖ στήλη
 - ❖ χαρτί
 - ❖ λεπτή στιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα



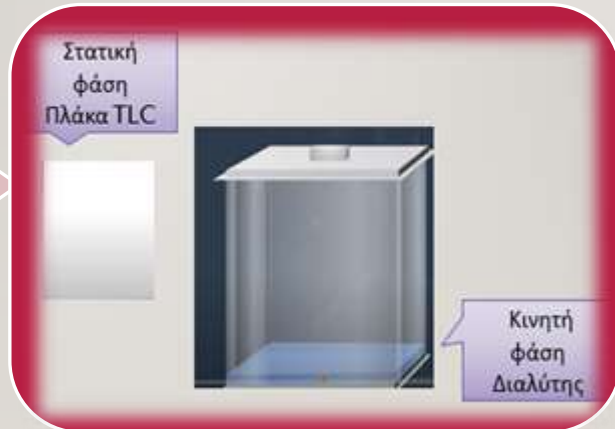
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ -
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΜΕ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ TLC

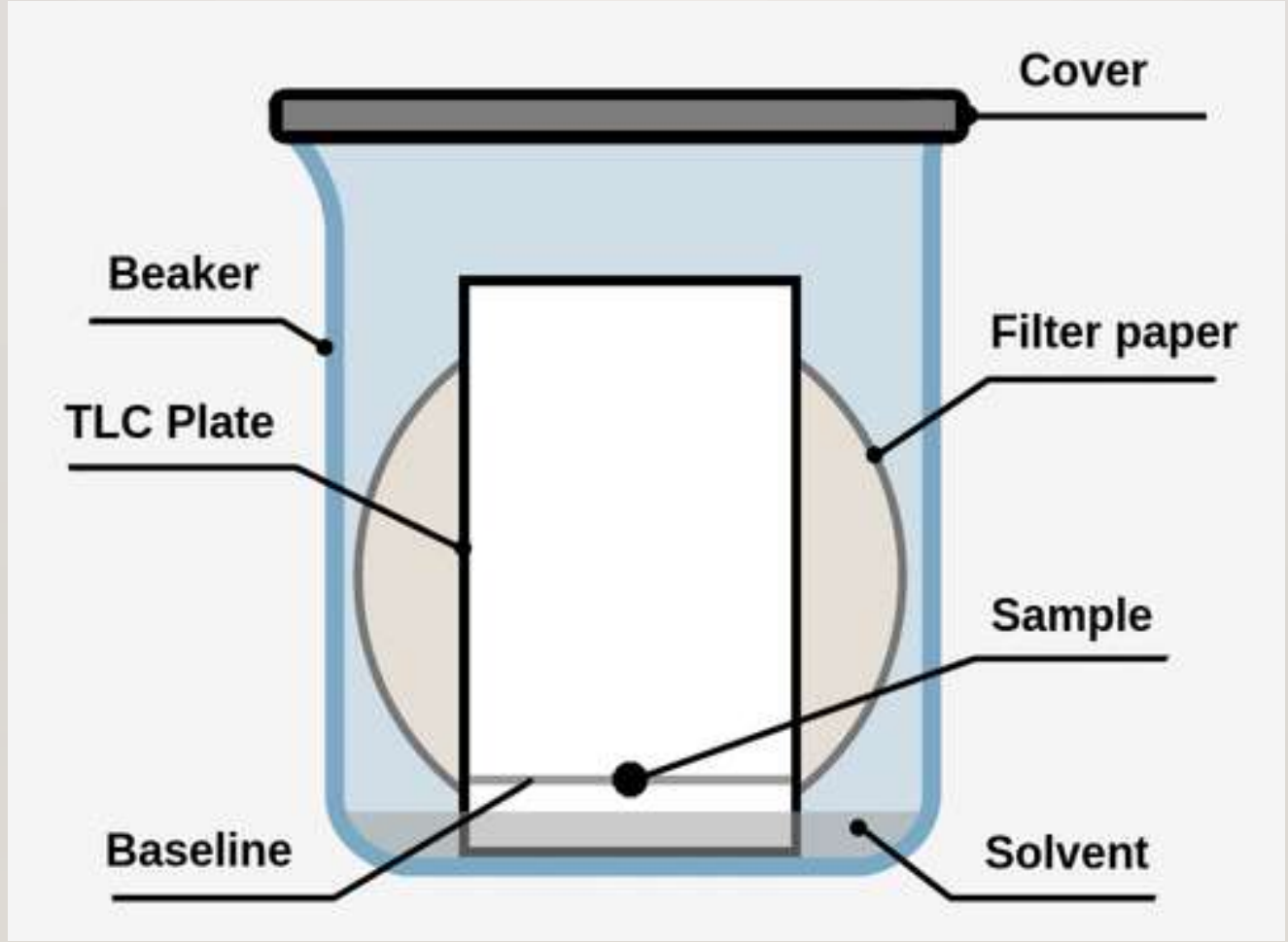
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

TLC

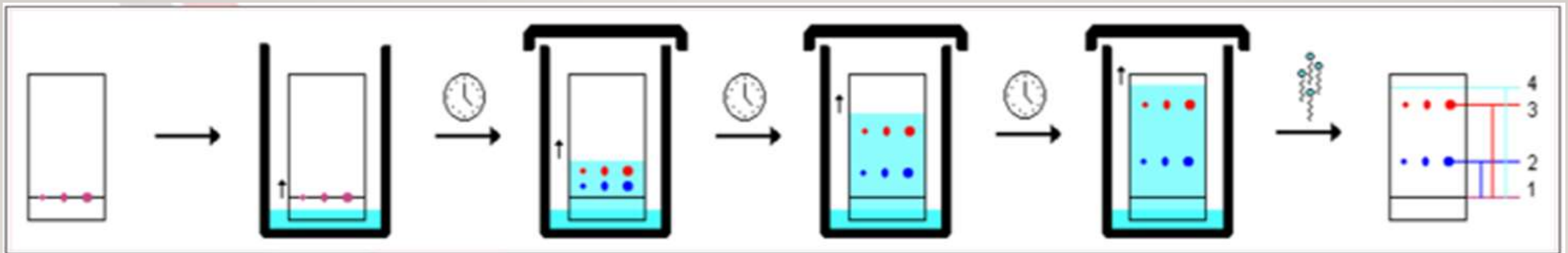
- Ταχεία ποιοτική ανάλυση
- Προσδιορισμός καθαρότητας
- Ανίχνευση ειδικών κατηγοριών ουσιών



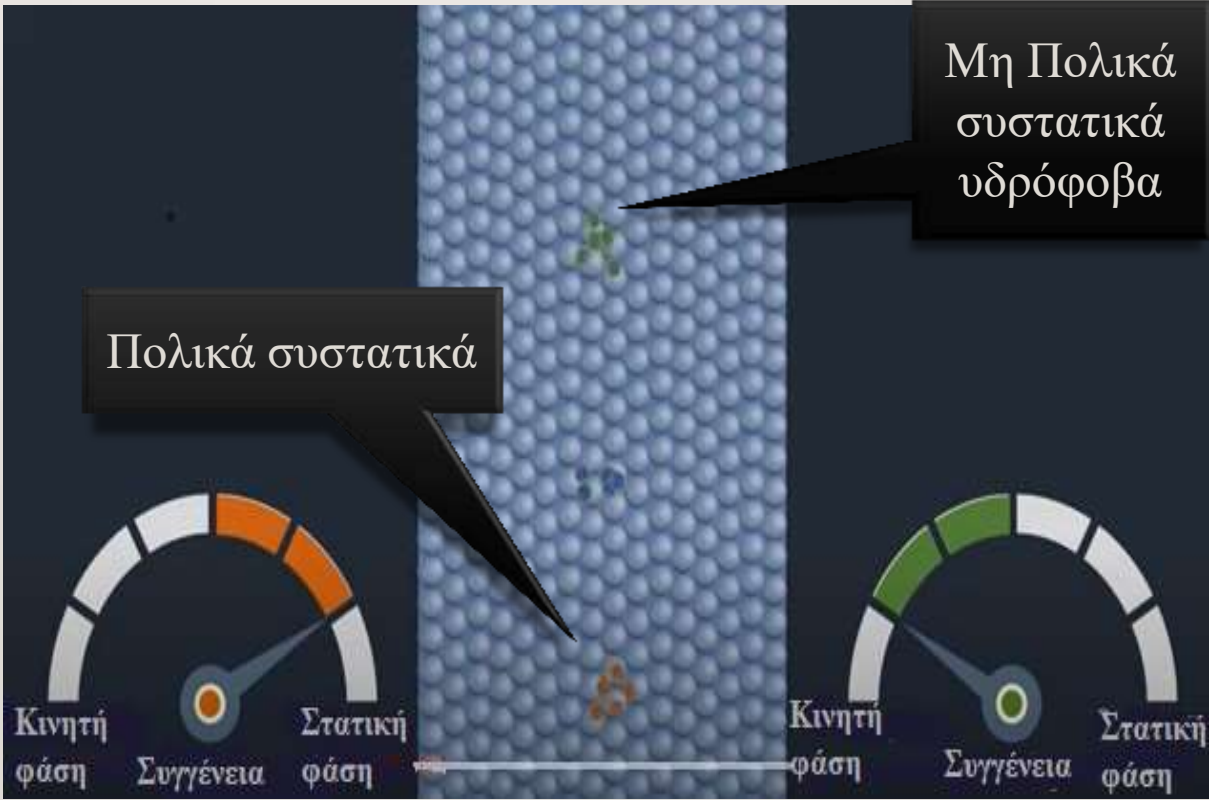
- Στατική φάση: Ανόργανο οξείδιο (συνήθως SiO_2 αλλά και Al_2O_3)- Μορφή στατικής φάσης λεπτή στιβάδα πάνω σε γυάλινο ή πλαστικό πλακίδιο
- Κινητή φάση: διαλύτης ή σύστημα διαλυτών
- Μηχανισμός διαχωρισμού: προσρόφηση, διαλυτότητα - κατανομή

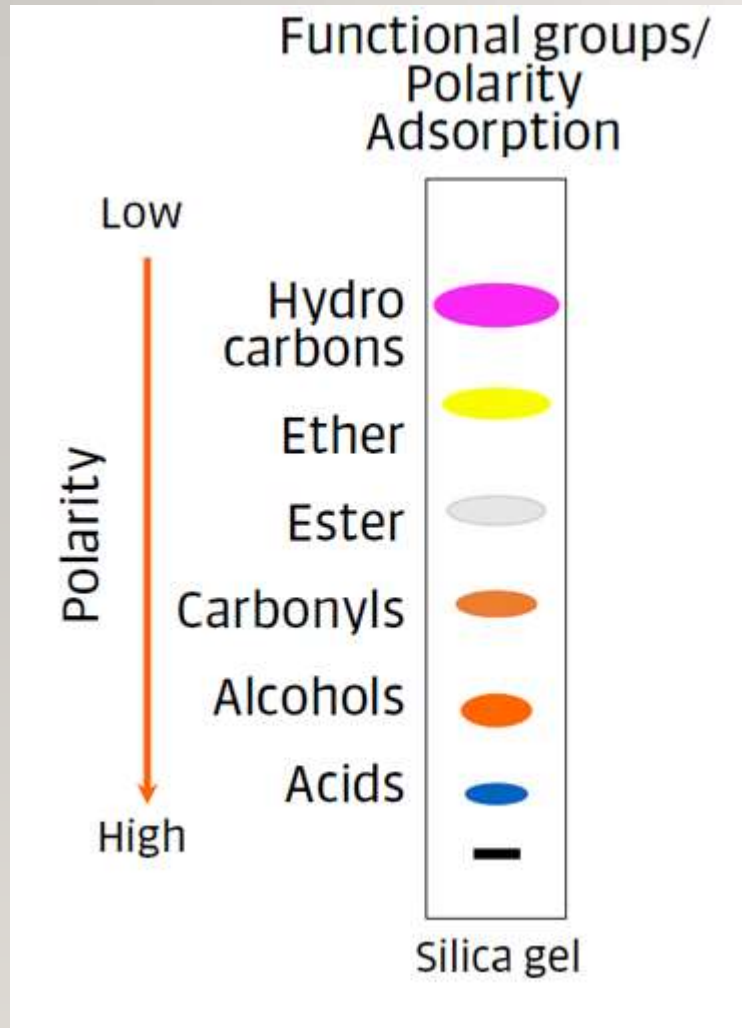


- Ο διαλύτης ανάπτυξης, ανέρχεται στην πλάκα με το προσροφητικό υλικό λόγω τριχοειδών δράσεων και συμπαρασύρει τις ουσίες του προς εξέταση δείγματος με διαφορετική ταχύτητα την κάθε μία.
- Η ταχύτητα κίνησης κάθε ουσίας εξαρτάται από τη συγγένειά της προς τις δύο φάσεις, δηλαδή μία ένωση υδρόφιλη (πολική) κινείται σχετικά αργά διότι αλληλεπιδρά ισχυρά με την πολική - υδρόφιλη στατική φάση.
- Το λιγότερο πολικό συστατικό προχωρά γρηγορότερα.



Πολύ
πολική



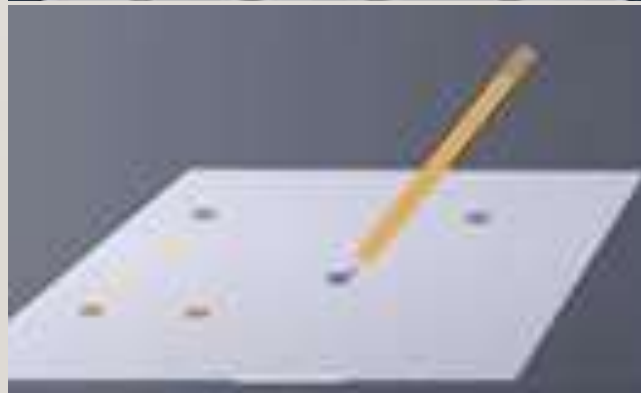


Διαλύτες		Polarity index P'	
Heptane	0.1	Acetic acid	6.0
Isopropyl ether	2.4	Dichloromethane	3.1
Diethyl ether	2.8	Ethyl acetate	4.4
2-propanol	3.9	n-butanol	3.9
n-butanol	3.9	Methylethyl ketone	4.7
1-propanol	4.0	Dioxane	4.8
Ethanol	4.3	Acetone	5.1
Methanol	5.1	Acetonitrile	5.8
Tetrahydrofuran	4.0		

ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ

- Συνηθισμένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι το εξάνιο, ο πετρελαιϊκός αιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας.
- Ο διαιθυλαιθέρας αποφεύγεται λόγω μεγάλης αναφλεξιμότητας.
- Χρησιμοποιούνται επίσης αλκοόλες (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη) και ακετόνη.
- Το οξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρές συγκεντρώσεις, γιατί είναι μη πτητικό και πολύ πολικό.
- Χλωριωμένοι διαλύτες διχλωρομεθάνιο ή χλωροφόρμιο έχουν καλή διαχωριστική ικανότητα, αλλά είναι τοξικοί και αποφεύγονται.

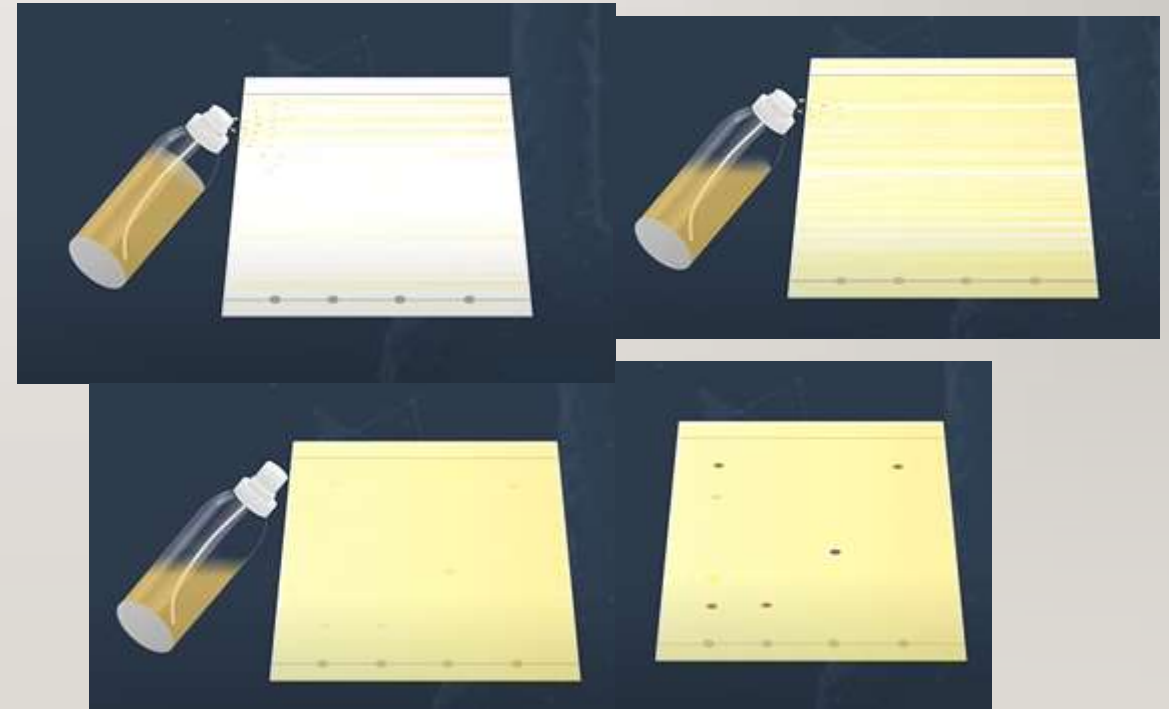
ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ



ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

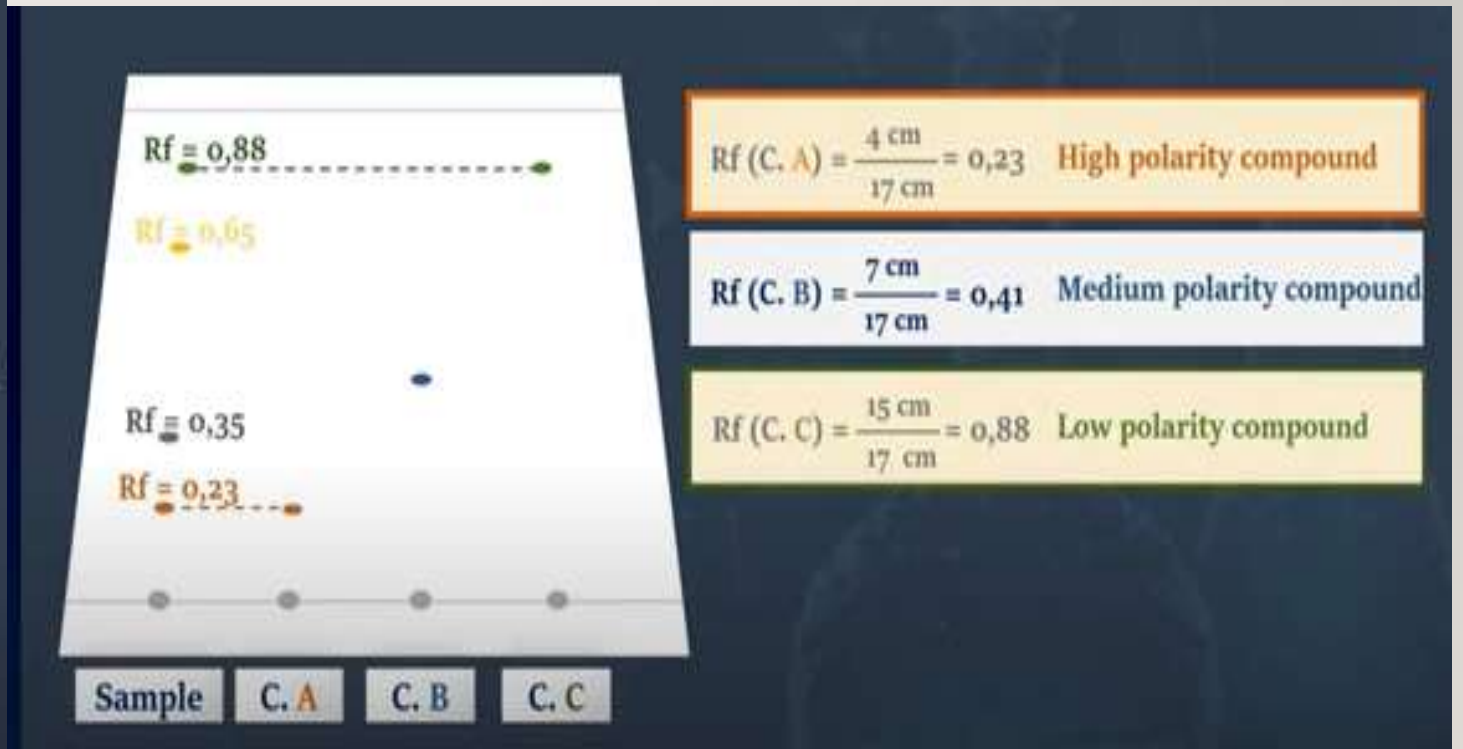


Iodine	Ninhydrin	Potassium permanganate	Vanillin
			
For unsaturated and aromatic compounds	For Amino acids, amines	For all compounds that can be oxidized	For many aldehydes, ketones, and alcohols



ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ Rf

Rf: Λόγος απόστασης που διανύει κάθε ουσία προς απόσταση που διανύει ο διαλύτης



ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΣΚΕΥΗ - ΟΡΓΑΝΑ

- Διαλύτης ανάπτυξης Αιθανόλη -απεσταγμένο νερό 8:2 (v/v)
- δ. Γλυκίνης , δ. Αλανίνης, δ. Φαινυλαλανίνης (1 mg/1mL νερού το καθένα)
- δ. Νυνιδρίνης 0,3% (w/v) σε n-Βουτανόλη
- Πλακίδιο TLC
- Ψεκαστήρας
- Μικροί σωλήνες 2 mL
- Κοινό διηθητικό χαρτί
- Θάλαμος ανάπτυξης TLC ή εναλλακτικά ποτήρι ζέσεως 250 mL και ύαλος ωρολογίου
- Πυριαντήριο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

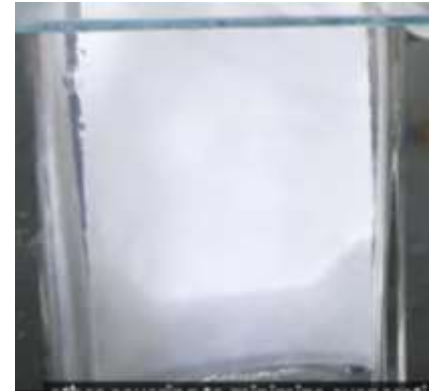
Προετοιμασία δειγμάτων (ουσιών αναφοράς και άγνωστου)



- Σε τρεις μικρούς σωλήνες προσθέτουμε
 - ✓ 1 mg γλυκίνης σε 1 mL απεσταγμένου νερού στον 1^ο
 - ✓ 1 mg αλανίνης σε 1 mL απεσταγμένου νερού στον 2^ο
 - ✓ 1 mg φαινυλαλανίνης σε 1 mL απεσταγμένου νερού στον 3^ο
 - ✓ Μίγμα δύο από τα πιο πάνω στον 4^ο

Προετοιμασία διαλύτη ανάπτυξης και θαλάμου ανάπτυξης

- Ετοιμάζουμε το διαλύτη ανάπτυξης αιθανόλη - απεσταγμένο νερό (8 : 2 v/v)
- Προσθέτουμε διαλύτη στο θάλαμο ανάπτυξης τόσο ώστε το ύψος να είναι περίπου 0,5cm. Τοποθετούμε στο εσωτερικό του θαλάμου κομμάτι διηθητικού χαρτιού για τον κορεσμό του θαλάμου με ατμούς. Για τον ίδιο λόγο σκεπάζουμε το θάλαμο. (Αν χρησιμοποιούμε ως θάλαμο ποτήρι ζέσεως τον σκεπάζουμε με ύαλο ωρολογίου ή τριβλίο petri γυάλινο ή και αλουμινόχαρτο).



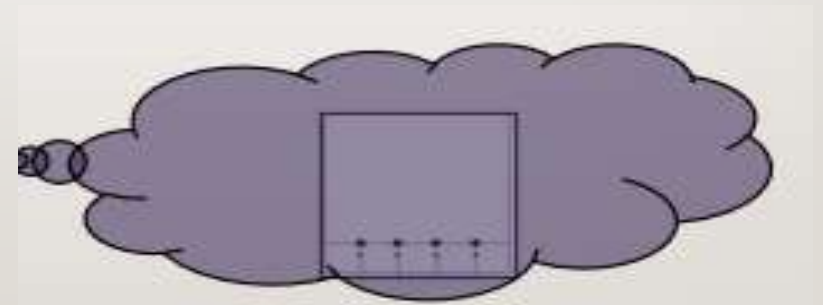
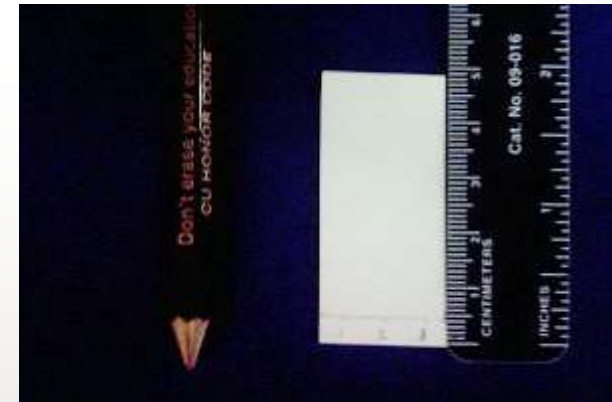
Προετοιμασία πλάκας TLC

- Οι πλάκες TLC που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια αγοράζονται ως φύλλα 5 x 20 cm ή 20 x 20 cm ή 25 x 75 mm. Τα μεγάλα φύλλα κόβονται σε μικρότερα πριν τη χρήση.
- Ο χειρισμός πρέπει να γίνεται προσεκτικά, ώστε να μην χαλάσει η επίστρωση του προσροφητικού ή να λερωθούν οι πλάκες.



Προετοιμασία πλάκας TLC

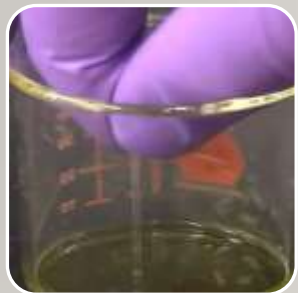
- Μετράμε 1 cm από το κάτω μέρος της πλάκας και χρησιμοποιώντας ένα μολύβι, τραβάμε μια γραμμή κατά μήκος της πλάκας. Αυτή είναι η γραμμή εκκίνησης (baseline). Προσέχουμε να μην πιέζουμε δυνατά με το μολύβι (η επίστρωση της πλάκας φθείρεται).
- Κάτω από τη γραμμή, σημειώνουμε ελαφρά το όνομα των δειγμάτων ή αριθμούς. Αφήνουμε αρκετό χώρο μεταξύ των δειγμάτων ώστε να μην τρέχουν μαζί. Συνιστώνται περίπου 4 δείγματα σε πλάκα πλάτους 5 cm.



Τοποθέτηση δειγμάτων στην πλάκα TLC

- Βυθίζουμε ένα τριχοειδές σωλήνα μέσα στο διάλυμα και στη συνέχεια, αγγίζουμε απαλά την άκρη του πάνω στην επισημασμένη θέση για το δείγμα στην πλάκα TLC. Δεν αφήνουμε την κηλίδα να γίνει πάρα πολύ μεγάλη. Αγγίζουμε και ανασηκώνουμε τον τριχοειδή αμέσως από τη πλάκα.
- Επαναλαμβάνουμε το τελευταίο βήμα πολλές φορές και η κηλίδα θα παραμείνει μικρή.
- Τη διαδικασία την κάνουμε για όλα τα δείγματα (ενώσεις αναφοράς και άγνωστο).

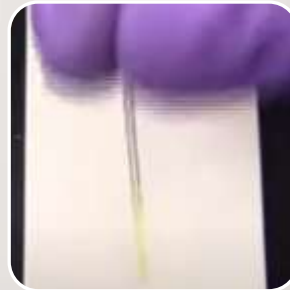




Ακουμπάμε τον
τριχοειδή στην
επιφάνεια του
δείγματος



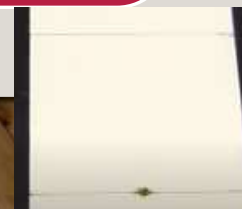
Όταν δούμε την
επιφάνεια του υγρού
να ανεβαίνει
αφαιρούμε τον
τριχοειδή



Αγγίζουμε τον
τριχοειδή πάνω
στην ένδειξη
που
σημειώσαμε με
μολύβι

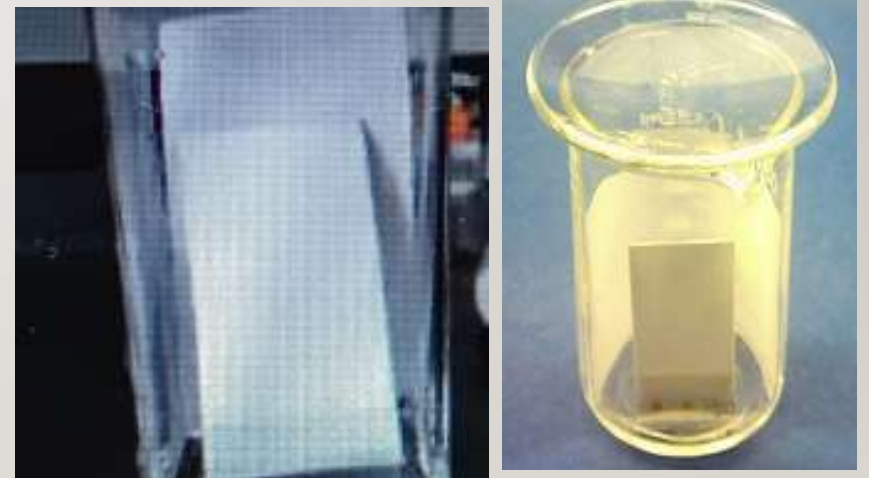


Επαναλαμβάνουμε
3, 4 φορές
αγγίζοντας γρήγορα
τον τριχοειδή στην
πλάκα TLC
Η κηλίδα να έχει
πλάτος <5mm

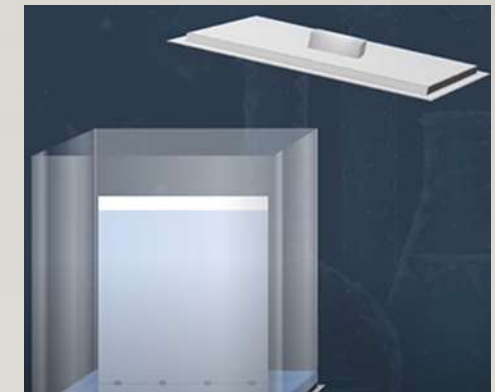


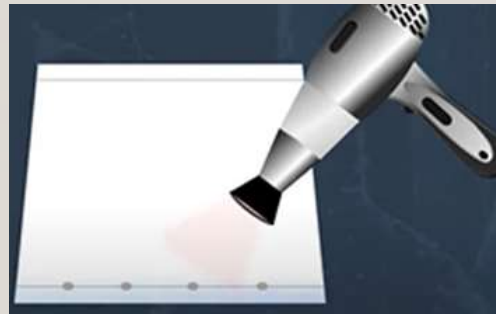
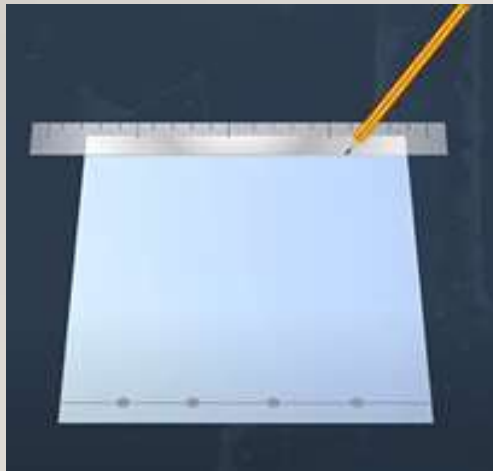
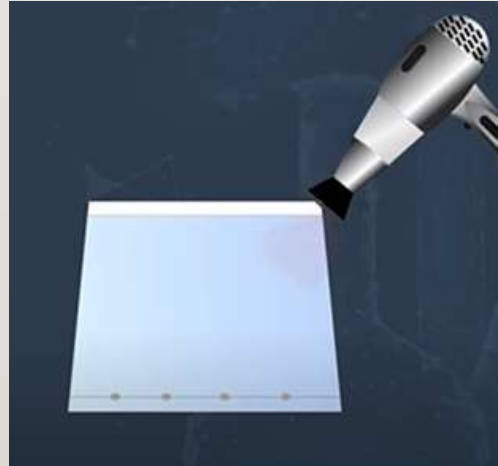
Ανάπτυξη χρωματογραφήματος

- Αφού στεγνώσουν οι κηλίδες στην πλάκα, τοποθετούμε αυτή στο θάλαμο ανάπτυξης.
- Ο διαλύτης θα ανέβει στην πλάκα TLC με τριχοειδή δράση.
- Βεβαιωνόμαστε ότι ο διαλύτης δεν καλύπτει το σημείο εκκίνησης.



Όταν ο διαλύτης φθάσει περίπου 1 cm πριν την κορυφή της πλάκας την απομακρύνουμε από το θάλαμο.





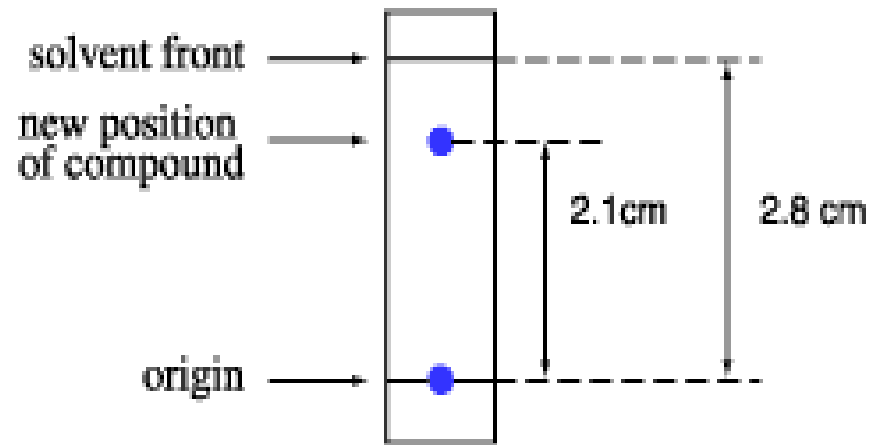
-
- Σημειώνουμε το μέτωπο του διαλύτη.
 - Στεγνώνουμε την πλάκα.

Εμφάνιση κηλίδων

- Ψεκάζουμε την πλάκα με διάλυμα νινυδρίνης και την τοποθετούμε στο πυριαντήριο στους 100 °C για 5 λεπτά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ



$$R_f = \frac{2.1}{2.8} = 0.75$$

- Μετράμε με χάρακα την απόσταση που κάθε ουσία διένυσε.
- Υπολογίζουμε το R_f

$$R_f = \frac{\text{distance traveled by the compound}}{\text{distance traveled by the solvent front}}$$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βιοχημεία 6^η ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1^η ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham, Εκδόσεις Utopia, 2019
- Οργανική Χημεία John McMurry, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- <https://www.orgchemboulder.com/Technique/Procedures/TLC/TLC.shtml>
- <https://theory.labster.com/tlc-procedure/>
- <https://teaching.ch.ntu.edu.tw/gclab/en/pdf/lecture/18-1092-S-TLC-0302.pdf>
- <https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic-compounds/a/principles-of-chromatography>
- <https://byjus.com/chemistry/differential-extraction-chromatography/#FAQs>
- <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/CMNG2164/TLC.pdf>
- <https://oeclass.aua.gr/eclass/modules/document/file.php/4947/%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91%20%CE%9B%CE%95%CE%A0%CE%A4%CE%97%CE%A3%20%CE%A3%CE%A4%CE%9F%CE%99%CE%92%CE%91%CE%94%CE%91%CE%A3/%CE%91%CE%A3%CE%9A%CE%97%CE%A3%CE%97%20%20X%CE%9B%CE%A3.pdf>
- <https://www.youtube.com/watch?v=462CmolEFhc>
- <https://www.youtube.com/watch?v=rMGQavOMAmc&t=1s>
- <https://www.youtube.com/watch?v=tDaKxskUwA0>
- <https://www.youtube.com/watch?v=weQHmx6s6BQ&t=215s>